



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Waldir Eduardo Simioni Pereira

**Expressão heteróloga de uma protease coagulante produzida por
Thermomucor indicae-seudaticae N31 em *Escherichia coli* e *Pichia
pastoris***

São José do Rio Preto
2019

Waldir Eduardo Simioni Pereira

**Expressão heteróloga de uma protease coagulante produzida por
Thermomucor indicae-seudaticae N31 em *Escherichia coli* e *Pichia
pastoris***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: FAPESP – Proc.14629-9/2017
CAPES

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva
Co-orientador: Dr. Mario Tyago Murakami

São José do Rio Preto
2019

P436e Pereira, Waldir Eduardo Simioni
Expressão heteróloga de uma protease coagulante produzida por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* / Waldir Eduardo Simioni Pereira. -- São José do Rio Preto, 2019
62 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Roberto da Silva

Co-orientador: Mário Tyago Murakami

1. Microbiologia. 2. Microbiologia Aplicada. 3. Biologia Molecular. 4. Expressão Heteróloga. 5. Enzimas microbianas I.
Título.

Waldir Eduardo Simioni Pereira

**Expressão heteróloga de uma protease coagulante produzida por
Thermomucor indicae-seudaticae N31 em *Escherichia coli* e *Pichia
pastoris***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: FAPESP– Proc.14629-9/2017
CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Gabriela Salvador de Amo
IFSP - Catanduva

Prof. Dr. Roberto Ruller
UFMS – Campo Grande

São José do Rio Preto
26 de abril de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, por todo investimento, dedicação, amor e aceitação em todos os passos que escolhi na vida, principalmente o apoio em me tornar microbiologista.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva por me aceitar como orientando, que acreditou no meu potencial e permitiu a realização desse trabalho, oferecendo toda sua dedicação e compartilhando seus ensinamentos.

Ao Dr. Luciano Kishi, pela ajuda com a procura do gene e suporte em algumas dúvidas de bioinformática. Ao Dr. Ricardo Mariutti pela ajuda com a montagem do vetor. Ao Dr. Roberto Ruller pela indicação de linhagens e suporte na etapa de expressão. E um agradecimento mais que especial a Dra. Gabriela Salvador por todo ensinamento, dedicação, paciência em me ajudar em toda parte molecular do trabalho.

A minha família de Rio Preto, Mariane, Luana e Jaqueline, que me acolheram e me deram todo o suporte, carinho e momentos inesquecíveis. Realmente pessoas que sempre pude contar.

Aos colegas do LBMA: Lorena, Carlos, Janaína, Maitê, Diego, Pedro, Ana Lúcia, Josiane, Maitê, Carol, Bel, Jéssica, Cinthia e Roni, por contribuições profissionais e pessoais, pelos momentos descontraídos que tornou o ambiente de trabalho muito mais agradável.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Ibilce por todos os valiosos ensinamentos e aos colegas discentes do Programa, principalmente aos envolvidos com a comissão do Simpósio de Biociências e Microbiologia, pela confiança na presidência da organização do evento.

A FAPESP, pela concessão da bolsa (Processo nº 14629-9/2017), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho, muito obrigado!

RESUMO

Proteases são enzimas cuja função é a hidrólise de proteínas e peptídeos, gerando produtos de variados tamanhos. São produzidas pelos mais diversos organismos vivos e possuem um amplo espectro de aplicações. O objetivo desse trabalho foi promover a expressão heteróloga de uma protease coagulante produzida por *Thermomucor indicae-seudaticae* em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, através da identificação do gene codificador da enzima. Para isso, foi realizada a comparação entre o genoma de *T. indicae-seudaticae* e *Rhizomucor pusillus* utilizado como referência. Os vetores pET 28^a (+) e pPICZ α A foram sintetizados contendo o gene de interesse para a transformação em *E. coli* e *P. pastoris* respectivamente. Células competentes de cinco diferentes linhagens de *E. coli* foram transformadas e submetidas a teste de expressão em 20 °C e 37 °C por 24 horas, analisadas tanto a fração solúvel, quanto insolúvel, onde apresentaram, aparentemente, a expressão com maior quantidade em fração insolúvel. Células de *P. pastoris* foram transformadas e submetidas a expressão por 72 horas. O extrato enzimático bruto do produto gerado da expressão foi caracterizado bioquimicamente. A enzima recombinante produzida por *E. coli* apresentou máxima atividade de 250,89 U mL⁻¹ utilizando caseína como substrato nas condições de pH 5,0 e temperatura de 50 °C, porém com estabilidade após 24 horas apenas nos pH 6,0 e 6,5, demonstrando assim ser sensível em pH alcalino. Enquanto que a enzima recombinante produzida por *P. pastoris* apresentou máxima atividade de 57,82 U mL⁻¹ nas condições de pH 5,0 e temperatura de 60 °C. Ainda a enzima produzida por *P. pastoris* apresentou melhor termoestabilidade quando comparada com a produzida por *E. coli* e ambas as enzimas tiveram forte inibição da atividade por pepstatina A, confirmando pertencer a classe das proteases aspárticas e também pelo íon mercúrio o que confirma a presença de pontes dissulfeto na estrutura da enzima.

PALAVRAS CHAVE: clonagem molecular, enzima proteolítica, DNA recombinante, caracterização bioquímica.

ABSTRACT

Proteases are enzymes whose function is the hydrolysis of proteins and peptides, generating products of various sizes. They are produced by the most diverse living organisms and have a wide spectrum of applications. The objective of this work was to promote the heterologous expression of a coagulant protease produced by *Thermomucor indicae-seudaticae* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* through the identification of the gene encoding the enzyme. For this, a comparison was made between the genome of *T. indicae-seudaticae* and *Rhizomucor pusillus* used as reference. The vectors pET 28a (+) and pPICZαA were synthesized containing the gene of interest for transformation in *E. coli* and *P. pastoris* respectively. Competent cells from five different strains of *E. coli* were transformed and submitted to the expression test at 20 ° C and 37 ° C for 24 hours, analyzed both the soluble and the insoluble fraction, where they apparently presented the expression with the highest amount in insoluble fraction. *P. pastoris* cells were transformed and submitted to expression for 72 hours. The crude enzyme extract of the expression product generated was biochemically characterized. The recombinant enzyme produced by *E. coli* presented maximum activity of 250.89 U mL⁻¹ using caseine as substrate under conditions of pH 5.0 and temperature of 50 ° C, but with stability after 24 hours only at pH 6.0 and 6.5, thus demonstrating to be sensitive at alkaline pH. While the recombinant enzyme produced by *P. pastoris* presented maximum activity of 57.82 U mL⁻¹ under conditions of pH 5.0 and temperature of 60 ° C. In addition, the enzyme produced by *P. pastoris* presented better thermostability when compared to that produced by *E. coli* and both enzymes had strong inhibition of the activity by pepstatin A, confirming that it belongs to the class of aspartic proteases and also by the mercury ion, which confirms the presence of disulfide bonds in the structure of the enzyme.

KEY WORDS: molecular cloning, proteolytic enzyme, recombinant DNA, biochemical characterization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da inserção de uma molécula de DNA humano em um plasmídeo bacteriano.....	15
Figura 2. Representação do agrupamento de fragmentos obtidos a partir de sequenciamento para montagem de genoma.....	17
Figura 3. Micela de caseína.....	23
Figura 4. Comparação da anotação dos genomas de <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> e <i>Rhizomucor pusillus</i>	31
Figura 5. Alinhamento das sequências das proteases de <i>R. pusillus</i> e <i>T. indicae-seudaticae</i> realizadas no programa ClustalW.....	33
Figura 6. Composição de aminoácidos e composição atômica predita da protease.....	34
Figura 7. Análise de peptídeo sinal da protease de <i>T. indicae-seudaticae</i> obtida pelo programa SignalP 4.0 Server.....	35
Figura 8. Análise de endonucleases de restrição que fragmentam a sequência da protease de <i>T. indicae-seudaticae</i> obtida pelo programa Nebcutter.....	37
Figura 9. Representação esquemática do vetor pET28a_ProTiN31.....	39
Figura 10. Representação esquemática do vetor pPICZ α A_ProTiN31.....	39
Figura 11. Células de <i>E.coli</i> transformadas com vetor pET28a_ProTiN31.....	40
Figura 12. Perfil de expressão da fração insolúvel de linhagens de <i>E. coli</i> induzidas com 0,05 mM de IPTG ao longo do tempo sob temperatura de 20 °C.....	41
Figura 13. Perfil da expressão da fração solúvel de linhagens de <i>E. coli</i> induzidas com 0,05 mM de IPTG ao longo do tempo sob temperatura de 20 °C.....	42
Figura 14. Perfil da expressão da fração da fração insolúvel de linhagens de <i>E. coli</i> induzidas com 0,05 mM de IPTG ao longo do tempo sob temperatura de 37 °C.....	45
Figura 15. Perfil da expressão da fração solúvel de linhagens de <i>E. coli</i> induzidas com 0,05 mM de IPTG ao longo do tempo sob temperatura de 37 °C.....	46

Figura 16. Células de <i>P. pastoris</i> transformadas com o vetor pPICZαA_ProTiN31.....	47
Figura 17. Temperatura ótima da atividade proteolítica da protease expressa em procarioto e eucarioto.....	48
Figura 18. pH ótimo da atividade proteolítica da protease expressa em procarioto e eucarioto.....	49
Figura 19. Estabilidade da protease expressa por procarioto e eucarioto incubada em diferentes valores de pH por 24 horas à 4 °C.....	51
Figura 20. Atividade residual determinada em 50 °C da protease expressa por <i>E. coli</i> incubada em diferentes tempos sob diferentes temperaturas.....	51
Figura 21. Atividade residual determinada em 60 °C da protease expressa por <i>P. pastoris</i> incubada em diferentes tempos sob diferentes temperaturas.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação das vantagens e desvantagens da expressão heteróloga entre os microrganismos <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i>	20
Tabela 2. Efeito de 5 mM de íons e substâncias na atividade proteolítica das proteases produzidas por <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i>	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Tecnologia do DNA Recombinante	14
2.2 Anotação genômica.....	15
2.3 Expressão heteróloga de proteínas.....	18
2.3.1 Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	18
2.3.2 Expressão heteróloga em <i>Pichia pastoris</i>	19
2.4 Proteases	20
2.5 Aplicação das proteases na produção de queijos e a indústria de laticínios	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Anotação do genoma	26
4.2 Linhagens de microrganismos.....	26
4.3 Análise da sequência codificadora da protease	26
4.4 Construção do plasmídeo de expressão em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i>	27
4.5 Transformação de <i>E. coli</i> com o plasmídeo pET28a_ProTiN31.....	27
4.6 Transformação de <i>P. pastoris</i> com o plasmídeo pPICZ α A_ProTiN31.....	27
4.7 Ensaio de expressão em <i>E. coli</i>	28
4.8 Obtenção da enzima recombinante em <i>E. coli</i>	28
4.9 Expressão da protease recombinante em <i>P. pastoris</i>	29
4.10 Determinação da atividade proteolítica	29
4.11 Determinação da atividade coagulante	29
4.12 Determinação da temperatura ótima da protease recombinante.....	30
4.13 Determinação do pH ótimo da protease recombinante	30
4.14 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da protease recombinante	30
4.15 Efeito de íons e substâncias na atividade proteolítica.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Comparação do genoma dos fungos <i>T. indicae-seudaticae</i> e <i>R. pusillus</i>	31
5.2 Análises <i>in silico</i> da protease	33

5.3	Construção dos vetores para expressão em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i>	35
5.4	Transformação em linhagens competentes de <i>E. coli</i> para expressão	40
5.5	Ensaio de expressão	40
5.6	Transformação em linhagens competentes para expressão em <i>P. pastoris</i>	47
5.7	Caracterização bioquímica das enzimas recombinantes	47
5.7.1	Temperatura ótima	47
5.7.2	pH ótimo	49
5.7.3	Estabilidade frente ao pH.....	50
5.7.4	Termoestabilidade	51
5.7.5	Efeito de íons e substâncias na atividade proteolítica	53
5.8	Atividade coagulante	55
6.	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Peptidases são enzimas cuja função é a hidrólise de proteínas e peptídeos, gerando peptídeos de variados tamanhos. Essas enzimas se dividem em oito famílias, são produzidas pelos mais diversos organismos vivos e possuem um amplo espectro de aplicações. Também podem ser chamadas de proteases, proteinases ou enzimas proteolíticas.

Um dos exemplos desses biocatalizadores são as peptidases aspárticas, cuja característica principal é a presença de ácido aspártico em seu sítio catalítico. Algumas dessas peptidases podem apresentar a capacidade de coagulação do leite, quando atuam sobre sua proteína principal, a caseína, principalmente na ligação peptídica Phe105-Met106.

Essas enzimas, popularmente chamadas de coalho, são as principais utilizadas na produção de queijo e são retiradas da quarta câmara do estômago de animais ruminantes, geralmente bezerros ainda em fase de lactação. Para isso é necessário o abate precoce do animal.

Outras fontes dessas enzimas se encontram na natureza e apresentam-se como bons substituintes àquelas produzidas por animais. Os fungos filamentosos vêm ganhando destaque na produção desses coagulantes, porém o processo de produção e purificação destas enzimas é dispendioso e geralmente esses microrganismos não são adequados para produção com finalidade de aplicação na indústria alimentícia, uma vez que não possuem certificação de seguros.

Uma maneira de superar esse obstáculo é a expressão heteróloga, que consiste basicamente na clonagem do gene produtor da enzima e inserção em um hospedeiro viável para a produção, como a bactéria *Escherichia coli* e levedura *Pichia pastoris*. A expressão heteróloga tende a promover um alto rendimento na obtenção do produto de interesse, além de facilitar a posterior purificação e aplicação em alimentos.

Recentemente nosso grupo de pesquisa obteve bons resultados na produção de uma protease coagulante produzida pelo fungo filamentoso *Thermomucor indicae-seudaticae*, além da mesma produzir um queijo com boas qualidades sensoriais. Desta forma, seria interessante a identificação do gene codificador desta enzima em *T. indicae-seudaticae* e a promoção da expressão heteróloga do mesmo

tanto em hospedeiro procarioto quanto em eucarioto, o que constituiu o objeto deste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

A tecnologia do DNA recombinante é uma técnica relativamente nova, com seu início na década de 1970. Ela consiste em um conjunto de procedimentos que permitem a inserção de um fragmento de DNA de um organismo em outro organismo da mesma espécie ou de diferentes espécies. É decorrente dos avanços nos estudos de Microbiologia, Genética, Bioquímica, Imunologia e Biologia Celular e Molecular (AZEVEDO, 2008).

O desenvolvimento dessa tecnologia foi possível graças à descoberta de enzimas, chamadas endonucleases de restrição, capazes de reconhecer e clivar a molécula de DNA em locais com sequências de nucleotídeos específicos, denominadas sequências palindrômicas. Essas enzimas fragmentam os nucleotídeos em determinados tamanhos, permitindo assim, introduzir esses fragmentos no genoma de outro organismo, denominado hospedeiro (COHEN, 2013).

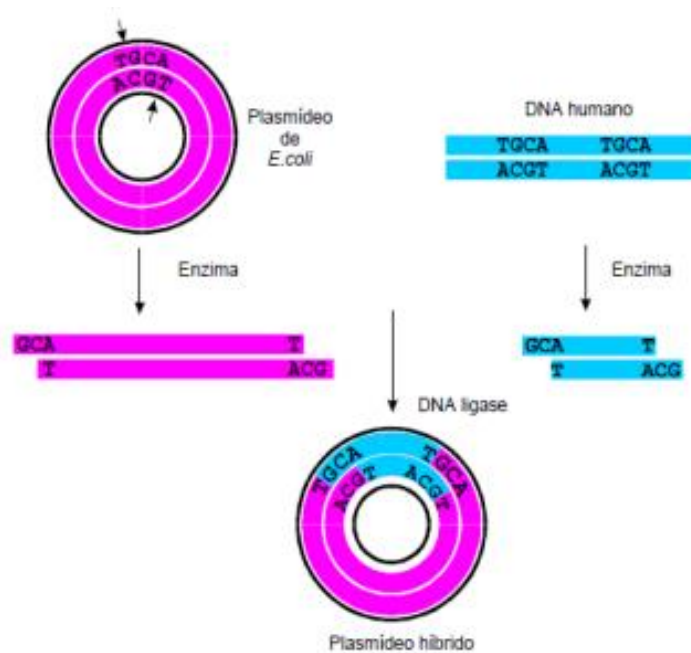
A técnica consiste, simplificadamente, na clivagem da molécula de DNA pelas enzimas de restrição com inserção desse fragmento em outra molécula de DNA, denominada vetor. Esse vetor geralmente é um plasmídeo (DNA extracromossomal circular bacteriano), que previamente também foi tratado com as mesmas enzimas de restrição do DNA a ser clonado. A ligação dos dois fragmentos gerados (molécula a ser clonada + vetor) é realizada pela ação da enzima DNA ligase (Figura 1) e então, essa nova molécula recombinante é inserida numa célula hospedeira susceptível a diversos antibióticos, geralmente células de microrganismos, porém outras células podem ser utilizadas, como a de plantas, insetos e mamíferos (LOPES et al. 2012).

A utilização de antibióticos tem a finalidade de selecionar as células que realmente foram transformadas. Para isso, acrescenta-se ao meio de cultura, antibiótico, e, uma vez que o vetor onde se encontra o inserto possui resistência àquela determinada substância, apenas células transformadas se desenvolverão (COHEN, 2013).

Após o advento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma técnica que permite o aumento do número de cópias dos fragmentos de DNA gerados na faixa de milhões, a tecnologia do DNA recombinante teve um desenvolvimento considerável (LOPES et al., 2012).

Com a progressão da tecnologia, várias aplicações foram permitidas, dentre elas: estudo de mecanismos de replicação e expressão gênica, determinação de sequências específicas de genes, produção de substâncias com diversos fins, seja ele biotecnológico, comercial ou puramente de pesquisa, entendimento de sequência, estrutura, função, fisiologia e evolução dos genes (DINIZ; FERREIRA, 2010).

Figura 1. Esquema de inserção de uma molécula de DNA humano em um plasmídeo bacteriano



Fonte: PAVAN; MONTEIRO (2014).

2.2 ANOTAÇÃO GENÔMICA

Após a descoberta das endonucleases de restrição, a área da Biologia Molecular teve um crescimento considerável, consequentemente aumentando a atenção para o genoma dos organismos vivos e vírus. A partir de então, técnicas de

sequenciamento de genomas têm se tornado essenciais para as mais diversas áreas do conhecimento.

Após o sequenciamento de um genoma, milhões de leituras são geradas e necessitam ser montadas, de modo a representar a sequência original contida no código genético do organismo. Para isso, utiliza-se da montagem de genoma.

A organização e montagem de um genoma baseiam-se em uma série de processos em que se busca estruturar e ordenar um grande número de sequências curtas de DNA em um espaço linear com o intuito de corresponder com os conjuntos de nucleotídeos completos que compõem o genoma da espécie estudada (DOHM et al., 2007).

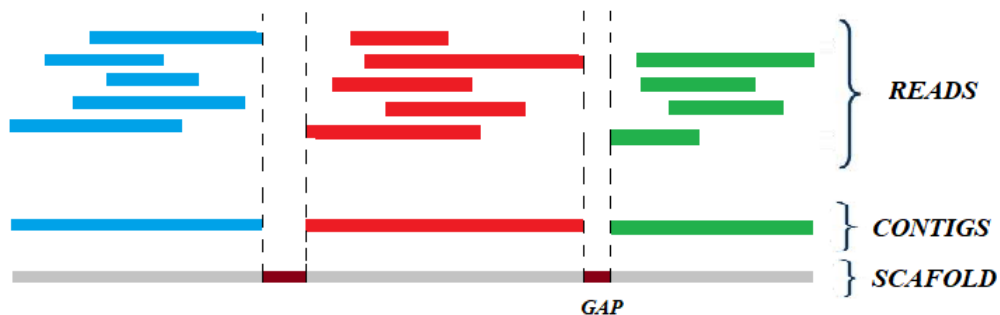
A montagem dos genomas é realizada juntando todos os fragmentos gerados concomitantemente, emparelhando-os e alinhando-os uns com os outros, buscando-se uma sobreposição de segmentos. No final, essas sobreposições são integradas de maneira linear. O tamanho das sequências pode influenciar na quantidade das sobreposições necessárias: quanto menores as sequências, mais sobreposições são necessárias para que a montagem possa ter fidelidade e estar completa. (EKBLÖM; WOLF, 2014).

A utilização das sequências pareadas facilita o processo de montagem e anotação do genoma. Quando duas ou mais das sequências obtidas no processo de sequenciamento, denominadas *reads*, são emparelhadas por possuírem pareamento semelhante, são geradas sequências maiores chamadas de *contigs*. Por sua vez, os *contigs* são novamente emparelhados, formando sequências ainda maiores chamadas de *scaffolds*. Regiões onde não se encontram sobreposição no emparelhamento das sequências são habitualmente encontradas, sendo denominados de *gaps* (Figura 2) (BAKER, 2012).

Sequências genômicas conhecidas são comumente utilizadas como referência para a montagem de genomas. Na ausência dessas referências, as sequências de leitura são usadas para uma montagem baseada em algoritmos, sendo denominada montagem de sequência *de novo*. Esse termo tem origem do latim e significa "desde o princípio", ou seja, refere-se aos métodos utilizados para determinar a sequência completa do DNA quando não há nenhuma sequência genômica disponível para uso como parâmetro para comparação. (HUNT et al., 2014).

A interpretação dos dados brutos gerados envolve a identificação e a anotação de diversos elementos presentes no DNA, tais como: sequências codificadoras de proteínas, tRNAs e rRNAs, pseudogenes e DNA repetitivo (MÉDIGUE; MOSZER, 2007).

Figura 2. Representação do agrupamento de fragmentos obtidos a partir de sequenciamento para montagem de genoma.



Fonte: Autoria própria.

A comunidade científica demonstra bastante interesse na anotação genômica, uma vez que ela permite o esclarecimento dos dados biológicos obtidos, bem como uma contextualização para o entendimento dos processos biológicos. A interpretação dos dados pode ser realizada nos níveis de nucleotídeo, de aminoácido e de processos biológicos. Em nível de nucleotídeos, o objetivo é a predição de possíveis genes ou *Open Reading Frame* (ORFs) (STEIN, 2001). Esta notação é realizada a partir de programas e softwares que efetuam cálculos estatísticos que buscam reconhecer regiões intrínsecas codificadoras. A utilização de genes ortólogos de outros organismos como fonte de comparação também constitui um artifício fundamental para a predição dos genes, porém, após a anotação automática, ainda se faz necessária uma etapa de curadoria manual (MÉDIGUE; MOSZER, 2007; REEVES; TALAVEIRA; THORNTON, 2009).

Bancos de dados que contenham depositadas informações bem caracterizadas sobre proteínas são uma das ferramentas utilizadas para a curadoria manual. Nesta etapa é realizada uma busca por regiões conservadas, e assim, a descrição mais detalhada do gene é predita, como por exemplo, o produto expresso ou a família gênica. (OVERBEEK et al., 2005).

2.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS

Com os recentes avanços no sequenciamento e estudo de genomas, um vasto número de estudos se tornou possível, dentre eles a fonte para a descoberta de novos produtos biotecnológicos de interesse, como: compostos bioativos, enzimas, proteínas, peptídeos antimicrobianos, polissacarídeos, hormônios, etc. Esses novos produtos podem ser obtidos numa quantidade relativamente grande, quando comparados aos seus produtores nativos, através da expressão heteróloga (CLARK; PAZDERNIK, 2016; RAMANA; XAVIER; SHARMA, 2017).

Sistemas microbianos de expressão heteróloga de proteínas utilizam genes de interesse advindos de organismos procariotos ou eucariotos e são expressos em diferentes microrganismos, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*. Esses sistemas são atrativos devido ao rápido crescimento dos hospedeiros em substratos de baixo custo, fisiologia e a genética de hospedeiros serem bem conhecidas e uma disponibilidade comercial de um grande número de vetores de clonagem e linhagens hospedeiras viáveis (LAMBERTZ et al., 2014).

Enzimas microbianas recombinantes com aplicações industriais vêm se destacando nos últimos anos. Diversas delas já foram clonadas e expressas em hospedeiros heterólogos, dentre elas se destacam: xilanases (AMO, et al., 2019), celulases (GARVEY, et al., 2014), proteases (SALGADO; KANGWA; FERNANDEZ-LAHORE, 2013; SUN et al., 2018).

As proteínas expressas por esses sistemas podem ser facilmente purificadas, quando adicionado ao gene a ser expresso, uma sequência codificadora de cauda de histidina. Esta cauda possui uma grande afinidade por alguns íons metálicos, como Ni^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} , permitindo que o produto seja rapidamente separado de outras proteínas existentes no meio, com pureza de até 95% (HENGGEN, 1995).

2.3.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *Escherichia coli*

O sistema de expressão em *E. coli* foi o primeiro a ser utilizado para produzir produtos farmacêuticos recombinantes e apresenta algumas vantagens em relação com sistemas eucarióticos, como fácil cultivo, baixo custo e alto potencial de produção (Tabela 1) (LAMBERTZ et al., 2014).

Diversos sistemas de expressão heteróloga encontram-se disponíveis com protocolos bem estabelecidos. O modelo mais utilizado e atraente continua sendo a expressão na bactéria Gram negativa *E. coli*, uma vez que sua genética já é bem estabelecida e conhecida, existem uma gama de vetores compatíveis, além de um número considerável de cepas mutantes (ROSANO; CECARELLI, 2014).

Apesar das vantagens da expressão na respectiva bactéria, este modelo apresenta algumas desvantagens. A grande desvantagem da *E. coli* é que muitas vezes em um processo de expressão citoplasmática há dificuldades em se obter a proteína na sua correta conformação original, com ausência do processo de glicosilação, como é observado em sistemas de expressão eucariotos (LAMBERTZ et al., 2014).

Ainda, no processo de expressão proteica em *E. coli*, é interessante e mais desejável se obter a proteína recombinante na sua forma solúvel e com sua conformação estrutural correta, porém o mal dobramento proteico pode resultar em degradação proteolítica no citoplasma, uma vez que proteínas em sua conformação incorreta são rapidamente degradadas como forma de reciclagem de aminoácidos.

Outro problema encontrado na expressão de proteínas heterólogas nesse sistema bacteriano é o alto nível de expressão, que pode resultar a formação de agregados insolúveis denominados corpos de inclusão. Eles são formados devido à falta ou a baixa quantidade de chaperonas. A formação desses corpúsculos dificulta a obtenção da proteína e posterior purificação e nem sempre é possível obtê-la com atividade biológica (ADRIO; DEMAINE, 2010).

2.3.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *Pichia pastoris*

A levedura metilotrófica *P. pastoris* é, dentro dos hospedeiros heterólogos eucariotos, uma das que mais se destaca, assim como a levedura *S. cerevisiae*. Esse microrganismo é um sistema de expressão muito bem caracterizado, com manipulação genética simples e possui a capacidade de produzir proteínas heterólogas com bom rendimento de expressão (SUN et al., 2018).

Além da quantidade de proteína expressa, ela ainda apresenta a vantagem de secretá-la para o meio extracelular, eliminando assim a etapa de rompimento de células, como no caso de hospedeiros procariotos. Ainda, a levedura possui a

capacidade de realizar modificações pós traducionais, tais como ligações de dissulfeto e glicosilações (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012).

Adicionalmente, *P. pastoris* é um organismo GRAS (*generally recognized as safe*), possibilitando assim, a utilização dos produtos expressos por ela em processos industriais como na produção ou processamento de alimentos (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Tabela 1. Comparação das vantagens e desvantagens de expressão heteróloga entre os microrganismos *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*

Característica Organismo	Modificações pós traducionais	Fácil cultivo	Baixo custo	Secreção extracelular	GRAS
<i>Escherichia coli</i>	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO
<i>Pichia pastoris</i>	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM

Fonte: Autoria própria

2.4 PROTEASES

Algumas proteases já foram clonadas e expressas heterologicamente, como a protease aspártica produzida por *Mucor circinelloides*, expressa em *P. pastoris* (SALGADO; KANGWA; FERNANDEZ-LAHOURE, 2013) e a protease ácida produzida por *Metschnikowia reukaufii* expressa em *E. coli* (LI; CHI; WANG, 2010)

Proteases são enzimas que atuam na atividade proteolítica, clivando ligações peptídicas em proteínas e peptídeos (RAO et al., 1998). Podem ser chamadas de proteinases, enzimas proteolíticas ou peptidases, com distribuição em todos os organismos vivos (SILVA, 2017).

Enzimas proteolíticas são classificadas em dois grandes grupos: exo ou endopeptidases, sendo essa divisão relacionada com o sítio de clivagem, onde as exopeptidases atuam clivando a cadeia polipeptídica nas regiões carboxi ou amino terminal; contrariamente, endopeptidases realizam essa clivagem nas regiões internas da cadeia polipeptídica (RAO et al., 1998).

Essas enzimas se dividem em oito famílias: serino proteases, cisteíno peptidases, glutâmico peptidases, metalo peptidases, treonino peptidases, asparagino peptídeo liase, as peptidases desconhecidas e por fim as proteases aspárticas.

O grupo das serino proteases (E.C. 3.4.21) é o mais abundante entre as endopeptidases. O que caracteriza esse grupo é a dependência por um resíduo de serina (Ser) para a ação catalítica no seu sítio ativo, juntamente com um resíduo de histidina (His) e um ácido aspártico (Asp), compondo assim a tríade catalítica His, Ser e Asp. O pH ótimo dessas enzimas é na faixa entre 6 e 11 e possuem inibição na presença de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), inibidor de tripsinas, quimostatina, e algumas outras substâncias (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006)

Cisteíno peptidases (E.C. 3.4.22) são enzimas classificadas como endopeptidases, caracterizadas pela presença e dependência de um resíduo de cisteína em seu sítio catalítico, apresentando pH ótimo de atuação entre 4,5 e 7. Apresentam inibição por ácido iodoacético, N-Etilmaleimida, e alguns outros inibidores.

As glutâmico peptidases (E. C. 3.4.23.19) são enzimas que possuem o sítio de clivagem na porção carboxiterminal e são inibidas por pepstatina A. É um grupo recente, que até então era caracterizado como pertencente às peptidases aspárticas, porém, após estudos bioquímicos e estruturais, essas proteases foram reclassificadas como um novo subgrupo. Possuem ótima atividade em pH ácido, geralmente 1-2.

Outro subgrupo das proteases são as metalo peptidases (E. C. 3.4.24), constituído por exo e endopeptidases. Sua catálise depende de um íon divalente, geralmente zinco. Seu sítio ativo é formado por histidina, glutamina, repetição de um mesmo aminoácido (histidina ou glutamina) seguido por uma outra Histidina. Um exemplo de enzimas que se encontram esse grupo é a toxina hemorrágica de veneno de serpente (RAO, 1998).

Ainda há o grupo das Treonino peptidases (E. C. 3.4.25), caracterizado pela presença de uma treonina no seu sítio ativo. Sua função é hidrolisar um amplo espectro de proteínas do meio intracelular de alguns organismos vivos. Este grupo é pouco conhecido, sendo necessários mais estudos e informações disponíveis (WARD; RAO; KULKARNI, 2009).

As asparagino peptídeo liases constituem uma família recente de protease, descrita em 2011, que possui a característica de clivagem de resíduos de asparagina sem necessariamente ocorrer por hidrólise. (RAWLINGS, BARRETT e BATELMAN, 2016)

Existe ainda o grupo das proteases onde é desconhecido seu tipo de mecanismo catalítico, sendo assim chamadas de peptidases desconhecidas.

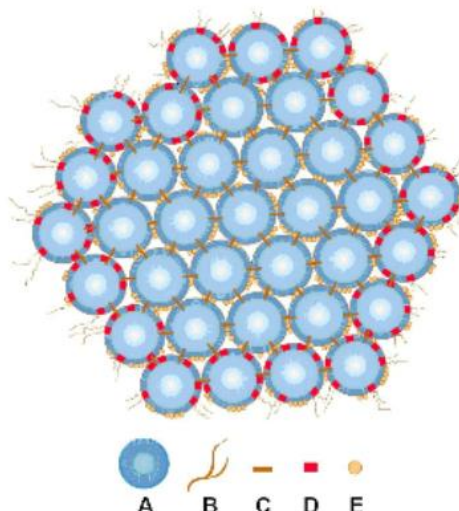
As proteases aspárticas (EC 3.4.23) também conhecidas como proteases ácidas, são enzimas encontradas na maioria dos organismos, tais como animais, bactérias, protozoários, fungos e plantas. Sua principal característica é a presença de dois resíduos de ácido aspártico em seu sítio catalítico (HORIMOTO; DEE; YADA, 2009).

Algumas dessas endopeptidases podem possuir a função de hidrolisar a caseína, especificamente a ligação peptídica da κ -caseína entre os aminoácidos Phe₁₀₅-Met₁₀₆ liberando para- κ -caseína e glicomacropéptido, que promove a desestabilização de micelas de caseína, resultando na coagulação do leite (SHAH; MIR; PARAY, 2014).

A caseína é uma proteína que, em relação à solubilidade em pH 4,6 a 20 °C, possui a característica de se precipitar (FOX; KELLY, 2004). Ela é encontrada na forma de partículas coloidais ligeiramente esféricas, denominadas micelas, e uma parte de sua solubilidade depende de alguns parâmetros como concentração de íons, cálcio e pH (Figura 3) (SGARBIERI, 1996). A partir de análises realizadas em microscopia eletrônica, percebeu-se que sua estrutura é dividida em submicelas, denominadas α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína, κ -caseína e γ -caseína (FOX; BRODKORB, 2008).

O leite bovino é uma grande fonte de proteínas. Dentre elas, a proteína mais importante, em termos quantitativos, nutricionais e industriais, é a caseína, que está presente em cerca de 80% do leite. A partir dessa matéria-prima, vários produtos lácteos podem ser produzidos. (FOX; KELLY, 2004).

Figura 3. Micela da caseína (A: submicela; B: cadeias de glicoproteínas; C: fosfato de cálcio; D: κ -caseína; E: grupo fosfato)



Fonte: <http://www.food-info.net/es/protein/milk.htm>

2.5 APLICAÇÃO DAS PROTEASES NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS E A INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

A indústria de produtos derivados do leite é um ramo da economia com bastante destaque no Brasil e no mundo. Dados indicam que, no Brasil, o consumo de leite *in natura* foi de 61,3 litros *per capita* em 2014, enquanto que nos Estados Unidos, esse consumo foi de 71,6 em 2016 (CANADIAN DAIRY INFORMATION CENTRE, 2016).

Na indústria de laticínios, a produção de queijos constitui uma das mais notáveis atividades. Para obtenção de um produto de ótima qualidade, vários fatores são importantes para garantir boas características sensoriais do produto final, dentre elas, destacam-se: a cultura utilizada, os diferentes tratamentos dados à massa, o método de coagulação e o coalho/coagulante (BONATO et al. 2006).

O termo coalho é designado como a utilização de enzimas extraídas da quarta câmara do estômago de ruminantes (abomaso), principalmente de bezerros em fase de lactação, enquanto que o termo coagulante é utilizado para todas as enzimas, sejam de origem vegetal ou microbiana, utilizadas para realizar a coagulação do leite (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

O coalho bovino é composto pela mistura de duas proteínas: renina (ou quimosina) e pepsina. A proporção dessas proteínas é variável e depende de uma série de fatores, como idade e dieta do animal antes do abate.

Embora o coalho ainda seja utilizado na indústria de laticínios no processo de coagulação do leite, sua oferta vem diminuindo a cada ano devido à redução de abates de bezerros para estes fins, à preocupação por parte dos consumidores lacto-vegetariana e à necessidade do aumento da produção de carne como consequência do crescimento populacional (JACOB; JAROS; ROHM, 2011).

Em substituição a esse coalho, uma alternativa viável nos últimos tempos vem sendo a utilização de coagulantes enzimáticos (ROLET-REPÉCAUD et al., 2013; PIÑA et al., 2015). Os principais coagulantes enzimáticos utilizados na indústria de produtos lácteos são as proteases.

Embora o uso desses coagulantes venha crescendo, alguns problemas ainda são encontrados na produção de queijos provenientes desse método de coagulação. Dentre esses problemas, destacam-se redução na produção industrial, devido à intensa atividade proteolítica dessas enzimas, sabor mais amargo do produto final devido a presença de aminoácidos hidrofóbicos e textura desagradável (MOLLER et al., 2012).

As enzimas utilizadas como coagulantes produzidas industrialmente são majoritariamente provenientes de microrganismos e vêm sendo obtidas principalmente por fermentação, tanto no estado sólido, quanto submerso (BOM et al., 2008; SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

Os principais microrganismos produtores de enzimas coagulantes exploradas comercialmente são *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Cryphonectria parasitica*, *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. (JACOB; JAROS; ROHM, 2011).

Merheb-Dini e colaboradores (2012) obtiveram bons resultados na atividade coagulante de uma protease produzida por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, durante a produção de queijo prato, demonstrando assim a eficiência desses coagulantes, e, ainda, Silva et al. (2014) chegaram a bons resultados na produção dessa enzima.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Promoção da expressão heteróloga da protease produzida por *Thermomucor indicae-seudaticae* em procarioto (*Escherichia coli*) e eucarioto (*Pichia pastoris*), e a caracterização bioquímica das enzimas expressas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificação do gene codificador da protease em *Thermomucor indicae-seudaticae*;
- Transformação em linhagens competentes de *E. coli* para expressão;
- Transformação em linhagens competentes de *P. pastoris* para expressão;
- Produção das enzimas recombinantes;
- Caracterização bioquímica das enzimas recombinantes, incluindo determinação do pH e da temperatura ótimos, termoestabilidade, estabilidade frente ao pH e efeito de íons na atividade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANOTAÇÃO DO GENOMA

O genoma da *Thermomucor indicae-seudaticae* linhagem HACC 243 (Genbank JSYX00000000.1) e *Rhizomucor pusillus* (Genbank FWWN00000000.1) foram recuperados do banco NCBI, pelo Dr. Luciano Takeshi Kishi, realizando a predição de CDS e anotação funcional com o programa Funannotate (<https://github.com/nextgenusfs/funannotate>), utilizando os bancos PFAM (FINN et al., 2014) Interpro (FINN et al., 2017), dbCAN (YIN et al., 2012), Merops (RAWLINGS; BARRETT; FINN, 2016), Uniprot (UNIPROT CONSORTIUM, 2018) e GO (ASHBURNER et al., 2000) em um servidor Dell R930, 4 processadores 14 core Intel Xeon, 1 tera RAM, 22 tera HD, OS CentOS 7 Linux.

Uma busca por similaridade utilizando o programa Blast foi utilizado contra os genes anotados de *Thermomucor indicae-seudaticae* e *Rhizomucor pusillus* usando como “isca” um gene de uma protease aspártica coagulante (Genbank AB018789.1).

4.2 LINHAGENS DE MICRORGANISMOS

Os vetores para expressão contendo a sequência da protease para expressão foram sintetizados pela empresa Biomatik®, do Canadá.

As linhagens de *E. coli* utilizadas neste trabalho foram Artic Express, BL21 (DE3), Origami 2(DE3) pLysS, Rosetta-gami 2(DE3) 2 pLysS e pRARE para a expressão da enzima recombinante no sistema procarioto.

As linhagens de *P. pastoris* X33 e KM71 foram utilizadas para transformação e expressão no sistema eucarioto.

4.3 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA PROTEASE

A sequência obtida através da anotação foi comparada com sequências depositadas no banco de dados do GenBank, utilizando-se o algoritmo de busca BLAST-X (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Outras ferramentas utilizadas para análise da sequência foram Clustal Ômega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), para alinhamento e homologia entre proteases sequenciadas, Nebcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), para análise de sítios de restrição, SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Signalp/>), para verificação da presença de peptídeo sinal e Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) para predição de características da enzima.

4.4 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO EM *E. coli* E *P. pastoris*

O gene codificador de protease foi sintetizado pela empresa Biomatik®, que previamente realizou a otimização de códons para expressão e ligou ao vetor pET_28a (+), que apresenta compatibilidade com diversas linhagens de *E. coli*. Para a expressão em *P. pastoris* o gene codificador foi ligado ao vetor pPICZαA, também sintetizado pela mesma empresa. Para a construção dos plasmídeos de expressão (pET-28a_ProTiN31 e pPICZαA_ProTiN31), foram adicionados uma cauda de histidina (His-tag) e um sítio para TEV protease à porção N-terminal da sequência alvo.

4.5 TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* COM O PLASMÍDEO pET28A_PROTIN31

Para a transformação de *E. coli*, 80 nanogramas do plasmídeo de expressão contendo o gene da protease (pET28a_ProTiN31) foram misturados a 50 µL de células competentes. A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos, seguindo-se incubação a 42 °C por 30 segundos e gelo por mais dois minutos. Foram adicionados 200 µL de meio LB (*Luria Bertani*) às células transformadas, as quais foram incubadas a 37 °C por uma hora e meia sob agitação em shaker de 230 rpm para regeneração. Na sequência, os transformantes foram plaqueados em meio LB contendo 1% de ágar, acrescido de canamicina (50 µg mL⁻¹).

4.6 TRANSFORMAÇÃO DE *P. pastoris* COM O PLASMÍDEO pPICZAA_PROTIN31

Para a transformação de *P. pastoris* 5 µg do plasmídeo de expressão contendo o gene da protease (pPICZαA_ProTiN31) foram previamente linearizados utilizando a enzima de restrição SacI e ligados a 2 mg/mL de DNA de esperma de salmão, juntamente com 240 µL de Polietilenoglicol 50% e 36 µL de acetato de lítio 1

M. Em seguida foram misturados a 50 μ L de células competentes. A mistura foi mantida em estufa a 30 °C por 30 minutos, seguindo-se incubação em banho-maria a 42 °C por 25 minutos e centrifugação por 11200 xg por 20 minutos. Na sequência foram adicionados 1 mL de meio YPD às células transformadas, as quais foram incubadas a 28 °C por uma hora e 4 horas sob agitação em shaker de 240 rpm para regeneração. Na sequência, os transformantes de cada tempo de incubação foram plaqueados em meio YPD contendo 2% de ágar, acrescido de zeocina (100 μ g mL⁻¹).

4.7 ENSAIOS DE EXPRESSÃO EM *E. coli*

Colônias individualizadas foram selecionadas para preparo de pré-inóculo contendo 10 mL de meio TB (*Terrific Broth*) suplementado com canamicina (50 μ g mL⁻¹), incubados *overnight*.

Em 50 mL de meio TB suplementado com canamicina (50 μ g mL⁻¹) foram adicionados 5 mL do pré-inóculo de transformantes a 37 °C e 200 rpm, até que a cultura atingisse densidade óptica em 600 nm entre 0,9 e 1,0. Uma vez atingida a densidade óptica desejada, as culturas foram induzidas com a concentração de 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo) e testadas sob a incubação a 20 °C e 37 °C com 200 rpm de agitação. Em diferentes intervalos após a indução (2, 4, 6, 8 horas e *overnight*), uma alíquota de 1 mL dos cultivos foi coletada, centrifugada à 10000 xg por 10 minutos. Foi coletada também uma alíquota no momento antes da indução da expressão para comparação.

Os pellets celulares foram então submetidos à lise celular utilizando o kit “*BugBuster*” (Novagen) diluído 10X em tampão fosfato pH 7,4 0,1M, seguindo as recomendações do fabricante. Foram então separadas as porções solúveis (sobrenadante) e insolúveis (precipitado), adicionadas ao tampão amostra e submetidas à desnaturação em banho fervente a 98 °C para análise do perfil de expressão em SDS-PAGE.

4.8 OBTENÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE EM *E. coli*

Para a obtenção de extrato enzimático contendo a protease recombinante, foi selecionada a linhagem Origami e foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 4.7 em volume de 500 mL, porém fixou-se a temperatura de 20 °C após a indução com IPTG. Após 8 horas todo o extrato obtido foi centrifugado à 10000 rpm

por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuscitado em tampão Tris-HCl pH 7,4 (5 mL por grama de célula) e então submetido à lise através de ultrassonicador Branson® seguindo a seguinte metodologia: quatro pulsos de 30 segundos, com intervalo de 1 minuto entre os pulsos, utilizando uma amplitude de 50%. Em seguida o extrato foi centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos sob temperatura de 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como fonte da protease.

4.9 EXPRESSÃO DA PROTEASE RECOMBINANTE EM *P. pastoris*

Para expressão da protease, uma colônia transformante foi inoculada em 25 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1 %, peptona 2 %, tampão fosfato pH 6,0 100 mM, YNB 1,34 %, biotina 4×10^{-5} % e glicerol 1 %) e cultivada a 28 °C com 240 rpm de agitação por 18 horas. Após isso, o cultivo foi centrifugado a 1500 xg por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuscitadas em 200 mL de meio BMMY, o qual apresenta a mesma composição do meio BMGY, porém, com substituição do glicerol 1 % por metanol a 0,5 %. O cultivo foi realizado em erlenmeyer haletado de 2 L, a 28 °C com 240 rpm de agitação. A cada 24 horas, 2 mL de metanol foram adicionados, visando-se promover a indução da expressão, num total de 72 horas.

Após o tempo de indução o cultivo foi centrifugado por 10000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático.

4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A atividade proteolítica foi determinada incubando 200 µL de extrato enzimático em 400 µL de meio tamponado com 0,5% de caseína bovina e 400 µL de tampão acetato pH 5,0 em 30 °C. Após 10 minutos a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de TCA 10% e centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 280 nm. A atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para provocar a variação de 0,01 na absorbância de 280 nm sob as condições da reação.

4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE

A atividade coagulante foi realizada de acordo com Arima et al. (1970) com modificações. Foi incubado 1 mL da solução 10% (p/v) de leite desnatado (Itambé)

com CaCl_2 0,01 mol/L em banho termostático para teste de coagulação coalho com rotação constante em faixas de temperatura de 30 °C a 70 °C com 0,1 mL de enzima, até a observação da formação de coágulos de leite na parede do tubo de ensaio

4.12 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DA PROTEASE RECOMBINANTE

Para determinar a temperatura ótima da atividade proteolítica, a reação foi realizada conforme o item 4.10, variando entre as faixas de temperatura 30 a 80 °C com intervalo de 5 °C.

4.13 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DA PROTEASE RECOMBINANTE

Para determinar o pH ótimo de atuação da enzima, a reação foi realizada conforme o item 4.10, variando o pH do tampão e da solução de caseína. Os tampões utilizados foram: acetato (5,0), Mes (5,5 a 6,5) Hepes (7,0 a 8,0) e Bicine (8,5 e 9,0)

4.14 EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA PROTEASE RECOMBINANTE

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi testado nas temperaturas entre 40 °C e 70 °C com intervalo de 5 °C entre cada. Para isso, o extrato enzimático foi pré-incubado em banho-maria e avaliados os períodos de incubação de 0, 5, 10, 15, 30 minutos e 1, 3 e 5 horas.

O pH de estabilidade da enzima foi determinado pela diluição da enzima em solução tampão a 0,4 mol/L 1:1 (v:v): acetato (5,0), Mes (5,5 a 6,5) Hepes (7,0 a 8,0) e Bicine (8,5 e 9,0), incubado 24 horas à 4°C, seguindo-se ensaio enzimático.

4.15 EFEITO DE ÍONS E SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para a avaliação do efeito de íons na atividade proteolítica, o extrato enzimático foi incubado por 5 minutos sob temperatura ambiente na presença de 5 mM de cada íon separadamente: Fe, Ni, Ca, Ba, K, Mg, Mn, Zn e Hg e nas substâncias: pepstatina A, EDTA, β -mercaptoetanol e SDS. Posteriormente a atividade proteolítica foi determinada

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPARAÇÃO DO GENOMA DOS FUNGOS *T. indicae-seudaticae* E *R. pusillus*

A fim de comparar e identificar a protease coagulante de *T. indicae-seudaticae* com base na semelhança da protease de *R. pusillus*, foi realizada a anotação dos genomas das duas espécies foi realizada. As análises da anotação encontram-se na figura 4.

Figura 4. Comparação da anotação dos genomas de *Thermomucor indicae-seudaticae* e *Rhizomucor pusillus*.

Genome Summary Stats

species	<i>Thermomucor indicae_seudaticae</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i>
isolate	thermom	rhizom
locus_tag	Thermom	Rhizom
Assembly Size	29,508,461 bp	25,452,938 bp
Largest Scaffold	195,225 bp	2,208,845 bp
Average Scaffold	15,780 bp	519,448 bp
Num Scaffolds	1,870	49
Scaffold N50	35,206 bp	1,214,085 bp
Percent GC	45.83%	44.28%
Num Genes	9,677	10,212
Num Proteins	9,547	10,085
Num tRNA	130	127
Unique Proteins	8,243	8,806
Prots atleast 1 ortholog	5,236	5,289
Single-copy orthologs	3,270	3,270

Fonte: Autoria própria

Como são organismos de gêneros diferentes, é comum que haja uma diferença entre o tamanho dos genomas, o que foi apresentado, pois o fungo *T. indicae-seudaticae* apresenta uma quantidade de pares de bases superior, quando comparado com *R. pusillus*, porém com um número de genes menor. Fungos de mesmo gênero podem apresentar genomas de tamanhos diferentes, uma vez que alguns eventos durante o processo evolutivo podem ocorrer, como translocação de genes, duplicação e até mesmo deleção (MOHANTA; BAE, 2015).

Levando em consideração o número de *scaffolds*, a variação evidente do tamanho entre os dois fungos é resultado da cobertura do sequenciamento, qualidade e precisão da montagem (MILLER; KOREN; SUTTON, 2010). Assim, a média do tamanho dos *scaffolds* é inversamente proporcional ao número de *scaffolds* obtidos.

O valor de N50 indica, estatisticamente, o número médio do comprimento das sequências, ou seja, 50% das sequências são maiores que o valor apresentado, enquanto que 50% são menores.

A partir da busca por similaridade do “gene isca” *milk-clotting aspartic proteinase* de *R. pusillus*, chegou-se a seleção de uma sequência de *T. indicae-seudaticae* aqui denominada ProTiN31.

Ao realizar a comparação das duas sequências em nível de aminoácidos com o uso do programa BLAST, observou-se que estas, apresentam uma similaridade de 41%. A análise do alinhamento realizado no programa ClustalW encontra-se na figura 5.

Ambas as sequências pertencem à família A1 das proteases aspárticas. A protease do fungo *R. pusillus* possui 427 resíduos de aminoácidos, enquanto que a protease do fungo *T. indicae-seudaticae* possui 382.

O que caracteriza a família das proteases aspárticas é a presença, em sua estrutura quaternária, de uma díade de ácido aspártico (D) em seu sítio ativo (destacado em amarelo na figura). Em *R. pusillus*, esses resíduos ocupam as posições 104 e 303. Já em *T. indicae-seudaticae* as posições dos ácidos aspárticos de seu sítio ativo são nos resíduos 46 e 262.

Figura 5. Alinhamento das sequências das proteases de *R. pusillus* e *T. indicae-seudaticae* realizadas no programa ClustalW. Letras destacadas em amarelo representam o sítio ativo da enzima. “*” Representam total similaridade, “:” representam alta similaridade, “.” Representam baixa similaridade “-” representam ausência de similaridade.

Rhizomucor	MLFSKISSAILLTAASFALTSARPVSKQSDADDKLLALPLTSVNRKYSQTKHGQQAAGKL	60
Thermomucor	-----MR	2
Rhizomucor	GGIKAFKAEKGDGSDVTPGLYDFDLEEYAIIPVSIPTGQDFYLLFDTGS SDTWVPHKGC DNS	120
Thermomucor	SSHPLLERDASAASSTPAYDQEMSELAIPVEVGRPGQEFLLLFDTGS SDVWVSSPKCTTK	62
	. . : . . . : * . * * : * * * * . * * * : * * * * * * * * . * * * . .	
Rhizomucor	EGCVG-KRFFDPSSSSTFKETDYNLNI TYGTGGANGIYFRDSITVGGATVKQQTLAYVDN	179
Thermomucor	EGCVSGQHVYNSASSTYSPSKYEFEIT YGSGSDNGSYFVDQVTVANITLSKQIVAMVDD	122
	* * * . : : : * : * * * . . : * : * * * : * . * * * * . : * * . . * : : * : * * * :	
Rhizomucor	VSGPTAEQSPDSELFLDGIFGAAYPDNTAMEAEYGDYNTVHVNLKQGLISSPVFSVYM	239
Thermomucor	SAGTISDQSPSDQLIVDGVFGAGFPLGTAMYGKYNVTYPTVPQALYETKLIIPAPMFSVYM	182
	: * : * * * . . * : * * * * : * . * * * . * * * * * : * : * * : * * * * *	
Rhizomucor	NTN-----DGGGQVVS GGWNNTLLGGDIQYTDVLKS----RGGYFFWDAPVTGVKI	286
Thermomucor	GPVFADAASSSTTGSVVFVGGYDQSLNGGEIVYSDLVTSDIGDQKGVYEEWSILVPRIVI	242
	. . * * * * * : : * * * * * : * * * : * . * * * . * : *	
Rhizomucor	DGS---DAVSFDGAQAFITDGTNFFIAPSSFAEKVVKALPDATESQQGYTVPCSKYQ	342
Thermomucor	NQGQAGEHQLTFD-QEAFIIMDTG SNFVYIPEQDANALASALVPTFTRNGTFYEGDCAPYE	301
	: . . . : * * * : * * * : * * * : * * . * * : * * * * * * * * : * :	
Rhizomucor	DSKTTFSLVLQKSGSSSDTIDVSVPI SRMLLPVDKSGETCMFIVLPDGGNQFIVGNLFLR	402
Thermomucor	NSDITVVFHFQASSQSKGTVYITLPLHRLLRHVDSTGQTCLRSISTSSGSDYILGNVVLG	361
	: * * * * : * * * . . * * : : * * * * : * * * : * : . . * : * * * * * *	
Rhizomucor	FFVNVDYDFGKNRIGFAPLASGYENN 427	
Thermomucor	HFVTIFDFGNKRVGFAPVASS --- 382	
	. * * . : * * * : * * * * * * . * * .	

Fonte: Autoria própria

5.2 ANÁLISES *IN SILICO* DA PROTEASE

Análises *in silico* foram realizadas a fim de se obter características preditas sobre a protease foco deste trabalho. Conforme o programa ProtParam ExPasy, a enzima, em sua forma nativa, possui tamanho de 41 kDa, 382 aminoácidos e ponto isoelétrico teórico de 4,42, porém, com adição do sítio para TEV protease e a cauda

de histidina, o produto expresso predito possui massa molecular de aproximadamente 42kDa.

Salgado, Kangwa e Fernandez-Lahore (2013) em estudo de expressão heteróloga de uma protease coagulante de *Mucor circinelloides* em *P. pastoris* obtiveram uma enzima de 37 kDa. Proteases aspárticas produzidas por fungos têm um amplo espectro de massa molecular, chegando a variar entre 30-56 kDa.

As composições de aminoácidos e atômica da protease estão representadas na figura 6. A presença de cisteína na composição de enzimas pode levar a formação de pontes dissulfeto, o que pode conferir uma termoestabilidade mais elevada. A predição das características da enzima estudada aponta a formação de uma ponte dissulfeto entre as cisteínas localizadas na posição 297 e 341.

Figura 6. Composição de aminoácidos e composição atômica predita da protease clonada.

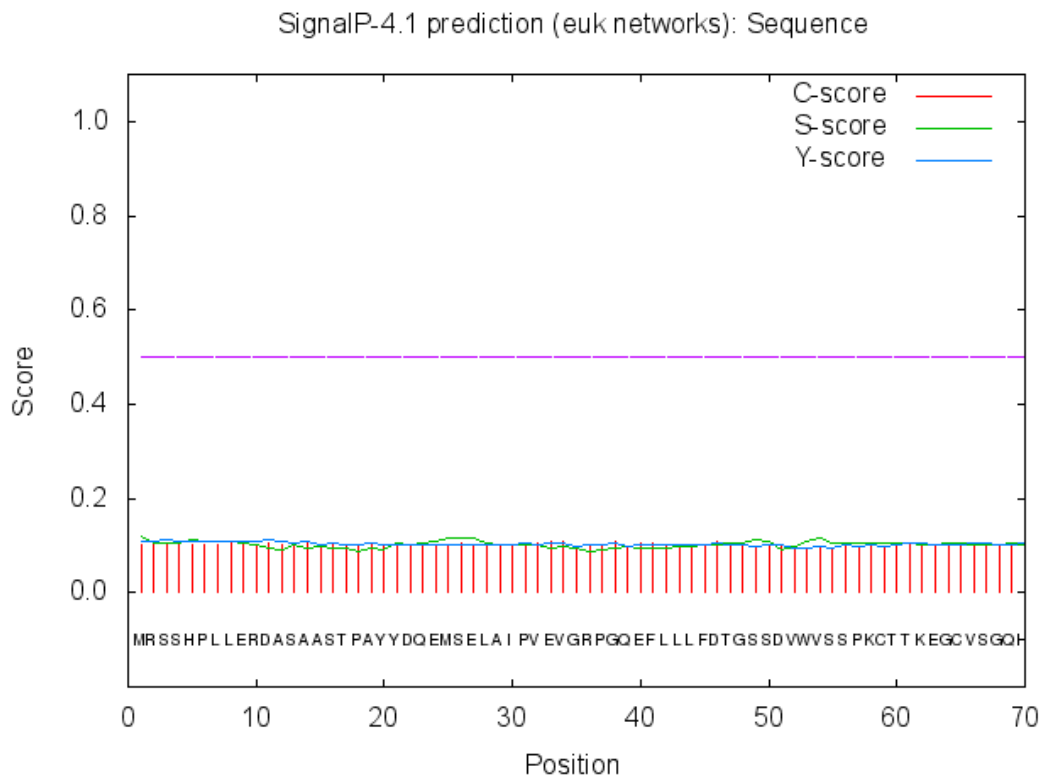
A			B		
Amino acid composition:			Atomic composition:		
Ala (A)	26	6.8%	Carbon	C	1828
Arg (R)	9	2.4%	Hydrogen	H	2766
Asn (N)	12	3.1%	Nitrogen	N	464
Asp (D)	24	6.3%	Oxygen	O	594
Cys (C)	4	1.0%	Sulfur	S	11
Gln (Q)	18	4.7%	Formula: $C_{1828}H_{2766}N_{464}O_{594}S_{11}$		
Glu (E)	17	4.5%	Total number of atoms: 5663		
Gly (G)	34	8.9%			
His (H)	7	1.8%			
Ile (I)	17	4.5%			
Leu (L)	25	6.5%			
Lys (K)	9	2.4%			
Met (M)	7	1.8%			
Phe (F)	20	5.2%			
Pro (P)	19	5.0%			
Ser (S)	49	12.8%			
Thr (T)	29	7.6%			
Trp (W)	2	0.5%			
Tyr (Y)	21	5.5%			
Val (V)	33	8.6%			
Py1 (O)	0	0.0%			
Sec (U)	0	0.0%			
(B)	0	0.0%			
(Z)	0	0.0%			
(X)	0	0.0%			

Fonte: Autoria própria

5.3 CONSTRUÇÃO DOS VETORES PARA EXPRESSÃO EM *E. coli* E *P. pastoris*

Após a verificação da similaridade entre as duas proteases, vetores para a expressão foram construídos. Para isso, foi verificado se a sequência continha a presença de peptídeo sinal. Essa análise foi realizada utilizando o programa SignalP 4.0 Server (figura 7).

Figura 7. Análise de peptídeo sinal da protease de *T. Indicae-seudaticae* obtido pelo programa SignalP 4.0 Server.



Fonte: Autoria própria

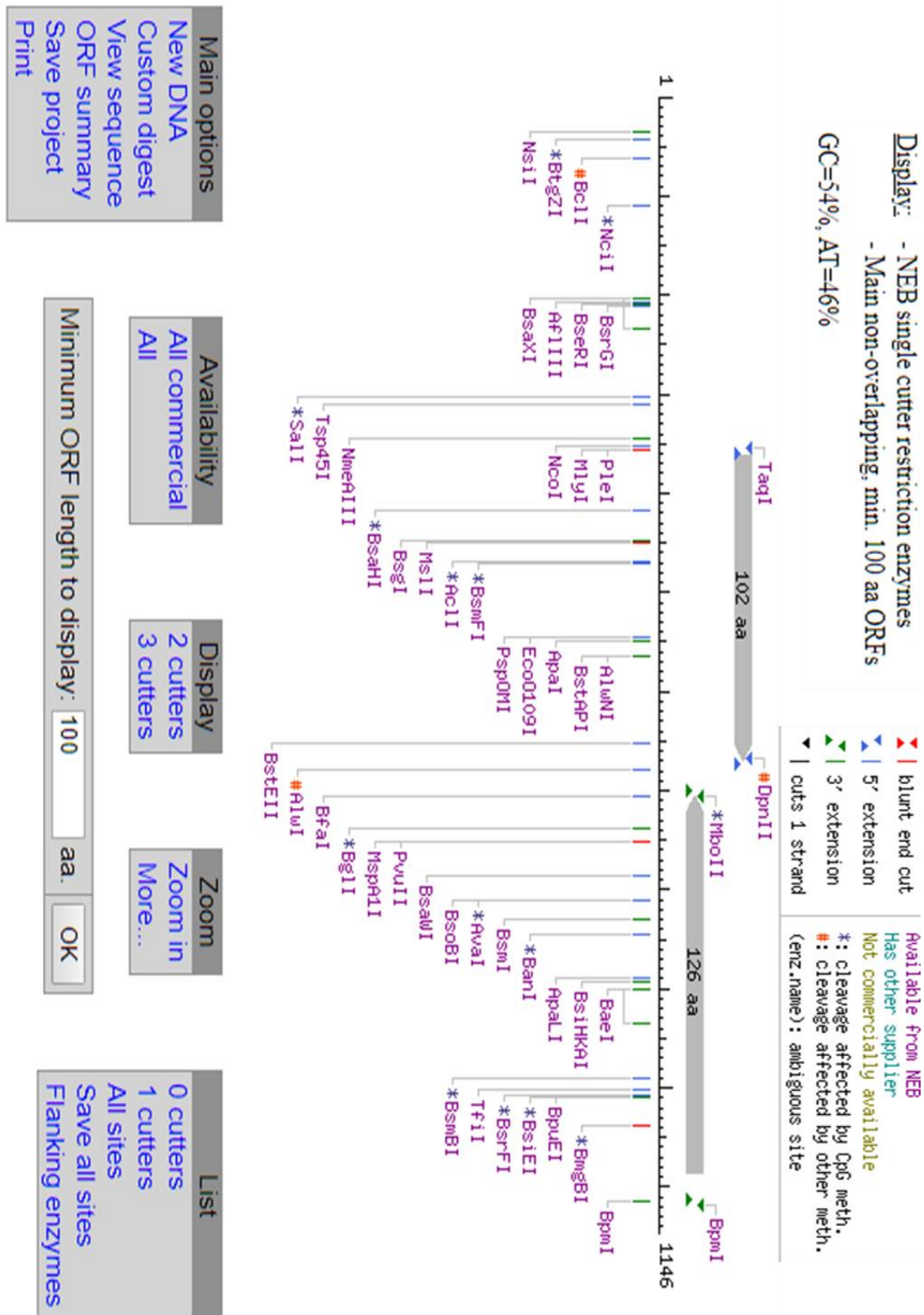
A análise de verificação de peptídeo sinal, de acordo com a figura 6 demonstrou ausência do mesmo, sendo assim, a sequência original foi mantida para a construção dos vetores.

Para a expressão em *E. coli*, foi utilizado o vetor pET28a (+). Este plasmídeo permite a expressão de proteínas em grande quantidade. Sua principal característica é a presença do gene *lac1*, que codifica a proteína repressora *lac*, promotor T7, cuja especificidade se dá para a T7 RNA polimerase (ausente em genomas procariotos),

operador *lac*, utilizado no bloqueio da transcrição, um sítio de clonagem, caracterizado por diversas endonucleases de restrição, uma origem de replicação e um gene de resistência a antibiótico, como por exemplo, a canamicina.

O gene que codifica a protease, ProTiN31, foi ligado no sítio de múltipla clonagem. Para isso, foi necessária realizar uma verificação de quais enzimas de restrição utilizar e que não interferissem na sequência de interesse. Isso foi feito com auxílio do programa Ncbutter. O resultado está apresentado na figura 8.

Figura 8. Análise de endonucleases de restrição que fragmentam a sequência da protease de *T. Indicae seudaticae* obtida pelo programa Ncbutter.



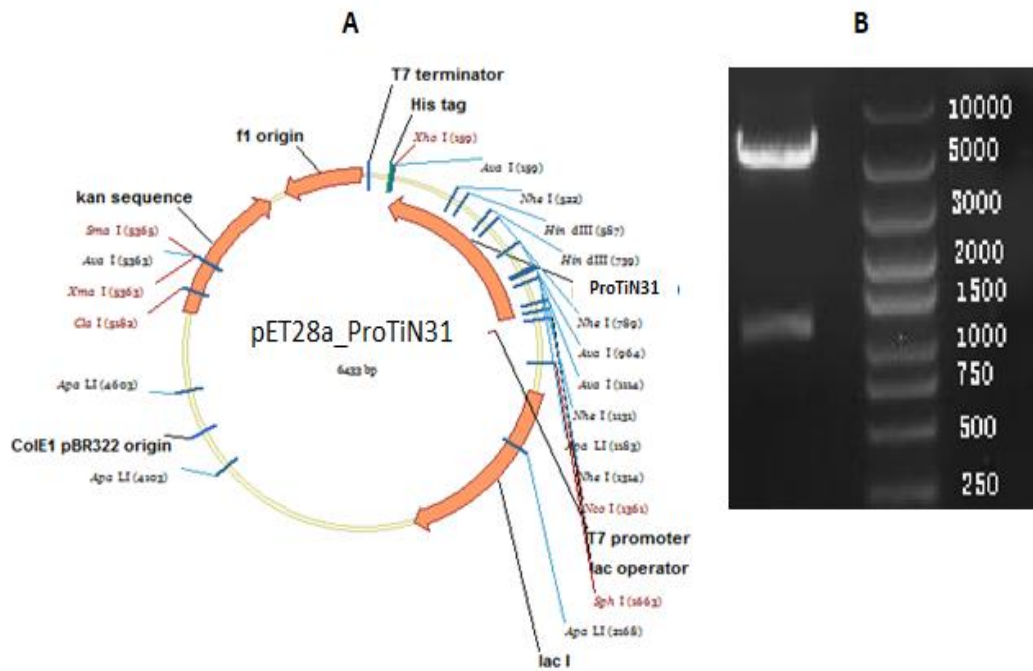
Fonte: Autoria própria

Conforme descrito anteriormente, a etapa de clonagem e ligação ao vetor foi realizada pela empresa Biomatik®. Adicionalmente, foram inseridas na porção N-terminal, a sequência codificadora de uma cauda de histidina, para futura purificação da enzima recombinante e uma sequência codificadora para sítio de reconhecimento para TEV protease, cuja função posterior é a remoção desta cauda de histidina.

O vetor pET28a_ProTiN31 está apresentado na figura 9. Sua digestão com as enzimas *NcoI* e *NotI*, foi realizada para confirmação da ligação do inserto de interesse (figura 9B), demonstrando que a ligação foi realizada com sucesso, uma vez que, após a digestão, o inserto foi liberado. No total, o plasmídeo possui um tamanho de 6.433 pares de base.

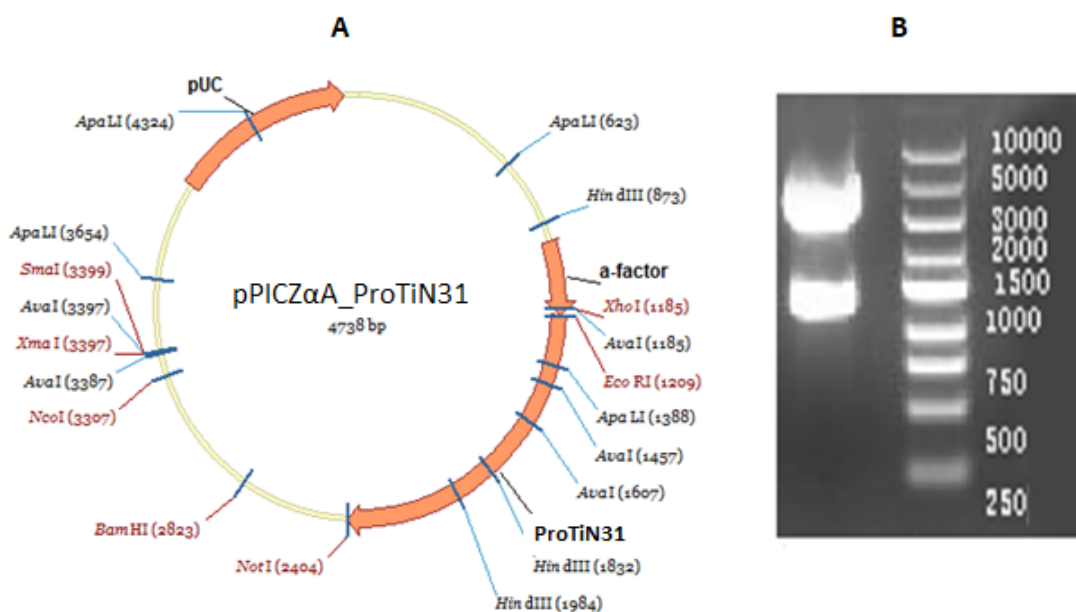
Para a expressão em *P. pastoris* foi construído o vetor pPICZαA_ProTiN31. As endonucleases de restrição utilizadas para inserção no sítio de clonagem foram *EcoRI* e *NotI*. Para a confirmação da ligação do inserto, foi realizada a digestão com as mesmas enzimas (Figura 10), mostrando assim a validade do processo. Este vetor apresenta um tamanho de 4.738 pares de base.

Figura 9. Representação esquemática do vetor pET28a_ProTiN31 em *E. coli*. A: Mapa do vetor; B: Eletroforese da digestão do vetor com as enzimas de restrição *NcoI* e *NotI*.



Fonte: Imagens fornecidas pela empresa Biomatik®.

Figura 10. Representação esquemática do vetor pPICZ α A_ProTiN31 em *P. pastoris*. A: Mapa do vetor; B: Eletroforese da digestão do vetor com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*.

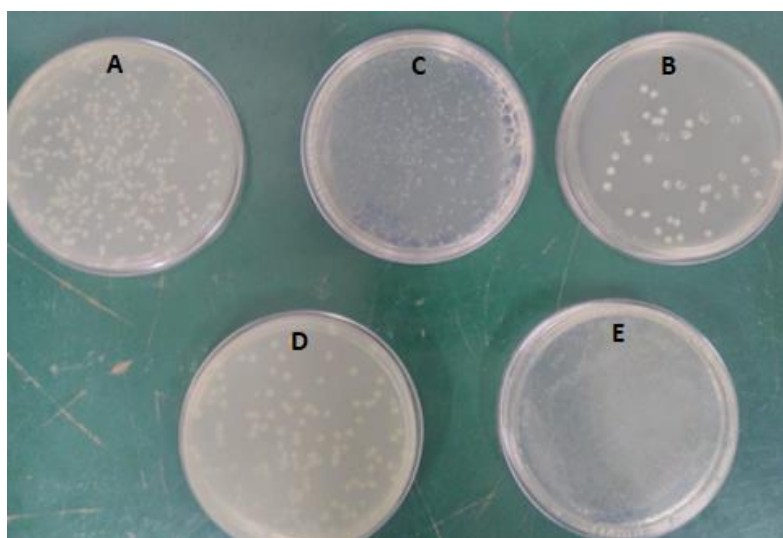


Fonte: imagens fornecidas pela empresa Biomatik

5.4 TRANSFORMAÇÃO EM LINHAGENS COMPETENTES DE *E. coli* PARA EXPRESSÃO

O vetor pET28a_ProTiN31 foi inserido em cinco linhagens de células competentes de *E. coli*. A transformação está apresentada na figura 11.

Figura 11. Células de *E. coli* transformadas com o vetor pET28a_ProTiN31. A: Artic Express 1; B: BL21; C: Origami 3; D: pRARE, E: Rosetta-gami.

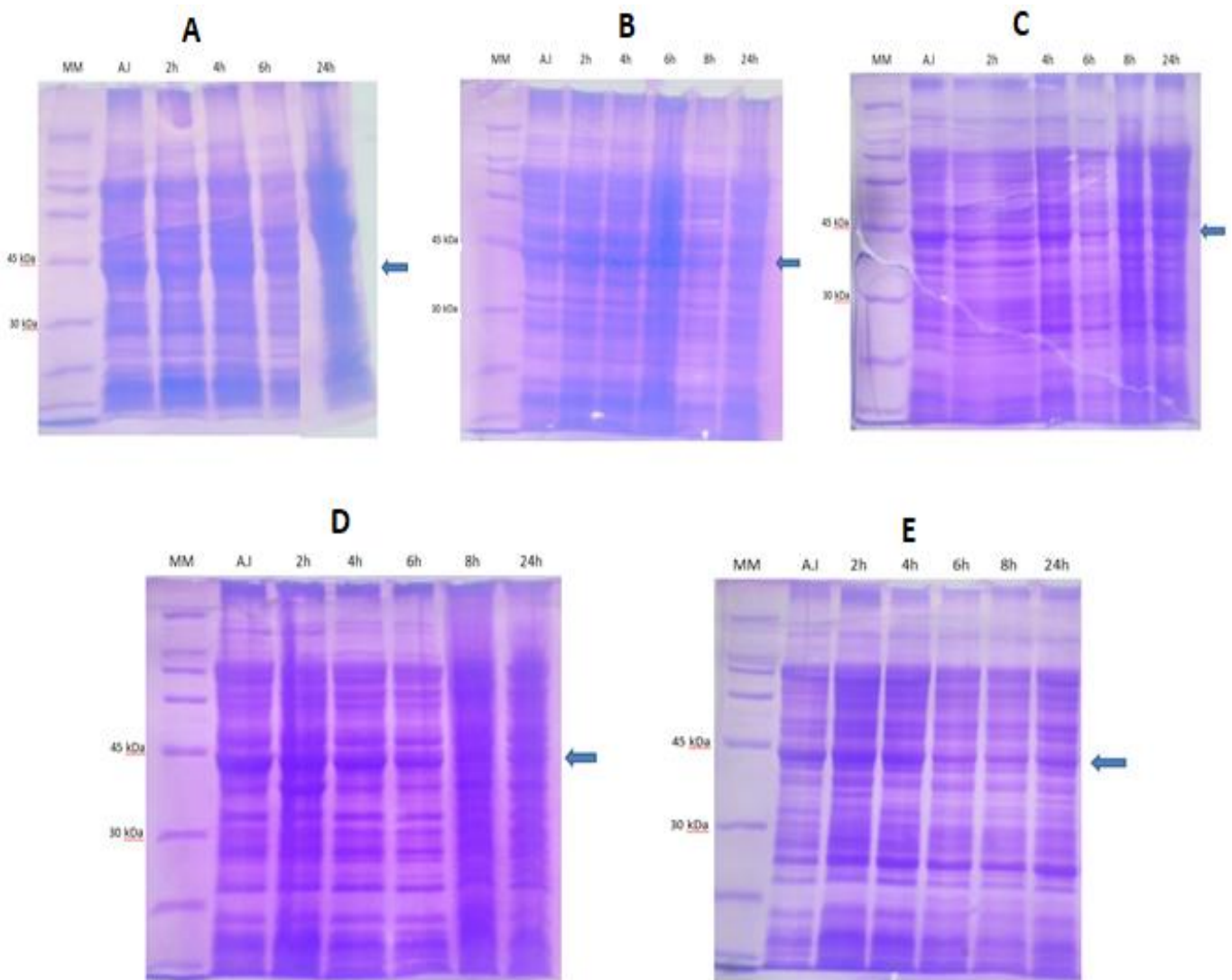


Fonte: Autoria própria

5.5 ENSAIOS DE EXPRESSÃO

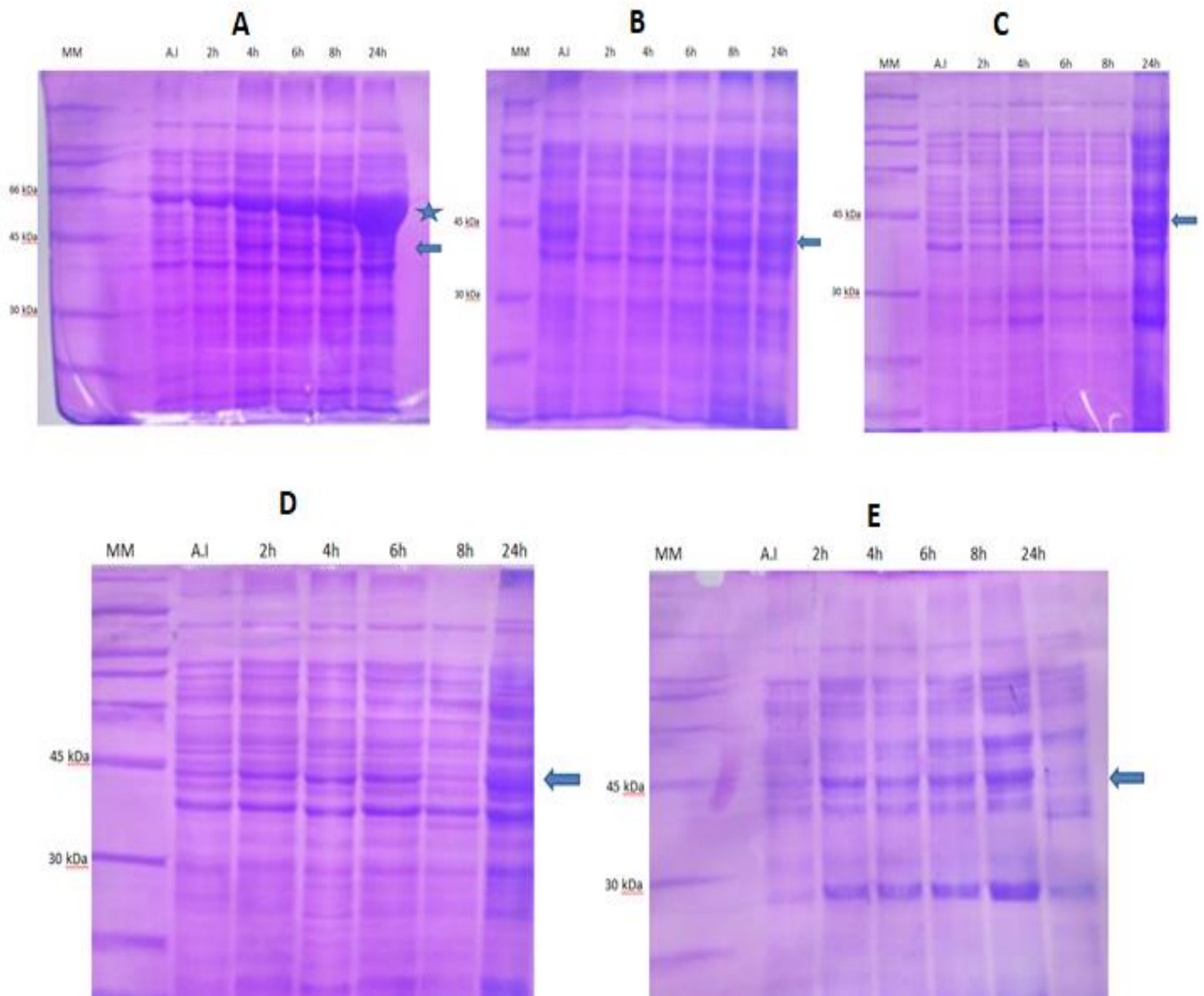
As células transformadas de *E. coli* foram submetidas aos ensaios de expressão. O primeiro teste foi realizado a 20 °C após a indução da expressão com 0,05 mmol de IPTG e analisado em eletroforese SDS Page 10%, tanto a fração insolúvel (Figura 12), quanto a solúvel (Figura 13). Em cada ensaio também foram observados a indução quanto ao tempo de exposição ao indutor.

Figura 12. Perfil de expressão da fração insolúvel de linhagens de *E. coli* induzidas com 0,05 mmol de IPTG ao longo do tempo sob temperatura de 20 °C. A: Artic Express, B: BL21, C: Origami, D: pRARE e E: Rosetta-gami; MM: marcador molecular; A.I: expressão antes da indução com IPTG; 2h: expressão após 2 horas; 4h: expressão após 4 horas; 6h: expressão após 6 horas; 8h: expressão após 8 horas; 24h expressão *overnight*; flecha indica a possível posição da proteína expressa; flecha indica a possível posição da proteína expressa.



Fonte: Autoria própria

Figura 13. Perfil de expressão da fração solúvel de linhagens de *E. coli* induzidas com 0,05 mmol de IPTG ao longo do tempo sob temperatura de 20 °C. A: Artic Express, B: BL21, C: Origami, D: pRARE e E: Rosetta-gami; MM: marcador molecular; A.I: expressão antes da indução com IPTG; 2h: expressão após 2 horas; 4h: expressão após 4 horas; 6h: expressão após 6 horas; 8h: expressão após 8 horas; 24h expressão *overnight*; flecha indica a possível posição da proteína expressa. Estrela indica banda superexpressa.



Fonte: Autoria própria

Em todos os ensaios de expressão, independente da fração, foi possível observar um aumento discreto no tamanho das bandas conforme o aumento do tempo após a indução com IPTG, na faixa logo abaixo do marcador de peso molecular de 45 kDa. A proteína recombinante é predita com peso molecular de

aproximadamente 42 kDa, o que se pode supostamente inferir ser a expressão da enzima desejada neste estudo.

A promoção da expressão heteróloga tem o objetivo de obter a proteína recombinante em grandes quantidades, através de uma superexpressão. Porém, neste trabalho não se apresenta uma expressão muito evidente. Este fato também foi observado ao se tentar a expressão heteróloga de protease aspártica no trabalho de Yang e colaboradores (2013).

A expressão parece ser um pouco mais elevada na fração insolúvel, quando comparada com a fração solúvel, independente da linhagem. Na literatura, encontram-se relatos no problema de expressão em que se ocorre a formação de corpos de inclusão, consistindo assim, em um grande desafio na expressão heteróloga em procariotos (YIN et al., 2008).

Corpos de inclusão são formados quando há falta de chaperonas para a correta montagem e conformação da proteína expressa, ou ainda, quando a proteína é tóxica para a célula hospedeira (MARCO et al., 2007). Uma maneira de contornar essa barreira é a indução da expressão em temperaturas mais baixas, o que corrobora com os testes realizados neste trabalho, onde na expressão a 20 °C aparentemente há uma expressão maior em fração solúvel.

Outra forma de tentar se obter proteínas recombinantes na sua forma solúvel é a co-transformação das células hospedeiras com plasmídeos adicionais, como no caso da linhagem pRARE, que possui um plasmídeo adicional característico da própria célula, o qual auxilia a tradução de códons raros de eucariotos que podem não ser reconhecidos por linhagens procariotas.

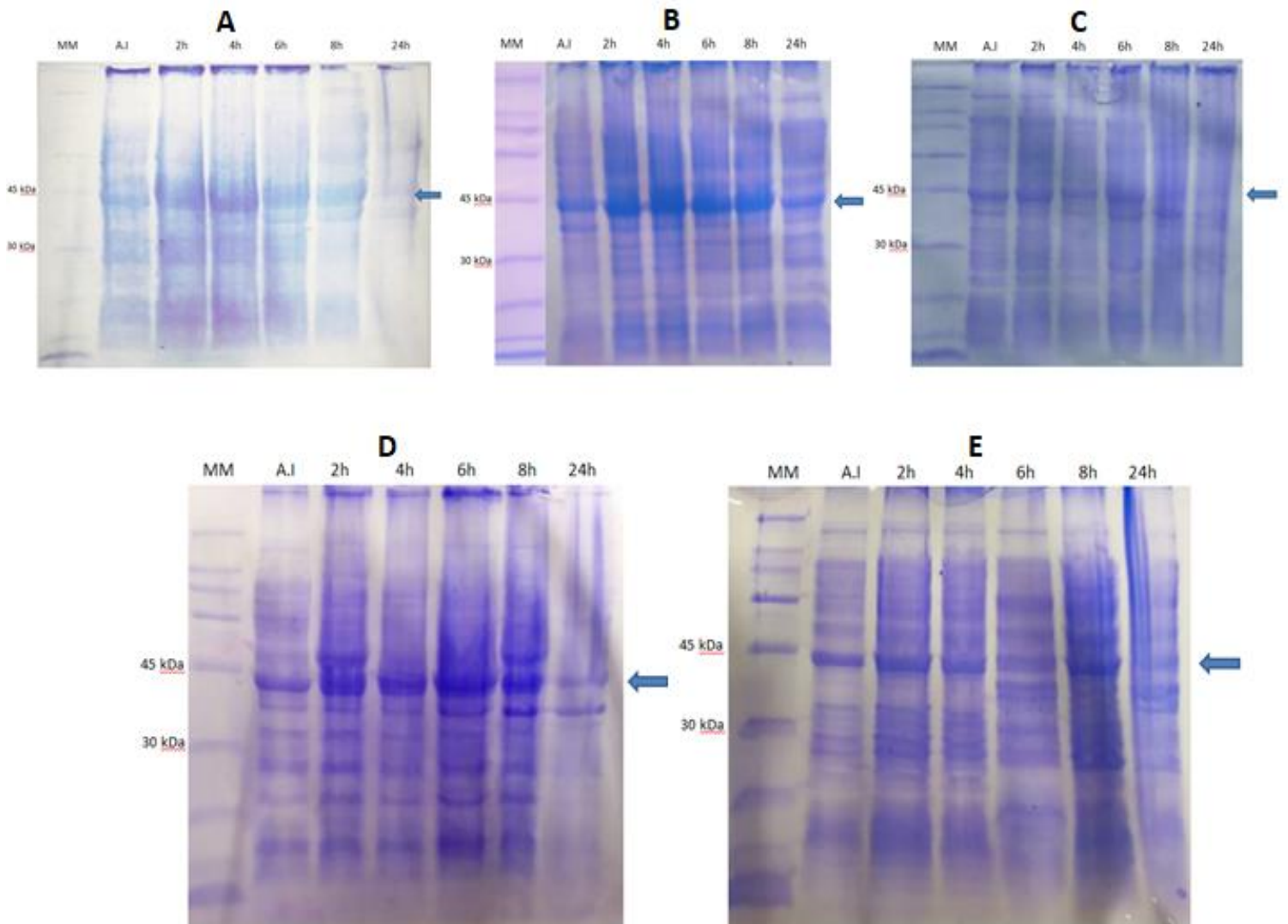
Ainda tentando melhorar a eficiência na solubilização das proteínas expressas, há disponíveis linhagens que possuem a capacidade de superexpressar chaperonas, cuja função é montar as proteínas de forma correta. Esta superexpressão pode ser observada na figura 13A indicada pela estrela. Estas chaperonas podem apresentar peso molecular de aproximadamente 60 kDa e geralmente são mais expressas do que a proteína recombinante desejada (BELVAL et al., 2015). Além disso, os mesmos autores relatam essa co-expressão como um problema, uma vez que elas são caracterizadas como contaminação em processos de purificação das proteínas recombinantes, sendo necessários passos adicionais para a remoção dessas chaperonas.

Ensaio de indução da expressão em 37 °C também foram realizados e analisadas tanto as frações insolúveis (Figura 14) quanto as solúveis (Figura 15).

O perfil da expressão das frações insolúveis de todas as linhagens testadas parece similar. É bem visível uma notável expressão mesmo sem a indução com o IPTG, porém a célula mesmo sem a indução pode ter um nível de expressão basal, como o observado na figura. Entretanto, há um singelo aumento na expressão após a indução.

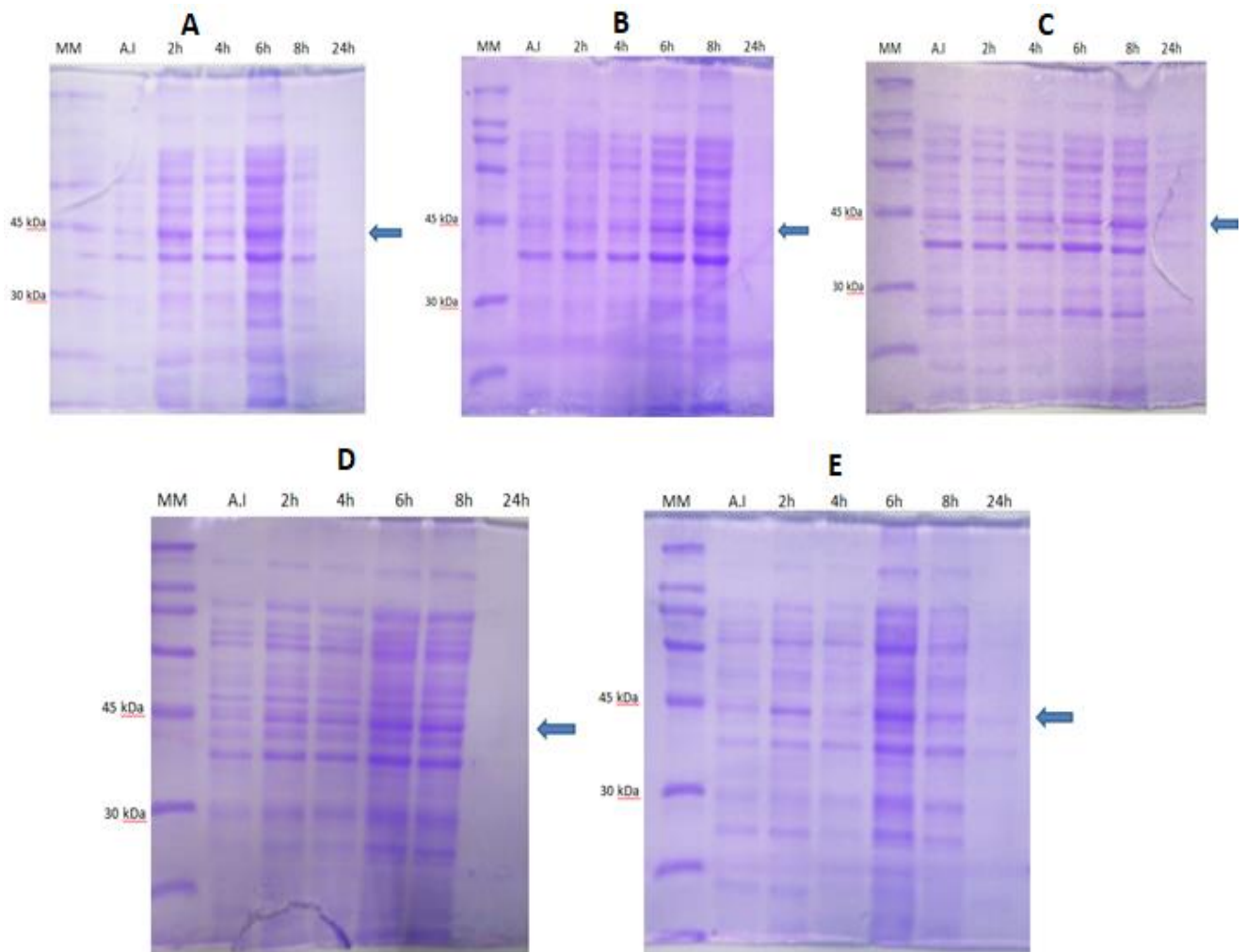
Na linhagem Artic Express, a expressão máxima parece ocorrer no tempo de 4 horas, o que parece similar com a expressão na fração solúvel, quando realizada sob temperatura de 20 °C. Já nos tempos em que a expressão foi *overnight*, observa-se uma diminuição da quantidade de enzima produzida, o que pode indicar que por mais que esteja em corpos de inclusão, a enzima heteróloga é degradada.

Figura 14. Perfil de expressão da fração insolúvel de linhagens de *E. coli* induzidas com 0,05 mmol de IPTG ao longo do tempo sob temperatura de 37 °C. A: Artic Express, B: BL21, C: Origami, D: pRARE, E: Rosetta-gami MM: marcador molecular; A.I: expressão antes da indução com IPTG; 2h: expressão após 2 horas; 4h: expressão após 4 horas; 6h: expressão após 6 horas; 8h: expressão após 8 horas; 24h expressão *overnight*; flecha indica a possível posição da proteína expressa.



Fonte: Autoria própria

Figura 15. Perfil de expressão da fração solúvel de linhagens de *E. coli* induzidas com 0,05 mmol de IPTG ao longo do tempo sob temperatura de 37 °C. A: Artic Express, B: BL21, C: Origami, D: pRARE, E: Rosetta-gami MM: marcador molecular; A.I: expressão antes da indução com IPTG; 2h: expressão após 2; 4h: expressão após 4 horas; 6h: expressão após 6 horas; 8h: expressão após 8 horas; 24h expressão *overnight*; flecha indica a possível posição da proteína expressa.



Fonte: Autoria própria

Assim como na indução da expressão à 20 °C, a fração solúvel da expressão à 37 °C apresenta expressão inferior, quando comparada à fração insolúvel.

A indução da expressão a 37 °C apresentou melhor produção da enzima recombinante em fração insolúvel, quando comparada a indução a 20 °C da mesma

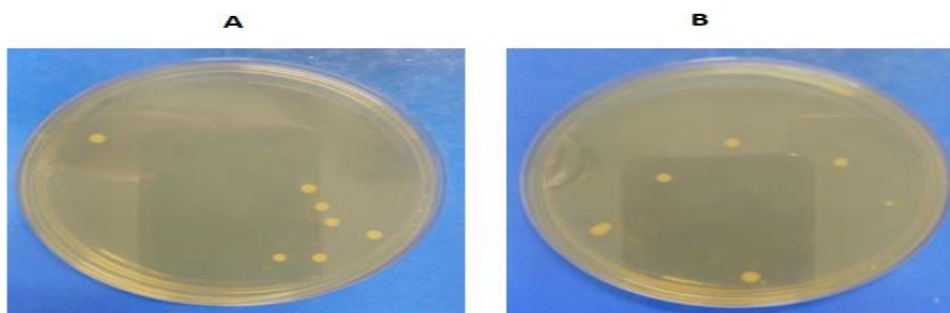
fração. Este fato pode ser devido a temperatura ser a qual a célula bacteriana apresenta melhor faixa para sua manutenção e crescimento.

Em expressão *overnight*, é possível observar que qualquer produto expresso ou apresenta-se em pouca quantidade, ou já foi degradado conforme o tempo.

5.6 TRANSFORMAÇÃO EM LINHAGENS COMPETENTES PARA EXPRESSÃO EM *P. pastoris*

O vetor pPICZ α A_ProTiN31 foi inserido em duas linhagens de células competentes de *P. pastoris*: X33 e KM71. A transformação está apresentada na figura 16.

Figura 16. Células de *P. pastoris* transformadas com o vetor pPICZ α A_ProTiN31. A: Linhagem X33 1; B: Linhagem KM71



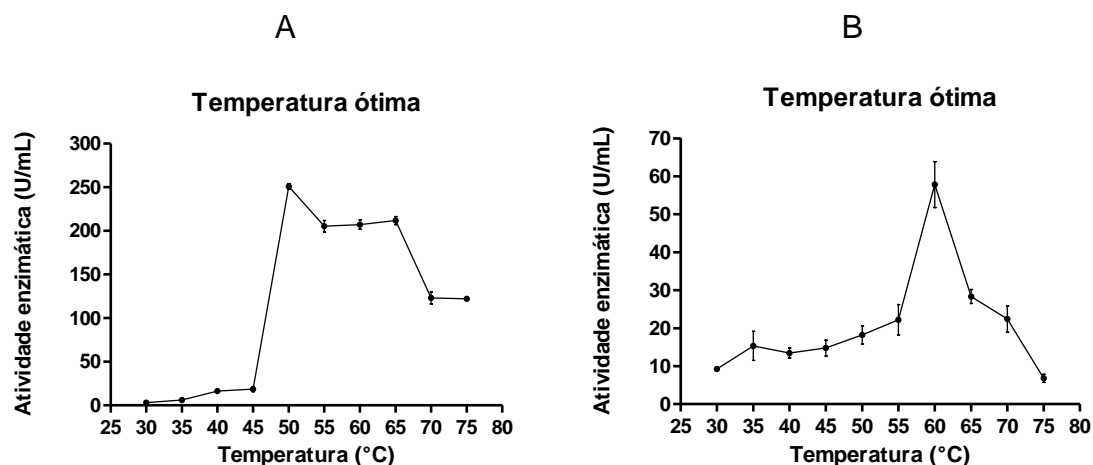
Fonte: Autoria própria

5.7 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ENZIMAS RECOMBINANTES

5.7.1 TEMPERATURA ÓTIMA

Para a determinação da temperatura ótima da atividade proteolítica das enzimas recombinantes expressas tanto em *E. coli*, quanto em *P. pastoris*, foram testadas as temperaturas de reação de 30 à 75 °C com intervalo de 5 °C entre cada. Os resultados estão apresentados na figura 17.

Figura 17. Temperatura ótima da atividade proteolítica da protease expressa em procarioto e eucarioto. A: protease de *E. coli*; B: protease de *P. pastoris*



Fonte: Autoria própria

Como pode ser observado, a temperatura ótima da atividade proteolítica da protease produzida por *E. coli* é de 50 °C, onde obteve-se uma atividade de 250,89 U mL⁻¹, enquanto que a temperatura ótima da protease de *P. pastoris* foi de 60 °C que apresentou uma atividade de 57,82 U mL⁻¹. O valor elevado da atividade proteolítica da protease produzida por *E. coli* pode estar relacionado ao fato de ser produto de lise celular, onde encontram-se diversas proteínas, enquanto que *P. pastoris* é resultado de produto extracelular, onde o nível de proteínas nativas é muito baixo (SUN et al., 2013)

É reportado na literatura diversas proteases aspárticas expressas heterológicamente em *P. pastoris*, porém com nível de expressão baixo, como por exemplo a protease aspártica produzida por *Trichoderma arperellum*, que apresentou atividade proteolítica de 18,5 U mL⁻¹ (YANG et al., 2013)

Diferente deste trabalho, uma protease aspártica de *Metschnikovia reukafii* expressa em *E. coli* apresentou temperatura ótima de atuação em 40 °C (LI; CHI; WANG, 2010).

Semelhante a este trabalho, uma protease aspártica produzida por *Mucor circinelloides* expressa heterológicamente em *P. pastoris* também apresentou temperatura ótima de 60 °C (SALGADO; KANGWA; FERNANDEZ-LAHORE, 2013). Enquanto que no trabalho de Sun e colaboradores uma protease aspártica

produzida por *Rhizomucor miehei* apresentou temperatura ótima de 55 °C quando expressa também em *P. pastoris*.

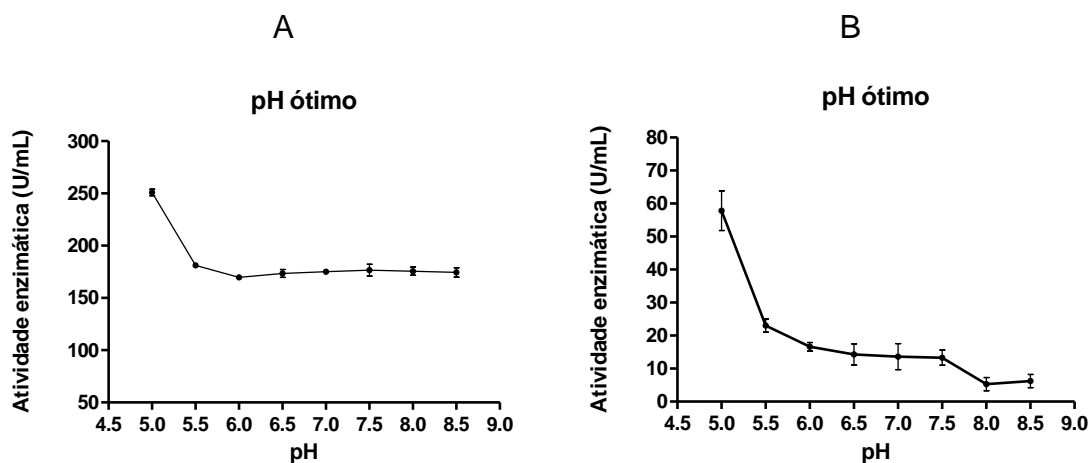
A diferença na condição de temperatura ótima das enzimas se deve ao fato de *P. pastoris*, como um organismo eucarioto, possuir mecanismos de modificações pós traducionais de proteínas produzidas, como a glicosilação, formação de pontes de dissulfeto, etc. Este fato permite que a enzima tenha maior estabilidade em temperaturas mais elevadas o que pode ter contribuído para sua mais elevada temperatura ótima em relação a enzima expressa por *E. coli* (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012).

5.7.2 pH ÓTIMO

Uma vez determinada a temperatura ótima, foi testado o melhor pH na atividade enzimática da enzima produzida por ambos os hospedeiros. Para isso, variou-se o tampão e a solução de caseína em diferentes valores de pH de 5,0 a 8,5 0,2M com intervalo de 0,5 cada. Devido ao ponto isoelétrico da enzima predito ser 4,42, abaixo do pH 5,0 não foi possível determinar a estabilidade, uma vez que a enzima se precipita na presença do tampão.

O pH ótimo da atividade enzimática está representado na figura 18.

Figura 18. pH ótimo da atividade proteolítica da protease expressa em procaríoto e eucarioto. A: Protease de *E. coli*; B: protease de *P. pastoris*



Fonte: Autoria própria

Foi em pH 5,0 que se obteve a maior atividade proteolítica para a enzima produzida pelos dois hospedeiros. Este fato corrobora com a classe que a protease pertence, ou seja, as proteases aspárticas, uma vez que seu pH ótimo é ácido. Fan e colaboradores (2012) também obtiveram o mesmo resultado no que diz respeito ao pH ótimo de atuação da mesma enzima expressa em diferentes hospedeiros, onde a enzima expressa tanto em *E. coli* quanto por *P. pastoris* apresentou igual pH ótimo. Portanto, pode-se inferir que o tipo de hospedeiro parece não afetar essa característica bioquímica das enzimas expressas de forma heteróloga.

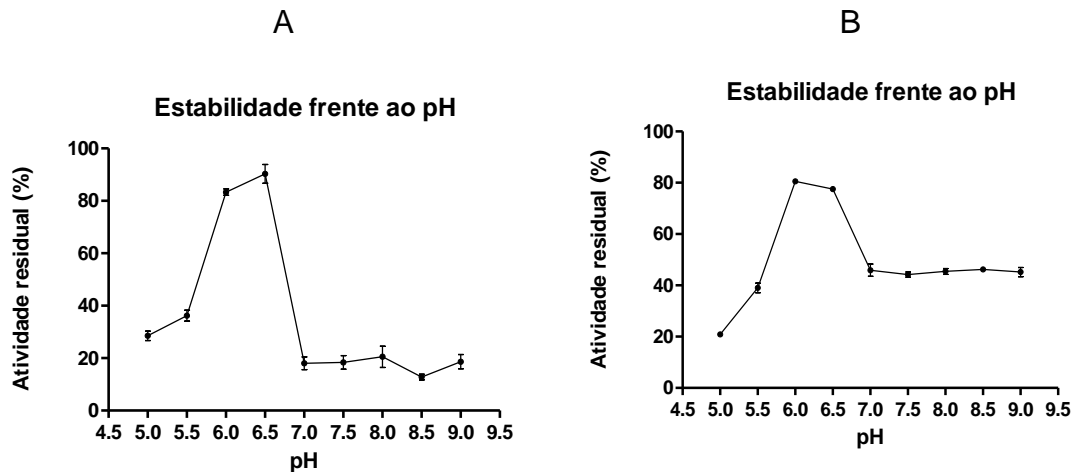
No trabalho de Yang e colaboradores (2013), foi observado o pH ótimo de 4,0 na atividade proteolítica da protease aspártica produzida por *T. asperellum* expressa em *P. pastoris*. Diversas peptidases aspárticas expressas de maneira heteróloga apresentaram pH ótimo entre as faixas de 3,4 a 6,0. C (SALGADO; KANGWA; FERNANDEZ-LAHORE, 2013; SUN et al., 2018).

5.7.3 ESTABILIDADE FRENTE AO pH

Para determinar a estabilidade da enzima sob exposição em diferentes valores de pH, o extrato enzimático foi incubado em presença de tampão na faixa de pH 5,0-9,0 de pH durante 24 horas a 4 °C. Após esse período, a atividade enzimática residual foi determinada nas condições ótimas de atuação da enzima, ou seja, pH 5,0 sob temperatura de 50 °C para *E. coli* e pH 5,0 sob temperatura de 60 °C para *P. pastoris*. Os resultados estão apresentados na figura 19.

Como pode ser observado, as enzimas apresentam comportamento semelhante, onde apresentam alta estabilidade apenas em pH ácido próximo ao neutro, entre 6,0 e 6,5, com uma atividade residual maior que 75%. A partir do pH 7,0 a enzima tem uma redução na sua estabilidade, porém não perde totalmente sua atividade. O mesmo fato foi constatado por Li, Chi e Wang (2008) em trabalho com expressão de protease aspártica em *E. coli* onde a enzima teve perda significativa da sua atividade residual a partir do pH 7,0. Já trabalho de Sun e colaboradores (2018), a protease expressa por *P. pastoris* apresentou estabilidade entre os pHs 5,0 e 8,0.

Figura 19. Estabilidade da protease expressa por procaríoto e eucarioto incubada em diferentes valores de pH por 24 horas à 4 °C. A: protease expressa por *E. coli*; B: protease expressa por *P. pastoris*

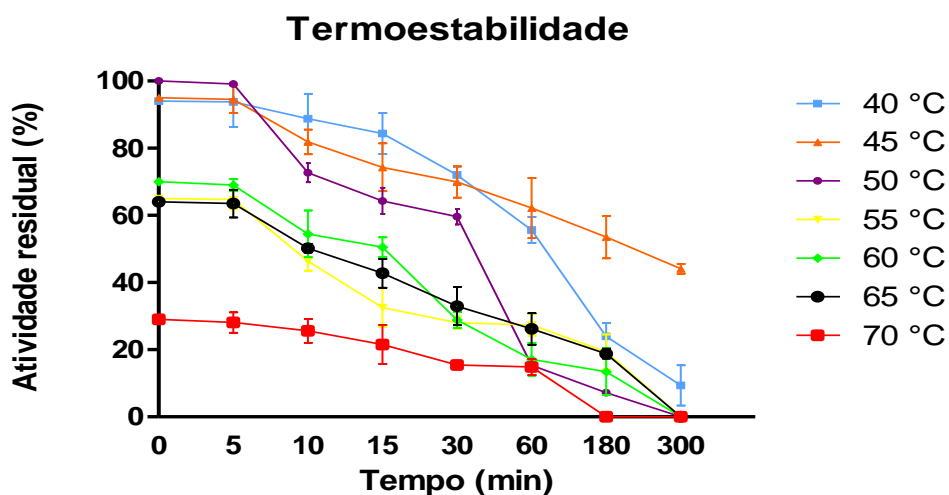


Fonte: Autoria própria

5.7.4 TERMOESTABILIDADE

A fim de observar o comportamento das proteases expressas, as mesmas foram expostas de 0 à 5 horas sob diferentes temperaturas entre as faixas de 40 a 70 °C com intervalo de 5 °C entre cada. Posteriormente a atividade residual foi determinada na temperatura ótima da enzima expressa por cada hospedeiro. A termoestabilidade da enzima expressa por *E. coli* está representada na figura 20 e da enzima expressa por *P. pastoris* na figura 21.

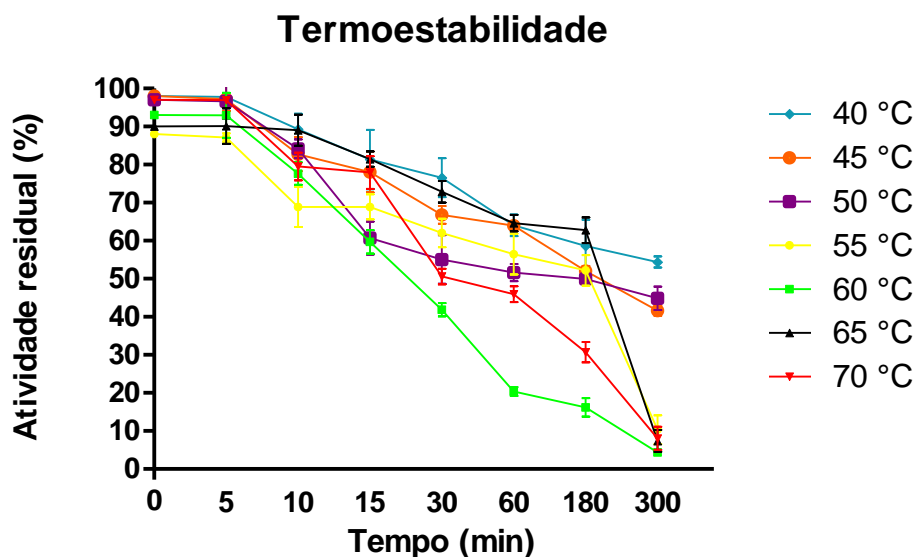
Figura 20. Atividade residual determinada em 50 °C da protease expressa por *E. coli* incubada em diferentes tempos sob diferentes temperaturas.



Como pode ser observada na figura, a enzima apresenta uma atividade residual de aproximadamente 80% até 30 minutos de exposição nas temperaturas de 40 °C e 45 °C, onde perde gradativamente sua atividade ao longo do tempo. Nas temperaturas acima da sua condição ótima de atuação, ou seja, 50 °C, é observado de imediato, uma redução de 30% de sua atividade residual, demonstrando assim, a enzima não suportar ser exposta à altas temperaturas por muito tempo.

Em trabalho similar na expressão de uma protease aspártica em *E. coli*, também foi observado que a enzima apresentou ótima termoestabilidade em 30 minutos sob 40 °C. Acima dessa temperatura, uma redução da atividade residual também foi detectada e assim como nesse trabalho, mesmo com uma redução drástica, ainda foi observada atividade à 70 °C por 30 minutos. (LI; CHI; WANG, 2008).

Figura 21. Atividade residual determinada em 60 °C da protease expressa por *P. pastoris* incubada em diferentes tempos sob diferentes temperaturas.



Fonte: Autoria própria

Ao observar a figura 21, é evidente que a enzima expressa por eucarioto apresenta uma maior termoestabilidade, quando comparada com a enzima expressa pelo hospedeiro procarioto. Em 65 °C por 3 horas a protease ainda apresenta uma atividade residual de cerca de 70%. Em 5 horas exposta em temperaturas abaixo da

condição ótima de atuação (60 °C), a enzima ainda retém mais de 50 % da sua atividade residual.

Conforme anteriormente citado, a enzima expressa por *P. pastoris* provavelmente pode ser glicosilada, em relação à protease expressa por *E. coli*, o que explica o fato de ser mais termoestável e suportar ser exposta a maiores períodos sob altas temperaturas e ainda manter atividade residual satisfatória.

Em estudo sobre o efeito da glicosilação na atividade de protease aspártica produzida por *Aspergillus glaucus* MA0196, foi observada diferença significativa na termoestabilidade entre enzima glicosilada e não glicosilada (LIM et al., 2018).

Assim, sugere-se que em aplicação industrial onde se requer altas temperaturas, a enzima expressa por *P. pastoris* seja mais adequada, do que a expressa por *E. coli*.

5.7.5 EFEITO DE ÍONS E SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A fim de estabelecer o efeito de íons e outras substâncias na atividade proteolítica, a enzima foi encubada separadamente com 5 mM dos íons Fe, Ni, Ca, Ba, K, Mg, Mn, Zn e Hg e nas substâncias: pepstatina A, EDTA, β-mercaptoetanol e SDS por 5 minutos e posteriormente a atividade residual foi determinada nas condições ótimas da enzima de cada hospedeiro produtor. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

Como pode ser observado, nenhum íon exerceu efeito ativador na atividade enzimática, mostrando assim que a enzima é independente de co-fator para sua catálise. Contrariamente, o íon que exerceu maior influência na redução da atividade enzimática foi Hg, para ambos os hospedeiros.

Kshirsagar et al. (2015) reportaram também uma considerável inibição de atividade enzimática por Hg. Este íon é um metal pesado, que se liga fortemente a grupos sulfidríla e pode modificar covalentemente resíduos de aminoácidos, em particular, cisteína, promovendo a inibição enzimática devido a desestabilização da estrutura molecular (BASTAWDE, 1992).

Como era esperado, a pepstatina A inibiu 100% a atividade da enzima, o que reforça e comprova que a enzima expressa realmente é uma protease aspártica.

Resultados similares foram reportados pela protease expressa em *P. pastoris* no trabalho de Sun et al., (2018).

A substância β -mercaptoetanol também demonstrou forte inibição da atividade proteolítica, promovendo uma redução maior que 90% na atividade. Este fato também foi reportado por uma protease aspártica produzida por *Talaromyces leycettanus* JCM12802 expressa em *P. pastoris* (Guo et al., 2019). β -mercaptoetanol é uma substância redutora que age nas pontes dissulfeto, reduzindo-as, o que pode levar a inibição enzimática.

Tabela 2. Efeito de 5 mM de íons e substâncias na atividade proteolítica residual das proteases produzidas por *E. coli* e *P. pastoris*.

Ion ou Substância	Atividade residual (%)	
	Hospedeiro produtor	
	<i>E. coli</i>	<i>P. pastoris</i>
Controle	100,00 \pm 2,09	100,00 \pm 1,88
FeCl ₃	99,51 \pm 6,53	97,62 \pm 5,85
NiCl ₂	94,42 \pm 7,34	95,40 \pm 7,89
CaCl ₂	94,10 \pm 1,71	90,90 \pm 3,46
BaCl ₂	91,67 \pm 6,88	95,29 \pm 4,98
KCl	86,23 \pm 3,98	84,18 \pm 6,71
MgCl ₂	78,75 \pm 3,61	83,56 \pm 7,19
MnCl ₂	77,27 \pm 4,26	87,02 \pm 4,73
ZnCl ₂	68,53 \pm 3,26	73,83 \pm 5,44
HgCl ₂	23,55 \pm 3,05	18,86 \pm 4,20
Pepstatina A	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
EDTA	96,6 \pm 2,94	92, \pm 6,09
β -mercaptoetanol	2,64 \pm 1,59	7,93 \pm 1,24
SDS	84,5 \pm 0,91	90,56 \pm 3,57

Fonte: Autoria própria

5.8 ATIVIDADE COAGULANTE

Para avaliar a atividade específica da enzima, ou seja, a atividade coagulante, o extrato foi incubado em leite desnatado na presença de 0,01 mol/L. A reação foi testada em diferentes temperaturas entre 30 °C e 70 °C por 24 horas, porém não foi detectado a formação de coágulo no leite.

Estudos mais aprofundados devem ser realizados para entender porque esta atividade não ocorreu.

Há relatos na literatura de proteases aspárticas que são produzidas como zimogênios, ou seja, são sintetizadas na forma de precursores inativos que necessitam de algum tipo de transformação para terem sua eficiência catalítica ativada (LUFRAÑO et al., 2012). Essa ativação pode ser uma mudança de pH, que ioniza seu sítio catalítico, pode ser a remoção de alguns peptídeos por ação de outras proteases, etc. (SIMÕES e FARO, 2004).

6. CONCLUSÕES

O gene codificador da protease produzida por *T. indicae-seudaticae* foi identificado, possibilitando sua clonagem.

A transformação nos hospedeiros heterólogos procarioto e eucarioto ocorreu com sucesso, onde houve o crescimento de colônias em meio de seleção.

A expressão da protease foi realizada com sucesso, onde no hospedeiro procarioto houve maior produção de corpos de inclusão, porém ainda houve produção da enzima de forma solúvel, sendo a maior expressão observada em tempos intermediários.

A enzima recombinante produzida por *E. coli* apresentou máxima atividade de 250,89 U mL⁻¹ nas condições de pH 5,0 e temperatura de 50 °C, porém com estabilidade após 24 horas apenas nos pH 6,0 e 6,5, demonstrando assim ser sensível em pH alcalino. Enquanto que a enzima recombinante produzida por *P. pastoris* apresentou máxima atividade de 57,82 U mL⁻¹. Nas condições de pH 5,0 e temperatura de 60 °C. Ainda a enzima produzida por *P. pastoris* apresentou melhor termoestabilidade quando comparada com a produzida por *E. coli*.

A confirmação da família da enzima se concretizou onde a substância pepstatina A reduziu 100 % da atividade enzimática e o agente redutor β-mercaptoetanol reduziu mais que 90%.

A enzima não apresentou atividade coagulante, estudos mais aprofundados devem ser realizados para entender esse comportamento, como possível ativação de zimogênio, estudo de especificidade de substrato e estrutura tridimensional.

Ainda, estudos relacionados à otimização da produção em ambos os hospedeiros, recuperação da enzima presente em corpos de inclusão também podem ser realizados.

REFERÊNCIAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Recombinant organisms for production of industrial products. **Bioengineered Bugs**, v. 1, p. 116–131, 2010.

AMO, G. S., BEZERRA-BUSSOLI, C.; SILVA, R. R.; KISHI, L. T.; FERREIRA, H.; MARIUTTI, R. B.; ARNI, R. K.; GOMES, E.; BONILLA RODRIGUEZ, G. O. Heterologous expression, purification and biochemical characterization of a new xylanase from *Myceliophthora heterotalica* F.2.1.4. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 798-805, 2019.

ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. **In Methods in Enzymology**, v. 19, p. 446-460, 1970.

ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, maio 2000.

AZEVEDO, J. L. **Genética de Microrganismos**. Ed. UFG, Goiania, v. 2, p. 536, 2008.

BAKER, M. *De novo* genome assembly: what every biologist should know. **Nature Methods**, v. 9, p. 333-337, 2012.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 353-368, 1992.

BELVAL, L.; MARQUETTE, A.; MESTRE, P.; PIRON, M. C.; DEMANGEAT.; MERDINOGLU, D.; CHICH, J. F. A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by *E. coli* Arctic Express. **Protein Expression and Purification**, v. 109, p. 29-34, 2015.

BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 506p.

BONATO, E. P.; HELENO, G. J. B.; HOSHINO, N. A.; JÚNIOR, A. F. **Leites fermentados e queijos**. Florianópolis, 2006.

CANADIAN DAIRY INFORMATION CENTRE. **Global milk consumption**. 2016. Disponível em: <http://www.dairyinfo.gc.ca/index_e.php?s1=dff-fcil&s2=cons&s3=cons glo&s4=tm-lt>. Acesso em: 10 abr. 2017.

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

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. Chapter 10 – Recombinant proteins. **Biotechnology (second edition)**, Academic Cell, p. 335-363, 2016.

COHEN, S. N. DNA cloning: A personal view after 40 years. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 39, p. 15521-15529, 2013.

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p.20, 2010.

DOHM, J. C.; LOTTAZ, C.; BORODINA, T.; HIMMELBAUER, H. SHARCGS, a fast and highly accurate short-read assembly algorithm for de novo genomic sequencing. **Genome Research**, v. 17, p. 1697-1706, 2007.

EKBLOM, R.; WOLF, J. B. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. **Evolutionary Applications**, v. 7, p. 1026-1042, 2014.

FAN, G.; KATROLIA, P.; JIA, H.; YANG, S.; YAN, Q.; JIANG, Z. High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 11, p. 2043-2048, 2012.

FINN, R. D. et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D190–D199, 4 jan. 2017.

FINN, R. D. et al. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D222–D230, 1 jan. 2014.

FOOD INGREDIENTS BRASIL – **Dossiê Enzimas: A evolução das enzimas coagulantes**. N° 16 – 2011. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/164.pdf>>. Acesso em: 10 abr 2017.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 677- 684, 2008.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. The caseins. In: YADA, R. Y. **Proteins in Food Processing**. North America: ed. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 29-71, 2004.

GARVEY, M., KLINGER, J., KLOSE, H., FISCHER, R., COMMANDEUR, U. Expression of Recombinant Cellulase Cel5A from *Trichoderma reesei* in Tobacco Plants. **Journal of Visualized Experiments**. v. 88, 2014.

GUO, Y.; TU, T.; YUAN, P.; WANG, Y.; REN, Y.; YAO, B.; LUO, H. High-level expression and characterization of a novel aspartic protease from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and its potential in juice clarification. **Food Chemistry**, v. 280, p. 197-203, 2019.

HENGGEN, P. N. Purification of His-Tag fusion protein from *E.coli*. **Trends in Biochemical Sciences**. V. 20, p. 285-286, 1995.

HORIMOTO, Y.; DEE, D.; YADA, R. Multifunctional aspartic peptidase prosegments. **New Biotechnology**, v. 25, p. 318–24, 2009.

HUNT, M.; NEWBOLD, C.; BERRIMAN, M.; OTTO, T. D. A comprehensive evaluation of assembly scaffolding tools. **Genome Biology**, v. 15, p. R42, 2014.

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk-clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n.1, p. 14-33, 2011.

KSHIRSAGAR, S. D.; SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G. S.P. GOVINDWAR, S. P.; M.K. OH, M. K. An isolated *Amycolatopsis* sp. GDS for cellulase and xylanase production using agricultural waste biomass. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 120, n. 1, p.112-125, 9 dez. 2015.

LAMBERTZ, C.; GARVEY, M.; KLINGER, J.; HEESSEL, D.; KLOSE, H.; FISCHER, R.; COMMANDEUR, U. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 135, p. 1-15. 2014.

LI, J.; CHI, Z.; WANG, X. Cloning of the SAP6 gene of *Metschnikowia reukauffii* and its heterologous expression and characterization in *Escherichia coli*. **Microbiology Research**, v. 165, n. 3, p. 173–182, 2010.

LIM, L.; SEBBA, H.; KIMURA, Y.; YOKOTA, S.; DOI, M.; YOSHIDA, K.; TAKENAKA, S. Influences of N-linked glycosylation on the biochemical properties of aspartic protease from *Aspergillus glaucus* MA0196. **Process Biochemistry**, *in press*, 2018.

LOPES, D. S. A.; PESSOA, M. H. N.; SANTOS, R. S.; BARBOSA, M. S. A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 1, p. 235-244, 2012.

LUFRANO, D.; ROSARIO, F.; CASTANHEIRA, P.; PARISI, G.; VERÍSSIMO, P.; VAIRO-CAVALLI, S.; SIMÕES, I.; FARO, C. Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 81, p. 7-18, 2012.

MARCO, A.; DEUERLING, E.; MOGK, A.; TOMOYASU, T.; BUKAU, B. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. **BMC Biotechnology**, v. 7, n. 32, p. 1-9. 2007.

MÉDIGUE, C.; MOSZER, I. Annotation, comparison and databases for hundreds of bacterial genomes. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 724-736, 2007.

MERHEB-DINI, C.; GARCIA, G. A. C.; PENNA, A. L. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. **Food Chemistry**, v. 130, p. 859-865, 2013

MILLER JR; KOREN S; SUTTON G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics**, v. 95, p.315–327, 2010.

MOHANTA, T. K.; BAE, H. The diversity of fungal genome. **Biological Procedures Online**, v. 17, n. 8, p. 1-9, 2015

MOLLER, K. K.; RATTRAY, F. P.; SORENSEN, J. C.; ARDO, Y. Comparison of the hydrolysis of bovine κ -casein by camel and bovine chymosin: A kinetic and specificity study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5454–5460, 2012.

OVERBEEK, R.; BEGLEY, T.; BUTLER, R. M.; CHOUDHURI, J. V.; CHUANG, H. Y.; COHOON, M. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 5691-5702, 2005.

PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F. A. Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial. In: GALVÃO, c., org. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Curitiba: sociedade Brasileira de Zoologia, p. 241-260, 2014.

PIÑA, O. T. M.; LUGO, P. J. G.; CARDENA, B. R. G., RUIZ, R. F. C. Evaluación de la producción experimental de enzimas coagulantes de leche utilizando cepas de *Rhizomucor* spp. **Revista Colombiana Biotecnología**, v. 18, n. 1, p. 54-60, 2015.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91-105, 2012.

PROTEÍNAS de leche. **Food-info**, 2017. Disponível em: <<http://www.food-info.net/es/protein/milk.htm>>. Acesso em 15 de ago. de 2018.

RAMANA, K. V.; XAVIER, J. R.; SHARMA, R. K. Recent Trends in Pharmaceutical Biotechnology. **Pharmaceutical Biotechnology: Current Research**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2017.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-634, 1998.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; FINN, R. Twenty years of the *MEROPS* database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D343–D350, 4 jan. 2016.

REEVES, G. A.; TALAVERA, D.; THORNTON, J. M. Genome and proteome annotation: organization, interpretation and integration. **Journal of the Real Society Interface**, v. 6, p. 129-147, 2009.

ROLET-RÉPÉCAUD, O.; BERTHIER, F.; BEUVIER, E.; GAVOYE, S.; NOTZ, E.; ROUSTEL, S. Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. **LWT — Food Science and Technology**, v. 50, p. 459–468, 2013.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

SALGADO, J. A. G.; KANGWA, M.; FERNANDEZ-LAHOIRE, M. Cloning and expression of an aspartic proteinase from *Mucor circinelloides* in *Pichia pastoris*. **Biomed Central Microbiology**, v. 13, n. 250, p. 1-11, 2013.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos**. São Paulo: Blucher, v.2, 541p. 1996.

SHAH, M. A.; MIR, S. A.; PARAY, M. A. Plant proteases as milk clotting enzymes in cheese making: a review. **Dairy Science and Technology**, v. 94, p. 5–16, 2014.

SILVA, B. L.; GERALDES, F. M.; MURARI, C. S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and Characterization of a Milk-clotting Protease Produced in Submerged Fermentation by Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 172, p. 1999-2011, 2014.

SILVA, R. R. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. **Applied Biochemistry. Biotechnology**, v. 183, p. 1–19, 2017.

SIMÕES, I.; FARO, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. **European Journal Biochemistry**, v. 271, p. 2067 -2075, 2004.

STEIN, L. Genome annotation from sequence to biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 493-505, 2001.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbial and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 211–220, 2006.

SUN, Q.; CHEN, F.; GENG, F.; LUO, Y.; GONG.; JIANG, Z. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation on turtle peptides. **Food Chemistry**, v. 245, p. 570-577. 2018.

UNIPROT CONSORTIUM, T. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 5, p. 2699–2699, 16 mar. 2018.

WARD, O. P.; RAO, M. B.; KULKARNI, A. Proteases, production. **Elsevier**, p. 495-511, 2009.

YANG, X.; CONG, H.; SONG, J.; ZHANG, J. Heterologous expression of an aspartic protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma asperellum* in *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 2087–2094, 2013.

YIN, E.; LE, Y.; PEI, J.; SHAO, W.; YANG, Q. High-level expression of the xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 275-280, 2008.

YIN, Y. et al. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W445–W451, 1 jul. 2012.