UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAQUEL AIZEMBERG

Produção de glicerol quinase em *Pichia pastoris*

Araraquara - SP

2011

RAQUEL AIZEMBERG

Produção de glicerol quinase em *Pichia pastoris*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos

Orientadora: Prof[a.] Dr[a.] Edwil Aparecida de Lucca Gattás

Araraquara - SP

2011

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Aizemberg, Raquel
A311p Produção de glicerol quinase em *Pichia pastoris* / Raquel Aizemberg. -- Araraquara, 2011.
110 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição.
Orientador: Edwil Aparecida de Lucca Gattás

1. Glicerol quinase. 2. *Pichia pastoris*. 3. Glicerol. I. Gattás, Edwil Aparecida de Lucca, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

Dedico este trabalho aos meus pais Daniel Aizemberg e Janete Aizemberg pelo apoio, incentivo, amor e confiança em mim. Sem eles eu não poderia realizar meus sonhos. A minha irmã Denise e ao meu sobrinho Lucas por fazerem parte da minha vida. E principalmente a Deus, que colocou no meu caminho todas as situações e oportunidades que me fizeram ser o que sou hoje!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente aos meus pais, Daniel Aizemberg e Janete Aizemberg, pois sem eles eu não teria a oportunidade de ingressar na faculdade e realizar este trabalho. Pelo grande incentivo que eles tiveram e por acreditar em mim.

À Professora Dra. Edwil Aparecida de Lucca Gattás pela orientação, amizade, aprendizado e confiança no meu trabalho.

À Viviane Cristina Silva pela ajuda no início do meu trabalho no laboratório.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti e a Profa. Dra Rosemeire Cristina Linharis Rodrigues Pietro pelas sugestões e críticas em meu Exame de Qualificação.

A todos os funcionários e docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição pelos auxílios prestados e pela simpatia durante meu mestrado.

Às secretárias da pós-graduação pela atenção e auxílio.

À FAPESP pela bolsa concedida.

A minha irmã, Denise, pelo amor, incentivo e amizade.

Ao meu namorado, Jú, pelo amor, apoio e ajuda nas formatações deste trabalho.

Aos meus amigos da pós-graduação, Ederlan, Ana Lúcia, Mariana, Juliana, Gabriela, Flávia, Jacqueline, Marlene, Ozeni e Werner pelas horas de estudo, trabalhos, risadas, diversão, amizade e companheirismo.

Às minhas amigas Natália e Bruna, que durante o mestrado, vieram comigo para Araraquara, me fazendo companhia, e escutando minhas alegrias e tristezas.

As minhas amigas Elba, Maria Fernanda, Fernanda, Talita, Thaís, Babi e Amanda que sempre estiveram do meu lado.

Ao meu avô, José, que sempre me apoiou e se interessou pelos meus estudos.

A todos os meus professores que colaboraram de certa forma para o meu aprendizado.

E todos aqueles me ajudaram de qualquer forma, e que cuja colaboração foi importante para a conclusão deste trabalho.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."
Martin Luther King

"O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece."
Benjamin Disraeli

RESUMO

A levedura *Pichia pastoris* vem sendo largamente utilizada como um eficiente sistema de expressão para a produção de proteínas heterólogas, pois é um sistema seguro, fácil e mais barato que sistemas de expressão de outros eucariotos. Neste trabalho, a enzima de interesse é a glicerol quinase (GK), que cataliza a transferência do fosfato terminal do ATP para o glicerol originando glicerol-3-fosfato e ADP. Esta reação pode ser utilizada na determinação da concentração de glicerol, subproduto da fermentação alcoólica. A leitura do consumo de glicerol é realizada pela determinação espectrofotométrica do NADH gerado na reação de oxido-redução catalizada pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase. Este estudo de indução foi realizado em diferentes condições de crescimento da levedura *Pichia pastoris*. Os resultados mostraram a seleção do melhor clone da levedura *Pichia pastoris* para a expressão extracelular da enzima glicerol quinase, e a determinação das melhores condições do meio de cultura para a produção da enzima de interesse foram: concentração do meio de cultura BMMY (20 vezes), densidade inicial de célula (0,1 mg/mL), concentração de metanol na fase de indução (1%), natureza do tampão (fosfato de potássio), pH (6,0), suplementação de glicerol no meio BMMY (1%), peptona (marca Difco), sem adição de sulfato de amônio, caseína e glicina, uso do meio BMMY e liofilização do mesmo. Estudos de parâmetros cinéticos foram realizados e a atividade máxima da GK foi obtida em pH 9,8, a 50ºC e 2,5 μM de substrato, por metodologia clássica, além da presença de sulfato de magnésio e diluição da enzima de 30 vezes. A enzima apresentou alta estabilidade térmica — a atividade foi completamente mantida até 50ºC, durante uma hora — e em pH 7,0 por 7 dias, e o extrato liofilizado mantido sob refrigeração apresentou queda na atividade enzimática. Calculados pelos métodos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee, o valor do Km da enzima variou entre 0,63 μM e 1,29 μM, e a Vmax, entre 1,03 U/mL e 1,43 U/mL. Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta para melhor definição dos parâmetros da reação enzimática, observando-se que os valores máximos de atividade são obtidos aos maiores valores de pH e baixas temperaturas e a altas temperaturas e menores valores de pH, sem um ponto máximo no domínio experimental.

Palavras-chave: glicerol quinase, *Pichia pastoris*, glicerol

ABSTRACT

The yeast *Pichia pastoris* has been widely used as an efficient expression system for production of heterologous proteins because it is a safe, easy and cheaper than expression systems in other eukaryotes.In this studie, the enzyme of interest is glycerol kinase (GK), which catalizes the transfer of terminal phosphate from ATP to glycerol resulting glycerol-3-phosphate and ADP. This reaction can be used in determining the concentration of glycerol, a byproduct of fermentation. The reading of the consumption of glycerol is carried out by spectrophotometric determination of NADH generated in the redox reaction catalyzed by the enzyme glycerol-3-phosphate dehydrogenase. This study of induction was performed in different conditions of growth of the yeast *Pichia pastoris*. The results show that selecting the best clone of the yeast *Pichia pastoris* for the expression of extracellular enzyme glycerol kinase, and determining the best conditions of the culture medium for producing the enzyme of interest were: concentration of the culture medium BMMY (20 times), initial cell density (0.1 mg/mL), methanol concentration in the induction phase (1%), nature of buffer (potassium phosphate), pH (6.0), glycerol supplementation in BMMY medium (1%), peptone (Difco), without addition of ammonium sulfate, casein and glycine in BMMY and lyophilized medium. Studies of kinetic parameters were conducted and the GK maximum activity was obtained at pH 9.8 at 50°C and 2.5 µM substrate by conventional method, besides the presence of magnesium sulfate and diluting the enzyme 30 times. The enzyme showed high thermal stability - the activity was fully maintained up to 50°C for one hour - and at pH 7.0 for 7 days and kept under refrigeration, freeze-dried extract showed a decrease in enzymatic activity. Calculated by the methods of Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf and Eadie-Hofstee, the value of Km of the enzyme varied between 0.63 µM and 1.29 µM, and Vmax, between 1.03 U/mL and 1.43 U/mL. We used the response surface methodology to better define the parameters of the enzymatic reaction, noting that the maximum activity is obtained at higher pH values and low temperatures and high temperatures and lower pH values, without a peak in the experimental field.

Keywords: glycerol kinase, *Pichia pastoris*, glycerol

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Atividade da glicerol quinase dos diferentes clones 50

Tabela 2. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de diferentes tampões. 58

Tabela 3. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de diferentes valores de pH, com tampão citrato fosfato de potássio 100 mmol/L. 58

Tabela 4. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de diferentes valores de pH, com tampão fosfato de potássio 100 mmol/L. 58

Tabela 5. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase com diferentes suplementações do meio. 60

Tabela 6. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de peptonas de diferentes procedências. 60

Tabela 7. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de sulfato de amônio. 61

Tabela 8. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de caseína 1% e 2% e glicina 0,4 mol/litro. 61

Tabela 9. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase em meio BMMY e BSM. 62

Tabela 10. Efeito da liofilização sobre a atividade enzimática presente no sobrenadante do meio de cultivo BMMY. 63

CAPÍTULO 3

Tabela 11. Matriz de experiências com os níveis codificados e descodificados. 79

Tabela 12. Efeito da adição de sais no ensaio enzimático da glicerol quinase. 85

Tabela 13. Valores de Km e Vmax, calculados pelos diferentes métodos. 89

Tabela 14. Efeitos estimados dos fatores temperatura (T) e pH, em níveis lineares (L) e quadráticos (Q), e as respectivas interações, na atividade da glicerol quinase. 94

Tabela 15. Coeficientes do modelo polinomial de segundo grau ajustado à atividade da glicerol quinase. 94

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura do Glicerol (ARRUDA, RODRIGUES e FELIPE, 2007). 25

CAPÍTULO 2

Figura 2. Determinação de massa seca (mg células/mL) da linhagem *P. pastoris* em absorbância a 570 nm. 51

Figura 3. Determinação de biomassa e viabilidade celular do crescimento de *Pichia pastoris* em meio BMGY. 52

Figura 4. Determinação de biomassa e viabilidade celular do crescimento de *Pichia pastoris* em meio BMMY. 53

Figura 5. Atividade da glicerol quinase de *Pichia pastoris* em função do tempo em meio BMMY. 53

Figura 6. Determinação da atividade da glicerol quinase em função da concentração do meio de cultura. 54

Figura 7. Determinação da produção de biomassa e viabilidade em função da densidade inicial de células de *Pichia pastoris*. 55

Figura 8. Atividade da enzima glicerol quinase em função da densidade inicial de células de *Pichia pastoris*. 55

Figura 9. Efeito da concentração de metanol sobre a produção de biomassa e viabilidade celular. 56

Figura 10. Efeito da concentração de metanol sobre a atividade da enzima glicerol quinase 57

CAPÍTULO 3

Figura 11. Efeito da concentração de glicerol sobre a atividade da glicerol quinase. 80

Figura 12. Efeito do pH sobre a atividade da glicerol quinase. 81

Figura 13. Efeito da diluição do extrato enzimático sobre a atividade da glicerol quinase. 82

Figura 14. Efeito da temperatura sobre a atividade da glicerol quinase. 84

Figura 15. Determinação da energia de ativação segundo Arrhenius. 84

Figura 16. Efeito da concentração de glicerol sobre a atividade da glicerol quinase. 87

Figura 17. Determinação de Km e Vmax segundo Lineweaver-Burk. 88
Figura 18. Determinação de Km e Vmax segundoHanes-Woolf. 88
Figura 19. Determinação de Km e Vmax segundo Eadie-Hofstee. 89
Figura 20. Estabilidade da atividade da glicerol quinase, durante estocagem por uma hora, em diferentes temperaturas. 91
Figura 21. Estabilidade da atividade da glicerol quinase em diferentes valores de pH. 92
Figura 22. Estabilidade da atividade do extrato liofilizado de glicerol quinase em temperatura de refrigeração. 93
Figura 23. Superfície de resposta ajustada aos pontos dos dados experimentais correspondentes à atividade da glicerol quinase, em função da temperatura e pH em concentração inicial de substrato (glicerol) de 2,5 µM e diluição da enzima de 10 vezes. . 96
Figura 24. Gráfico de contorno das superfícies de resposta apresentada na Figura 13, em função da temperatura e pH, em concentração inicial de substrato de 2,5 µM e diluição da enzima de 10 vezes. 97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ε: absortividade molar

λ: comprimento de onda (nm)

μM: micro molar

AOX: álcool oxidase

ATP: adenosina trifosfato

BMMY: buffered complex médium containing methanol (meio tamponado complexo contendo metanol)

BMGY: buffered complex médium containing glycerol (meio tamponado complexo contendo glicerol)

BSA: albumina de soro bovino

BSM: basal salt medium (meio basal salino)

$CaCl_2$: cloreto de cálcio

Cp: conteúdo protéico

$CoCl_2$: cloreto de cobalto

$CuSO_4$: sulfato de cobre

Da; kDa dalton; kilodalton

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

EC: Enzyme Comission (Comissão de Enzimas)

$FeCl_2$: cloreto ferroso ou cloreto de ferro II

$FeCl_3$: cloreto de férrico ou cloreto de ferro III

$FeSO_4.7H_2O$: sulfato ferroso heptaidratado

g: força gravitacional

G3PDH: glicerol 3-fosfato desidrogenase

GK: glicerol quinase

GUT 1: glycerol utilization (utilização de glicerol)

HCl: ácido clorídrico

H_2SO_4: ácido sulfúrico

H_3BO_3: ácido bórico

KCl: cloreto de potássio

KI: iodeto de potássio

Km: constante de Michaelis

M: molaridade (mol/L)

mM: mili molar

MSR (RSM): metodologia de superfície de resposta (response surface methodology)

$MgCl_2$: cloreto de magnésio

$MgSO_4$: sulfato de magnésio

$MnSO_4$: sulfato de manganês

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NaF: fluoreto de sódio

Na_2MoO_4: molibdato do sódio

NaOH: hidróxido de sódio

Na_2SO_4: sulfato de sódio

$(NH_4)_2SO_4$: sulfato de amônio

Nm: nanômetro

pH: potencial hidrogeniônico

p/v: peso/volume

rpm: rotação por minuto

Tris: tris hidroximetilaminometano

U: unidade de atividade enzimática

UV: ultravioleta

v/v: volume/volume

Vmax: velocidade máxima

YNB: yeast nitrogen base (base nitrogenada de levedura)

YPDA: yeast extract peptone dextrose medium

$ZnCl_2$: cloreto de zinco

$ZnSO_4$: sulfato de zinco

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 33
1. INTRODUÇÃO 17
2. OBJETIVOS 21
3. REVISÃO DE LITERATURA 22
3.1. Levedura *Pichia pastoris* 22
3.2. Glicerol 24
3.3. Enzima glicerol quinase 28
4. REFERÊNCIAS 30
CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE GLICEROL QUINASE A PARTIR DA LEVEDURA GENETICAMENTE MODIFICADA *PICHIA PASTORIS*. 37
RESUMO 38
ABSTRACT 39
1. INTRODUÇÃO 40
2. MATERIAL E MÉTODOS 41
2.1. Micro-organismo 41
2.2. Detalhamento do trabalho experimental 41
2.3. Crescimento celular (determinação da biomassa) 41
2.4. Viabilidade celular 42
2.5. Curva de crescimento 42
2.6. Curva de tempo 42
2.7. Preparação das células de *Pichia pastoris* para a indução da glicerol quinase 43
2.7.1. Seleção e comparação de clones 43
2.7.2. Padronização da concentração do meio 44
2.7.3. Efeito do tamanho do inoculo 44
2.7.4. Efeito da concentração de metanol na fase de indução no meio de cultura 45
2.7.5. Efeito da natureza do tampão no meio de cultura 45
2.7.6. Efeito do pH 45
2.7.7. Efeito da suplementação do meio BMMY 45

2.7.8. Efeito de peptonas de diferentes procedências 46
2.7.9. Efeito da adição de sulfato de amônio 46
2.7.10. Efeito da adição da caseína e glicina 47
2.7.11. Efeito do meio de crescimento BSM 47
2.7.12. Efeito da liofilização do meio BMMY 48
2.8. Ensaio da atividade da enzima glicerol quinase (GK) 48
2.9. Determinação da proteína total do extrato celular de levedura 49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
3.1. Seleção e comparação de clones 50
3.2. Crescimento celular (determinação da biomassa) 50
3.3. Curva de crescimento 51
3.4. Curva de crescimento 52
3.5. Padronização da concentração do meio BMMY 54
3.6. Efeito do tamanho do inoculo 54
3.7. Efeito da concentração de metanol na fase de indução no meio de cultura 56
3.8. Efeito da natureza do tampão no meio de cultura 57
3.9. Efeito do pH 58
3.10. Efeito da suplementação do meio BMMY 59
3.11. Efeito de peptonas de diferentes procedências 60
3.12. Efeito da adição de sulfato de amônio 60
3.13. Efeito da adição da caseína e glicina 61
3.14. Efeito do meio de crescimento BSM 62
3.15. Efeito da liofilização 62
4. CONCLUSÃO 64
5. REFERÊNCIAS 65
CAPÍTULO 3 - ESTUDO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DA ENZIMA RECOMBINANTE GLICEROL QUINASE 70
RESUMO 71
ABSTRACT 72
1. INTRODUÇÃO 73
2. MATERIAL E MÉTODOS 74

2.1. Micro-organismo 74
2.2. Preparação das células de *Pichia pastoris* para a indução da glicerol quinase 74
2.3. Ensaio da atividade da enzima glicerol quinase (GK) 75
2.4. Concentração de substrato 75
2.5. Determinação do pH de reação 76
2.6. Diluição do extrato enzimático 76
2.7. Temperatura do ensaio 76
2.8. Efeito da adição de metais sobre a atividade da GK 76
2.9. Estabilidade térmica 76
2.10. Estabilidade ao pH 77
2.11. Estabilidade do extrato liofilizado 77
2.12. Análise dos dados 77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 80
3.1. Concentração de substrato 80
3.2. Determinação do pH de reação 81
3.3. Diluição do extrato enzimático 82
3.4. Temperatura do ensaio 83
3.5. Efeito da adição de metais sobre a atividade da GK 84
3.6. Concentração de substrato otimizado 86
3.7. Estabilidade térmica 90
3.8. Estabilidade em diferentes valores de pH 92
3.9. Estabilidade do extrato liofilizado 93
3.10. Metodologia de superfície de resposta 93
4. CONCLUSÃO 99
5. REFERÊNCIAS 100
ANEXO TÉCNICO 104
1. MEIOS DE CULTURA 104
1.1. YPDA 104
1.2. BMGY 104
1.3. BMMY 105
1.4. BSM 106

2. SOLUÇÃO DE RINGER..... 108
3. SOLUÇÕES ESTOQUES PARA O ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLICEROL QUINASE 109

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são fungos que têm sido utilizados pelo homem há milhares de anos e cuja manipulação causou um grande impacto na produção de alimentos e, por conseguinte, influenciando o próprio processo de desenvolvimento sócio-econômico da humanidade. O pão, a cerveja e o vinho representam os produtos mais expressivos do processo de manipulação desses micro-organismos ao longo do tempo (TORRES e MORAES, 2000).

A levedura vem sendo empregada como fonte de enzima durante décadas, e a aplicação destes biocatalizadores tem se estendido a vários setores produtivos, dentre os que destacam a produção de cerveja, produtos alimentícios, farmacêuticos, cosméticos, de limpeza e química fina em geral (SOMERS et al., 1997; DEVAUX-BASSÉGUY, et al., 1997).

Em todos esses processos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* teve um papel de destaque, sendo considerado um dos micro-organismos mais úteis ao homem e, também, um dos sistemas eucarióticos mais bem conhecidos (TORRES e MORAES, 2000).

Impulsionada pelo crescimento exponencial da demanda mundial por proteínas heterólogas e bioprodutos, consideráveis progressos foram alcançados pela engenharia de bioprocessos para o desenvolvimento de altos rendimentos de sistemas de expressão economicamente viáveis (PAVLOU e REICHERT, 2004).

Sistemas de levedura são valorizados devido a sua capacidade de secreção de proteínas heterólogas, e isso é uma vantagem, pois o micro-organismo segrega baixos níveis de espécies nativas de proteína e secreta a proteína heteróloga, facilitando etapas de purificação (BALAMURUGAN, REDDY e SURYANARAYANA, 2007).

As leveduras metilotróficas atraíram a atenção de imediato como potencial fonte de proteína unicelular (SCP) para serem comercializadas principalmente como proteína animal, porém, durante a década de 1970, a Phillips Petroleum Company desenvolveu meios de comunicação e protocolos para o cultivo de *Pichia pastoris* em metanol, e na década seguinte, a Phillips Petroleum contratou o Institito Salk Biotechnology/Industrial Associates, Inc. para desenvolver *Pichia pastoris* como um organismo para a expressão de proteína heteróloga (PERES et al., 2010).

A combinação dos métodos de fermentação desenvolvidos para o processo de SCP e do cultivo em metanol (promovendo a indução do forte promotor da álcool oxidase), levou a uma surpreendente expressão de proteínas recombinantes, e em 1993, Phillips Petroleum vendeu sua patente do sistema *P. pastoris* para a Research Corporation Techologies, que é o atual detentor da patente, e, além disso, a Phillips Petroleum permitiu que a Invitrogen Corporation vendesse os componentes do sistema. (PERES et al., 2010).

O sistema *P. pastoris* vem sendo utilizado para a produção de inúmeras proteínas, principalmente enzimas, tais como dextranases (JIMÉNEZ et al., 1997), amilases (CHOI e PARK, 2006), fitases (HANG et al., 2009), poligalacturonase (WANG et al., 2010), dentre outras.

O custo das enzimas é um dos fatores que determinam a economia de um processo biocatalítico e pode ser reduzido pelo desenvolvimento de condições ótimas de produção, tal como ocorre com linhagens eficientes de mutantes, que são construídos pela engenharia genética (BASSARAN e OZCAN, 2008).

A primeira levedura empregada na produção de proteínas recombinantes foi o *Saccharomyces cerevisiae,* a qual, porém é frequentemente limitada por um sistema de expressão de baixos rendimentos (SUDBERY, 1996). As leveduras metilotróficas, tais como *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha,* retêm todas as vantagens de *S. cerevisiae* e podem alcançar elevados rendimentos (SUDBERY, 1996).

A levedura *Pichia pastoris* é uma hospedeira bem estabelecida para a expressão de proteínas heterólogas (CEREGHINO e CREGG, 2000). No entanto, apesar do alto impacto tecnológico de *P. pastoris,* a informação fisiológica e genética está ainda bastante escassa (SAUER et al., 2004).

As vantagens das leveduras como hospedeiras para a expressão de proteínas recombinantes de eucariotos superiores tem sido apreciadas, uma vez que combinam a facilidade, simplicidade e baixos custos como nos sistemas bacterianos. Assim como as bactérias, as leveduras também são fáceis de cultivar e há uma grande quantidade de técnicas para a manipulação de novos genes. No entanto, como as leveduras são eucariotos, fornecem um ambiente propício para o processo pós-traducional e secreção, resultando num produto que é frequentemente idêntico ou mais semelhante à proteína nativa (SUDBERY, 1996).

P. pastoris pode crescer em altas densidades de células em meio mineral definido e é um eucarioto que também pode executar muitas modificações pós-traducionais, tais como processamento proteolítico, formação de pontes bissulfeto e glicosilação. As proteínas podem ser secretadas no meio de cultura usando um sinal de secreção (CEREGHINO et al., 2002; GHOSALKAR, SAHAI e SRIVASTAVA, 2008).

Num típico processo de fermentação de *P. pastoris* para produção de proteínas heterólogas, o glicerol é acrescido inicialmente num meio definido como única fonte de carbono. Durante esse processo, a biomassa é acumulada, mas a expressão do gene de proteína heteróloga é totalmente reprimida. Após o esgotamento inicial de glicerol, uma fase de transição é iniciada em que o glicerol é adicionado à cultura num índice de crescimento-limitado. Finalmente, metanol ou uma mistura de glicerol e metanol é adicionado à cultura para induzir a expressão de proteínas heterólogas (D'ANJOU e DAUGULIS, 2000).

A regulação central do metabolismo do carbono em *P. pastoris e Saccharomyces cerevisiae* é muito semelhante entre si e o crescimento de ambas as leveduras seguem perfis muito semelhantes em relação à taxa de biossíntese de aminoácidos (SOLA et al., 2004).

S. cerevisiae tem sido utilizada para a produção de proteínas heterólogas e seus requisitos nutricionais são bem definidos. No entanto, um meio mínimo projetado para o crescimento de *S. cerevisiae* pode ser otimizado para a produção de biomassa em *P. pastoris* (GHOSALKAR, SAHAI e SRIVASTAVA, 2008). É necessário desenvolver um meio fisiologicamente racional e conveniente para o processo de produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris* (GHOSALKAR, SAHAI e SRIVASTAVA, 2008).

P. pastoris podem crescer em meios definidos simples utilizando metanol como única fonte de carbono. A primeira enzima na utilização do metanol é a álcool oxidase conhecida como AOX na *P. pastoris*. Durante seu crescimento em metanol, essa enzima constitui cerca de 30% do total de proteínas na célula contidas nos peroxissomos, que podem ocupar 80% do volume total da célula. A expressão da AOX é altamente regulada, e é reprimida pela glicose ou etanol de modo que não seja detectada. Dessa forma, a total indução ocorre na presença de metanol. O poderoso promotor que regula a expressão de AOX foi plenamente explorado para a produção de proteínas recombinantes (SUDBERY, 1996; HARTNER e GLIEDER, 2006).

Neste trabalho, o gene GUT1 da enzima glicerol quinase de *Saccharomyces cerevisiae* foi integrado artificialmente no sistema *Pichia pastoris* para a produção desta proteína, visando à otimização de sua produção, pois esta enzima pode ser utilizada na elaboração de um kit enzimático para determinação rápida e eficiente de glicerol em diferentes amostras.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Selecionar o melhor clone de *Pichia pastoris* geneticamente modificada e padronizar as metodologias de dosagens e de produção da enzima GK em diferentes condições de crescimento através de modificações no meio de cultura.

- Estudar alguns parâmetros cinéticos da enzima glicerol quinase produzida pela levedura *Pichia pastoris* geneticamente modificada.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Levedura *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica também conhecida como *Endomyces pastori, Komagataella pastori, Petasospora pastori, Saccharomyces pastori, Zigosaccharomyces pastori, Zygowillia pastori e Zymopichia pastori* (BARNETT, PAYNE e YARROW, 2000).

Esta levedura é naturalmente encontrada no exsudato de castanheiro na França e em carvalho preto da *Quercus kelloggii* nos EUA. Sua taxomonia é descrita como sendo do reino *Fungi*; do filo *Ascomicota*; do sub-filo *Saccharomicotina*; da classe *Saccharomicetes*; da ordem *Saccharomicetales*; da família *Sacchamomicetaceae*; do gênero *Pichia* e da espécie *P. pastoris* (BARNETT, PAYNE e YARROW, 2000).

As leveduras do gênero *Pichia* utilizam uma via específica para o metanol, que envolvem várias enzimas. As reações iniciais ocorrem em organelas especializadas, os peroxissomos, seguido por passos metabólicos subsequentes no citoplasma. Os peroxissomos desempenham um papel indispensável durante o crescimento, uma vez que possuem três enzimas chaves para o metabolismo do metanol: a álcool oxidase, catalase e a diidroxiacetona sintase. As reações subsequentes de assimilação e desassimilação do metanol estão localizadas no citosol (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). A enzima álcool oxidase (AOX) catalisa o primeiro passo na via de utilização do metanol, a oxidação do metanol à formaldeído e peróxido de hidrogênio. A enzima AOX é sequestrada dentro do peroxissomo junto com a catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio a oxigênio e água. Uma parte do formaldeído gerada pela AOX deixa o peroxissomo e, mais adiante, é oxidada à formiato e dióxido de carbono por duas desidrogenases do citoplasma, reações que são fonte de energia para o crescimento celular em metanol (CEREGHINO e CREGG, 2000).

A levedura *P. pastoris* apresenta duas características que a tornam uma atraente hospedeira para a produção de proteínas heterólogas. A primeira é o forte promotor usado para transcrever genes heterólogos, o qual é derivado do gene da álcool oxidase (AOX1) de

P. pastoris. Esse promotor é regulado transcricionalmente por metanol, um indutor relativamente barato. Em células expostas a metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição no promotor AOX1 é altamente eficiente e comparável aos promotores derivados dos genes altamente expressos da via glicolítica. No entanto, ao contrário dos promotores glicolíticos, o promotor AOX1 é firmemente regulado e reprimido sob condições de crescimento sem metanol. Uma vez que a maioria das proteínas heterólogas é, de alguma forma, deletérias para a célula, quando expressas em altos níveis, a habilidade de manter a cultura em um estado reprimido ou desligado é altamente desejável. Trata-se de uma importante precaução para minimizar a seleção de mutantes que não expressam o produto heterólogo durante o crescimento da cultura. Para ser ativado, o promotor AOX1 requer a presença de metanol e, na ausência desse indutor, ele se torna reprimido. Além de metanol, o sistema AOX1 necessita da ausência de glicose para ser plenamente ativado. Uma vez que o promotor AOX1 é controlado pela manipulação da fonte de carbono adicionado ao meio de cultura, o crescimento e a indução de cepas de *P. pastoris*, que expressam proteínas heterólogas, são facilmente obtidos em todas as escalas, desde frascos até grandes fermentadores (CEREGHINO e CREGG, 2000).

A segunda característica importante de *P. pastoris* é que esta levedura não é considerada uma forte fermentadora, se comparada com a *S. cerevisiae*. A fermentação realizada por leveduras gera etanol, que, em culturas de alta densidade, pode rapidamente atingir níveis tóxicos (efeito Crabtree). Para uma produção economicamente viável de proteínas recombinantes, a concentração de proteínas no meio deve ser proporcional à quantidade de células. É necessário, pois, atingir níveis de alta densidade celular, os quais não são facilmente obtidos com *S. cerevisiae* (CEREGHINO e CREGG, 2000).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tornou-se uma das leveduras mais estudadas no início dos anos 1970, uma vez que é declaradamente um dos mais úteis e versáteis sistemas de expressão de proteínas heterólogas. Esse sistema é de interesse industrial, sobretudo devido a sua capacidade de secretar proteínas estrangeiras, de desempenhar modificações pós-traducionais incluindo glicosilação e formação de ligação dissulfeto, e também da capacidade de crescer em meios definidos com alta densidade celular (POTVIN, AHMAD e ZHANG, 2010).

Vários genes de diferentes procedências (bactérias, fungos, invertebrados, plantas e humanos) já foram expressos em *P. pastoris* sob o controle do promotor AOX1. A maioria dos genes expressos teve seus produtos secretados para o meio extracelular e alguns, como o fator de necrose tumoral humano, foi produzido no ambiente intracelular (TORRES e MORAES, 2000).

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

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

3.2. Glicerol

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva. Os seus sinônimos são: glicerina, trihidroxipropano, glicilálcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano (RIVALDI et al., 2008).

O glicerol é um poliálcool de fórmula estrutural, apresentada na Figura 1, que está presente em diferentes espécies, incluindo protistas unicelulares e mamíferos. No entanto, é difícil encontrarmos o glicerol na sua forma “livre” nesses organismos, pois geralmente se encontra como um triglicerídeo combinado, por exemplo, a ácidos graxos como os ácidos: oléico, palmítico e esteárico (ARRUDA, RODRIGUES e FELIPE, 2007).

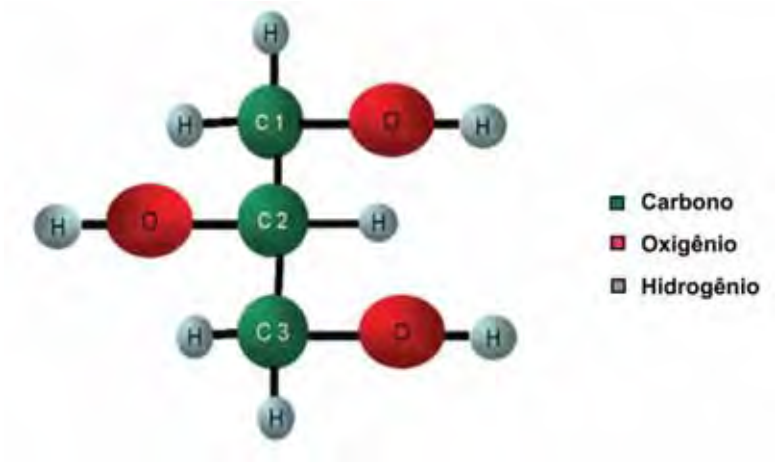

Figura 1. Estrutura do Glicerol (ARRUDA, RODRIGUES e FELIPE, 2007).

O glicerol na sua forma pura apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e em clorofórmio. Devido às suas características físicas e químicas e ao fato de ser inócuo, o glicerol puro apresenta diferentes aplicações na indústria de cosméticos, farmacêutica, detergentes, na fabricação de resinas e aditivos e na indústria de alimentos (RIVALDI et al., 2008).

Uma das aplicações promissoras do glicerol é a sua bioconversão em compostos de alto valor através da fermentação microbiana. O glicerol é considerado uma matéria-prima para novas fermentações industriais (SILVA, MACK e CONTIERO, 2009).

Em uma célula microbiana, durante o catabolismo aeróbico, o glicerol entra por difusão facilitada e/ou transporte ativo e é então fosforilado em glicerol-3-fosfato, seguido por oxidação de 3-dihidroxiacetona, que é convertida em gliceraldeído-3-fosfato. Este último entra na via glicolítica e transforma-se em ácido pirúvico, e em seguida em acetil-CoA, um precursor de uma variedade de produtos metabólicos (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

Esse poliálcool pode ser gerado como subproduto da fabricação de sabão, a partir de gorduras; na síntese de compostos petroquímicos e na fermentação microbiana (WANG et al., 2001). O glicerol é também o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10% do volume total do biodiesel produzido corresponde a glicerol (DASARI et al., 2005).

A disponibilidade de glicerol bruto deverá aumentar nos próximos anos devido ao enorme crescimento na produção de biodiesel em todo o mundo. A conversão de produtos de valor agregado, especialmente utilizando os recursos mais baratos, como o glicerol pode desenvolver um biocombustível cada vez mais economicamente viável (YU, KIM e HAN, 2010).

O glicerol reage com ácidos graxos resultando em mono, di e tri ésteres ácidos que são precursores dos óleos e gorduras da natureza. A hidrólise alcalina de lipídios (óleos e gorduras) resulta em duas frações: fração saponificável (glicerídeos), formada pelo glicerol, e sais dos ácidos graxos livres; e fração insaponificável, formada pelos esteróis, alcoóis, pigmentos, hidrocarbonetos e vitaminas lipossolúveis (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Em alimentos industrializados, o glicerol é considerado aditivo quando adicionado como umectante (TININIS, 2001). Segundo a WHO (World Health Organization), aditivo é considerado uma substância não nutritiva adicionada intencionalmente ao alimento, geralmente em quantidades pequenas, para melhorar sua aparência, aroma, sabor, textura e conservação.

Além de sua aplicação em alimentos, o glicerol é usado em outras áreas, tal como no processo de criopreservação de bactérias. O glicerol é usado como um dos componentes da mistura de congelamento para não danificar as células. Elas são congeladas em uma mistura de água com o meio próprio para crescimento e, outro líquido (glicerol) miscível em água. O glicerol previne a formação de cristais de gelo que podem romper a parede celular durante o congelamento (TININIS, 2001).

O glicerol é um componente químico naturalmente encontrado em produtos alimentares, e pode ser medido em sucos de fruta, vinho, óleo vegetal, cerveja, tabaco, mel e muitos outros alimentos (CORDELLA, ANTINELLI e CABROL-BASS, 2003). Sua determinação é interessante como indicador de fermentação e sua produção está relacionada com a presença de micro-organismos nos produtos alimentares (GAMELA et al., 2008).

No entanto, este poliol não é usualmente determinado nas diversas indústrias, visto que o uso de procedimentos de dosagem rotineiros ainda é limitado devido ao alto custo (RANGEL e TÓTH, 2000; WU e CHENG, 2005).

Além do álcool e do dióxido de carbono, o glicerol é o maior produto resultante do processo de fermentação, sendo presente em quase todas as bebidas alcoólicas. Nos vinhos, o glicerol é o composto mais abundante depois de água e etanol, e isso contribui às propriedades de sabor dos vinhos (OLIVEIRA et al., 2006)

A produção de glicerol pode ser considerada benéfica em algumas fermentações, como na produção de vinho, mas indesejável na produção de bebidas destiladas (LEA e PIGGOTT, 1995).

Em vinhos, por exemplo, o conteúdo de glicerol é um fator de qualidade que afeta as características sensoriais, especialmente a riqueza de sabor (LUBBERS, VERRET e VOILLEY, 2001). No entanto, o glicerol, em vinhos e cervejas pode ser uma fonte de carbono para bactérias deteriorantes, originando compostos aromáticos e acidez volátil que conferem um sabor inaceitável, principalmente para as cervejas (GAMELA et al., 2008).

Algumas vodkas são embaladas misturando-se apenas uma parte de água, enquanto em outras, adicionam-se traços de alguns aditivos como: açúcar, glicerol e aromas, importantes para conferir um gosto mais suave ao produto e possibilitar o comércio da bebida nos locais onde se exige a presença de pequenas concentrações desses aditivos (LEA e PIGGOTT, 1995).

Assim, a determinação de glicerol é importante para o controle de qualidade industrial, que requerem métodos rápidos, sensíveis, confiáveis e ao mesmo tempo econômicos para a rotina de análise. O teor de glicerol é importante em vinhos para detectar possíveis adulterações com adição de glicerol (GAMELA et al., 2008).

A dosagem do glicerol se faz necessária em algumas indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas, em destilarias e em análises biológicas. A adição deste poliol em alimentos vem incentivando pesquisas relacionadas com o desenvolvimento de métodos quantitativos que possam satisfazer as reivindicações do consumidor cada vez mais exigente (TININIS, 2001).

Estudos de dosagens do glicerol vem sendo feitos, no mel (FERNANDEZ-MUIFIO e SANCHO, 1996), e em vinhos (FERNANDES et al., 2004; GAMELA et al., 2008; MATAIX e CASTRO, 2000).

Diversos métodos estão disponíveis para medir a quantidade de glicerol como a cromatografia gasosa, e métodos enzimáticos (CORDELLA, ANTINELLI e CABROL-

BASS, 2003). Alguns métodos para análise de glicerol incluem oxidação, esterificação, formação de éter, reação de desidratação e procedimentos cromatográficos. Embora haja os métodos analíticos, as determinações enzimáticas são as que possuem maior sensibilidade e especificidade (WU e CHENG, 2005).

A escolha da metodologia deve se basear no tipo de matriz onde se encontra o analito, na concentração desse composto na amostra e na complexidade dessa amostra (HAMANO, 1991).

3.3. Enzima glicerol quinase

O uso das enzimas possui várias vantagens destacando-se principalmente: alta especificidade, obtenção de produtos puros e alta capacidade de regeneração, sem sofrer degradação. Devido a estas propriedades, as enzimas servem como catalisadores de reações para quantificação de substâncias químicas (REIS, 2006).

As enzimas são catalisadores biológicos de reações, altamente específicos, que podem oferecer resultados de análises em apenas alguns segundos, sendo que, a formação de produtos ou o consumo de substrato podem ser monitorados em diversos tipos de aparelhos (REIS, 2006).

A glicerol quinase é uma enzima envolvida no metabolismo de gorduras e carboidratos (OHIRA et al., 2005), e é também chamada de gliceroquinase (GK; EC 2.7.1.30; ATP: glicerol 3-fosfotransferase) que catalisa a fosforilação do glicerol a glicerol-3-fosfato (JIN et al., 1982; CRANS e WHITESIDES, 1985; STEPANIAN et al., 2003).

Esta reação tem sido reconhecida não apenas em mamíferos, mas também em várias bactérias, fungos e protozoários. Suas sequências de aminoácidos são altamente conservadas durante a evolução com aproximadamente 50% da sequência idêntica entre mamíferos e bactérias (GUO et al., 1993).

A formação de glicerol-3-fosfato a partir desta reação é importante, pois atua na produção de glicerídeos, lipídios e fosfato de dihidroxiacetona (DHAP), sendo que o DHAP é um importante intermediário em uma série de caminhos metabólicos (OHIRA et al., 2005).

É uma proteína tetramérica e composta por idênticas subunidades, mas pode se dissociar em dímeros a baixas concentrações protéicas (KOGA et al., 1998).

A enzima GK atua como um fator limitante no metabolismo de glicerol de diversos micro-organismos, como a *Escherichia coli*, em que a reação é regulada por alguns metabólitos como frutose 1,6-bifosfato, adenina e proteína fosfocarreadoras III (SAKASEGAWA et al., 1998).

A enzima glicerol quinase foi isolada pela primeira vez por Bublitz e Kennedy, de fígado de rato (JANSON e CLELAND, 1974). A GK é encontrada em órgãos e tecidos de animais e também em vários micro-organismos (BRISSON et al., 2001).

Em mamíferos, a GK é mais encontrada no fígado, rim e, em menores quantidades, na mucosa intestinal, tecido adiposo e músculos. Esta enzima possui aproximadamente 50% de similaridade de aminoácidos entre humanos e a *E. coli* (BRISSON et al., 2001).

O glicerol plasmático é disponibilizado a partir da lipólise de triglicerídeos de tecidos adiposos e da hidrólise da gordura da dieta. O fígado desempenha um papel fundamental, pois é responsável por 70-90% da capacidade total do corpo para a utilização de glicerol. Depois da captação, o glicerol é irreversivelmente convertido pela glicerol quinase a glicerol-3-fosfato. Este composto constitui a espinha dorsal de triglicerídeos e fornece o esqueleto de carbono para a gliconeogênese (WESTERGAARD, MADSEN e LUNDGREN, 1998).

Genes que expressam a GK em humanos, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus casseliflavus* já foram sequenciados e clonados (KOGA et al., 1998). Em *S. cerevisiae*, o gene que codifica a glicerol quinase é chamado GUT1 (gut = “glycerol utilization”) (PAVLIK, 1993).

A enzima glicerol quinase desempenha um importante papel fisiológico para a formação de glicerol-3-fosfato na biossíntese de fosfolipídios (ARAGON et al., 2008). Além disso, a enzima é importante industrialmente e útil para a determinação clínica de triglicérides no sangue em combinação com lipase, glicerol-3-fosfato-oxidase e peroxidase (FOSSATI e PRENCIPE, 1982).

4. REFERÊNCIAS

ARAGON, C. C.; FERREIRA-DIAS, S.; GATTÁS, E. A. L.; PERES, M. F. S. Characterization of glycerol kinase from baker's yeast: Response surface modeling of the enzymatic reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 113-120, 2008.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**. n. 26, p. 56-62, 2007.

BALAMURUGAN, V.; REDDY, G. R.; SURYANARAYANA, V. V. S. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins - Vaccines. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 175-186, 2007.

BARNETT, J. A, PAYNE, R. W., YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. **Cambrige University Press**, 3 ed., 2000.

BASSARAN, P.; OZCAN, M. Characterization of b-xylosidase enzyme from a *Pichia stipitis* mutant. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 38-43, 2008.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução à química de alimentos. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992, 222p.

BRISSON, D.; VOHL, M. C.; ST-PIERRE, J. HUDSON, T. J.; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? **BioEssays**, v.23, p.534-542, 2001.

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

CEREGHINO, G. P.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M., Production of recombinant proteins in fermentor cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 329-332, 2002.

CHATZIFRAGKOU, A; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU,

S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, p. 1097-1108, 2011.

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

CORDELLA, C.; ANTINELLI, J-F.; CABROL-BASS, D. Computer-aided determination of glycerol in food products with GlycerolSoft, a tool for assessing the quality of food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 115-122, 2003.

CRANS, D. C.; WHITESIDES, G. M. Glycerol kinase: synthesis of dihydroxyacetone phosphate, *sn*-glycerol-3-phosphate, and chiral analogues. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 24, p. 7019-7027, 1985.

D'ANJOU, M. C.; DAUGULIS, A. J. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 341-346, 2000.

DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: Gen**, v. 281, p. 225-231, 2005.

DEVAUX-BASSÉGUY, R.; GROS, P.; BERGEL, A. Electroenzymatic processes: a clean technology alternative for highly selective synthesis? **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 68, p. 389-396, 1997.

FERNANDES, E. N.; MOURA, M. N. C.; LIMA, J. L. C.; REIS, B. F. Automatic flow procedure for the determination of glycerol in wine using enzymatic reaction and spectrophotometry, **Microchemical Journal**, v. 77, p. 107-112, 2004.

FERNANDEZ-MUIFIO, M. A.; SANCHO, M. T. Direct enzymatic analysis of glycerol in honey: a simplified method. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 71, p. 141-144, 1996.

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

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, 1982.

GAMELLA, M.; CAMPUZANO, S.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, j. m. Integrated multienzyme electrochemical biosensors for the determination of glycerol in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 609, p. 201-209, 2008.

GHOSALKAR, A.; SAHAI, V.; SRIVASTAVA, A. Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. **Bioresource Technology** v. 99, p. 7906-7910, 2008.

GUO, W.; WORLEY, K.; ADAMS, V.; MASON, J.; SYLVESTER-JACKSON, D.; ZHANG, Y.-H.; TOWBIN, J. A.; FOGT, D. D.; MADU, S.; WHEELER, D. A.; MCCABE, E. R. B. Genomic scanning for expressed sequences in xp21 identifies the glycerol kinase gene. **Nature Genetics**, v. 4, p. 367-372, 1993.

HANG, H.; YE, X.; GUO, M.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, S. A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p.185-188, 2009.

HAMANO, T.; MITSUHASHI, Y.; AOKI, N.; YAMAMOTO, S.; TSUJI, S.; ITO, Y.; OJI, Y. Determination of glycerol in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v. 541, p. 265-272, 1991.

HARTNER, F. S.; GLIEDER, A. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 1-21, 2006.

JANSON, C. A.; CLELAND, W. W. The kinetic mechanism of glycerokinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 8, p. 2562-2566, 1974.

JIMÉNEZ, E. R.; SÁNCHEZ, K.; ROCA, H.; DELGADO, J. M. Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 7, p. 461-466, 1997.

JIN, R. Z.; FORAGE, R. G.; LIN, E. C. C. Glycerol kinase as a substitute for dihidroxyacetone kinase in a mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 152, n. 3, p. 1303-1307, 1982.

KOGA, Y.; MORIKAWA, M.; HARUKI, M.; NAKAMURA, H.; IMANAKA, T.; KANAYA, S. Thermostable glycerol kinase from a hyperthermophilic archaeon: gene cloning and characterization of the recombinant enzyme. **Protein Engineering**, v. 11, n. 12, p. 1219-1227, 1998.

LEA, A. G. H; PIGGOTT, J. R. Fermented beverage production. London: Blackie **Academic & Professional**, 1995, p. 36, 292.

LUBBERS, S.; VERRET, C.; VOILLEY, A. The effect of glycerol on the perceived aroma of a mode wine and a white wine, **Lebensmittel-Wissenchaft and-Technologie**, v. 34, p. 262-265, 2001.

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

MATAIX, E.; CASTRO, M. D. L. Simultaneous determination of ethanol and glycerol in wines by a flow injection-pervaporation approach with in parallelphotometric and fluorimetric detection. **Talanta**, v. 51, p. 489-496, 2000.

OHIRA, R. H.; DIPPLE, K. M.; ZHANG, Y.; MCCABE, E. R. B. Human and murine glycerol kinase: Influence of exon 18 alternative splicing on function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, p. 239-246, 2005.

OLIVEIRA, H. M; SEGUNDO, M. A.; LIMA, J. L. F. C.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E. A. G. Kinetic Enzymatic Determination of Glycerol in Wine and Beer Using a Sequential Injection System with Spectrophotometric Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 4136-4140, 2006.

PAVLIK, P.; SIMON, M.; SCHUSTER, T.; RUIS, H. The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. **Current Genetics**, v. 24, p. 21-25, 1993.

PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M. Recombinant protein therapeutics: success rates, market trends and values to 2010. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 1513-1519, 2004.

PERES, M. F. S.; SILVA, V. C.; VALENTINI, S. R., GATTÁS, E. A. L.. Recombinant expression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase using the *Pichia pastoris* system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 65, p. 128-132, 2010.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, 2010.

RANGEL, A. O. S. S.; TÓTH, I. V. Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 416, p. 205-210, 2000.

REIS, J. P. Z. **Dosagem de etanol utilizando álcool desidrogenase de levedura de panificação**. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara- SP, 2006.

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. DA. Glicerol de biodiesel. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 37, p. 44-51, 2008.

SAKASEGAWA, S.; YOSHIOKA, I.; KOGA, S.; TAKAHASHI, M.; MATSUMOTO, K.; MISAKI, H.; OHSHIMA, T. A novel glycerol kinase from *Flavobacterium meningosepticum*: characterization, gene cloning and primary structure. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 12, p. 2388-2395, 1998.

SAUER, M.; BRANDUARDI, P.; GASSER, B.; VALLI, M.; MAURER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D. Differential gene expression in recombinant *Pichia pastoris* analyzed by heterologous DNA microarray hybridisation. **Microbial Cell Factories**, v. 3, p. 1-14, 2004.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27 p. 30-39, 2009.

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

SOLA, A.; MAAHEIMO, H.; YLONEN, K.; FERRER, P., SZYPERSKI, T. Amino acid biosynthesis and metabolic flux profiling of *Pichia pastoris*. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 2462-2470, 2004.

SOMERS, W. A. C.; VAN-HARTINGSVELDT, W.; STIGTER, E. A. C.; VAN-DER-LUGT, J. P. Bio-electrochemistry: a powerful tool for the production of ingredients in the food industry. **Agro Food Industry Hi-Tec**, p. 32-35, 1997.

SUDBERY, P. E. The expression of recombinant proteins in yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 517-524, 1996.

STEPANIAN, S. V.; HUYN, S. T.; MCCABE, E. R. B.; DIPPLE, K. M. Characterization of the human glycerol kinase promoter: identification of a functional HNF-4α binding site and evidence for transcriptional activation. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 80, p. 412-418, 2003.

TININIS, C. R. C. S. **Ensaio enzimático para dosagem de glicerol.** 2001. 124 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara- SP, 2001.

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

WANG, Z.; WANG, Y.; ZHANG, D.; LI, J.; HUA, Z.; DU, G.; CHEN, J. Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1318-1323, 2010.

WESTERGAARD, N.; MADSEN, P.; LUNDGREN, K. Characterization of glycerol uptake and glycerol kinase activity in rat hepatocytes cultured under different hormonal conditions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1402, p. 261-268, 1998.
WHO - Techn. Rep. Ser. n. 97, 1955.

WU, L.; CHENG, C. M. Flow-injection enzymatic analysis for glycerol and triacylglycerol. **Analytical Biochemistry**, v. 346, p. 234-240, 2005.

YU, K. O.; KIM, S. W.; HAN, S. O. Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4157-4161, 2010.

Capítulo 2 – Otimização do meio de cultura para produção de glicerol quinase a partir da levedura geneticamente modificada Pichia pastoris.

RESUMO

Esse trabalho baseou-se na indução da produção da enzima glicerol quinase (GK; EC 2.7.1.30; ATP: glicerol 3-fosfotransferase), excretada pela levedura *Pichia pastoris* geneticamente modificada. Esta enzima, utilizada na dosagem de glicerol, catalisa a conversão deste em glicerol-3-fosfato, que utiliza ATP e requer íons Mg^{2+}. A dosagem do glicerol envolve uma segunda reação de oxidação do glicerol-3-fosfato pela glicerol-3-fosfato desidrogenase, G3PDH (sn-glicerol-3-:NAD^+ 2 oxidoredutase, EC 1.1.1.8) com geração de NADH. O deslocamento do equilíbrio de reação para leitura da concentração do NADH gerado, correspondente a concentração do glicerol consumido, dependerá da expressão de altas quantidades das enzimas envolvidas. Este estudo de indução foi realizado em diferentes condições de crescimento da levedura *Pichia pastoris*, desenhada para produzir a enzima extracelularmente no meio de crescimento. Os resultados mostraram a seleção do melhor clone da levedura *Pichia pastoris* para a expressão extracelular da enzima glicerol quinase, e a determinação das melhores condições do meio de cultura para a produção da enzima de interesse foram: concentração do meio de cultura BMMY (20x), densidade inicial de célula (0,1 mg/mL), concentração de metanol na fase de indução (1%), natureza do tampão (fosfato de potássio), pH (6,0), suplementação de glicerol no meio BMMY (1%), peptona (marca Difco), sem adição de sulfato de amônio, caseína e glicina, uso do meio BMMY e liofilização do mesmo.

Palavras-chave: levedura geneticamente modificada, glicerol, otimização, expressão.

ABSTRACT

This study was based on inducing the production of the enzyme glycerol kinase (GK, EC 2.7.1.30, ATP: glycerol 3-phosphotransferase), excreted by the recombinant yeast *Pichia pastoris*. This enzyme is used in the determination of glycerol, catalyzes the conversion of glycerol-3-phosphate, using ATP and requires Mg^{2+} ions. The determination of glycerol involves a second oxidation of glycerol-3-phosphate by glycerol-3-phosphate dehydrogenase, G3PDH (sn-glycerol-3-: NAD^{+} 2 oxidoreductase, EC 1.1.1.8) with generation of NADH. The displacement of the equilibrium reaction to reading the concentration of NADH generated, the corresponding concentration of glycerol consumed, depends upon the expression of high amounts of the enzymes involved. This study of induction was performed in different conditions of growth of the yeast *Pichia pastoris*, designed to produce the enzyme in the extracellular medium. The results show that selecting the best clone of the yeast *Pichia pastoris* for the expression of extracellular enzyme glycerol kinase, and determining the best conditions of the culture medium for producing the enzyme of interest were: concentration of the culture medium BMMY (20 times), initial cell density (0.1 mg/mL), methanol concentration in the induction phase (1%), nature of buffer (potassium phosphate), pH (6.0), glycerol supplementation in BMMY medium (1%), peptone (Difco), without addition of ammonium sulfate, casein and glycine in BMMY and lyophilized medium.

Keywords: recombinant yeast, glycerol, optimization, expression.

1. INTRODUÇÃO

Impulsionado pelo crescimento exponencial da demanda mundial por proteínas recombinantes e bioprodutos, consideráveis progressos foram alcançados pela engenharia de bioprocessos no desenvolvimento de sistemas de produção com elevados rendimentos (PAVLOU e REICHERT, 2004).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido amplamente relatada como um sistema adequado de expressão de proteínas heterólogas (MACAULEY-PATRICK, et al., 2005), e tornou-se uma das leveduras mais estudadas, uma vez que é declaradamente um dos mais úteis e versáteis sistemas de expressão de proteínas recombinantes (POTVIN, AHMAD e ZHANG, 2010).

A expressão das proteínas estrangeiras é afetada por vários fatores, tais como temperatura, pH, concentração de oxigênio, dentre outras, que agem direta ou indiretamente sobre o crescimento celular (COS et al., 2006).

A enzima glicerol quinase (GK, EC 2.7.1.30; ATP: glicerol 3-fosfotransferase) catalisa a fosforilação de glicerol a glicerol 3-fosfato dependente de ATP e Magnésio. Essa enzima executa um importante papel fisiológico na formação de glicerol 3-fosfato na biossíntese de fosfolipídios. Além disso, a enzima é industrialmente importante e útil na determinação dos níveis de triglicerídeos no sangue em combinação com lípases e outras enzimas (SAKASEGAWA et al., 2001) e também na determinação do glicerol em bebidas fermentadas, tais como vinhos (SEHOVIC, PETRAVIC e MARIC, 2004).

O gene da enzima glicerol quinase de *Saccharomyces cerevisiae* foi integrada artificialmente na levedura *Pichia pastoris* para a produção desta proteína em maiores quantidades. Dessa forma, os objetivos do presente trabalho foram selecionar o melhor clone de *Pichia pastoris* geneticamente modificada e padronizar as metodologias de dosagens e de produção da enzima GK em diferentes condições de crescimento através de modificações no meio de cultura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

Pichia pastoris geneticamente modificada foi o micro-organismo utilizado na produção extracelular da enzima glicerol quinase (GK), a partir do gene GUT 1 integrado artificialmente no genoma da levedura. Essa levedura foi obtida em parceria com o grupo do Prof. Dr. Sandro R. Valentini, FCFar – Unesp. Para a construção dessa linhagem, o sistema de expressão da Invitrogen EasySelect® foi utilizado.

2.2. Detalhamento do trabalho experimental

O trabalho experimental consistiu no crescimento da levedura *Pichia pastoris* geneticamente modificada, em diferentes condições, na tentativa de induzir a expressão da enzima glicerol quinase no meio extracelular (atividade enzimática e conteúdo protéico) avaliando sua atividade fisiológica (crescimento e viabilidade celular).

2.3. Crescimento celular (determinação da biomassa)

A partir de uma suspensão concentrada de células da linhagem isolada, foi construída uma curva que relaciona a variação das absorbâncias com as massas secas correspondentes a cada suspensão diluída. Foi determinado um fator (F) relacionando o recíproco da inclinação desta curva para ser utilizado nos cálculos de biomassa. As leituras de densidade ótica foram realizadas em um espectrofotômetro e os seus valores convertidos em massa seca utilizando-se a fórmula:

$$\left[{}^{mg}/_{mL}\right] = F * \Delta A_{570nm} * diluição$$

2.4. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se a técnica de coloração com azul de metileno e fazendo a contagem de células (viáveis e totais) em câmara de Neubauer.

O método consiste na diluição da amostra com solução de Ringer, em que a suspensão celular convenientemente diluída é examinada ao microscópio, onde são feitas as contagens das células vivas e mortas. A determinação da viabilidade é dada em porcentagem.

Em um tubo de ensaio é adicionado 0,1 mL da suspensão de levedura do meio BMMY e 0,9 mL da solução de Ringer. O tubo é fechado e agitado intensamente por 30 segundos e logo após é deixado em repouso por 1 minuto para posterior leitura.

A contagem das células viáveis na amostra é feita em microscópio, nos aumentos de 400 a 600 vezes, sendo que as células vivas ficam incolores e as mortas ficam azuis.

O cálculo da viabilidade celular é expresso em porcentagem, pela seguinte equação:

$$Viabilidade = \frac{células\ vivas}{células\ vivas + células\ mortas} * 100$$

2.5. Curva de crescimento

A curva de crescimento faz-se necessária para verificar o perfil do crescimento do micro-organismo e verificar o melhor tempo de acúmulo de produção de biomassa.

A curva de crescimento (determinação de biomassa) foi feita em meio BMGY, e nesse período de crescimento pôde ser feita a medida de viabilidade celular.

2.6. Curva de tempo

A curva de tempo foi feita em meio BMMY, com medida de biomassa, viabilidade celular, atividade enzimática e produção de proteína.

2.7. Preparação das células de *Pichia pastoris* para a indução da glicerol quinase

Inicialmente, as células foram crescidas em meio YPDA por 24 horas a 30°C. Para o preparo do pré-inoculo, uma alça de célula foi transferida para 25 mL de meio BMGY contidos em Erlenmeyer de 125 mL e submetidas à agitação por 24 horas a 120 rpm à 30ºC.

As células foram mantidas em repouso à 4ºC por aproximadamente 2 horas para a sedimentação da biomassa. O sobrenadante foi descartado, e as células concentradas foram utilizadas como inoculo, para uma densidade inicial de célula de 0,05 mg/mL, em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de BMMY. Os experimentos foram realizados em mesa agitadora operando a 120 rpm à 30ºC durante 48 horas.

Após as primeiras 24 horas em meio BMMY, foi adicionado um volume de metanol para concentração final de 0,5% para manutenção da indução a fim de realizar a medida da atividade da enzima estudada.

Após as 48 horas de crescimento e indução em BMMY, foi feita a determinação de biomassa e viabilidade celular. Em seguida, o conteúdo do meio foi reunido e centrifugado a 15.000 *x g* durante 10 minutos, a fim de retirar as células de levedura e ficar com o sobrenadante, o qual deveria conter a enzima de interesse, já que a levedura geneticamente modificada secreta a enzima glicerol quinase no meio extracelular.

Logo em seguida, o meio foi concentrado utilizando membranas filtrantes da Amicon® Ultra-15 centrifugal filter devices with low-binding Ultracel® membranes, User Guide MILLIPORE (modelo 10.000 MWCO) através de centrifugação a 2800 *x g* a temperatura de 17ºC, para posterior dosagem de glicerol quinase e determinação da proteína total.

2.7.1. Seleção e comparação de clones

Dos vários transformantes obtidos em parceria com o grupo do Prof. Dr. Sandro R. Valentini, FCFar – Unesp, quatro clones de *Pichia pastoris* foram submetidos à indução da

produção da enzima glicerol quinase de acordo com o protocolo sugerido pelo sistema EasySelect® (Invitrogen).

2.7.2. Padronização da concentração do meio

Com o intuito de aumentar a atividade da enzima glicerol quinase, o meio de cultura BMMY foi concentrado através de membranas filtrantes Amicon® Ultra-15 centrifugal filter devices with low-binding Ultracel® membranes, User Guide MILLIPORE (modelo 10.000 MWCO) e o concentrado obtido utilizado na dosagem analítica da GK. Todos os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio cada um, utilizando dois Erlenmeyer para cada tentativa de concentração, totalizando 50 mL de meio para cada experimento.

Os testes foram feitos concentrando o meio 10, 20, 30, 40 e 50 vezes.

2.7.3. Efeito do tamanho do inoculo

Em aplicações industriais, a levedura é muitas vezes propagada em uma série de etapas até que seja inoculada no meio que será fermentado. A cultura utilizada para inoculação, em muitos casos, não está bem definida, apesar de sua condição fisiológica poder afetar muito o resultado, bem como a duração da fermentação (BREJNING e JESPERSEN, 2002), por isso, é interessante conhecer o efeito do tamanho do inoculo.

Geralmente, uma elevada densidade de células é desejável, pois a secreção de proteínas no meio aumentará proporcionalmente (INAN et al., 1999). No entanto, isso nem sempre é o caso. Ando, Arunwanich e Kobayashi (1996) verificaram que o aumento na densidade de células antes da fase de indução, na produção de anticorpos, diminuiu em *Pichia pastoris*.

Após a seleção do melhor clone da levedura geneticamente modificada e da padronização da concentração do meio, estudou-se o efeito do tamanho do inoculo a fim de se obter o melhor valor de atividade enzimática. Dessa forma, variou-se as densidades iniciais de célula de 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/mL.

2.7.4. Efeito da concentração de metanol na fase de indução no meio de cultura

A concentração de metanol na cultura deve ser mantida dentro de um intervalo relativamente estreito, pois o acúmulo de metanol leva a efeitos citotóxicos (GUARNA et al., 1997) e a indução do promotor é maior quando o nível de metanol é mantido a uma taxa de crescimento limitado (BOETTNER et al., 2002).

Foram testadas concentrações de 0,25%; 0,5%; 1%; 2% e 3% de metanol no meio de cultura BMMY após 48 horas de crescimento e indução.

2.7.5. Efeito da natureza do tampão no meio de cultura

Foi realizado experimento utilizando o meio BMMY contendo tampão fosfato de potássio 100 mmol/L (controle), tampão citrato de potássio 100 mmol/L e tampão citrato fosfato de potássio 100 mmol/L (todos a pH 6,0) para determinar a natureza do tampão que melhor expressasse a enzima glicerol quinase.

2.7.6. Efeito do pH

Segundo CREGG et al. (1993), o melhor pH do meio de cultura da *P. pastoris* para expressão de proteínas recombinantes pode variar na faixa de pH de 3,0 a 7,0. Com base nestes dados, realizamos experimentos na faixa de pH 4,0 a 8,0, sendo que o tampão utilizado para valores de pH de 4,0; 5,0 e 6,0 foi feito com tampão citrato fosfato, e valores de pH de 6,0; 7,0 e 8,0 foi feito com tampão fosfato.

2.7.7. Efeito da suplementação do meio BMMY

De acordo com os estudos da literatura, a suplementação do meio com outros substratos, diferentes do metanol, contribuem com o maior crescimento da levedura *Pichia pastoris*, podendo ser relevante para a atividade da enzima que se deseja expressar

(KATAKURA et al., 1998; ZHANG, INAN e MEAGUER, 2000; ZHANG et al., 2003; JUNGO et al., 2007).

Para aumentar a produção de proteínas heterólogas, densidade celular, bem como reduzir o tempo de indução, uma abordagem comum é o uso de diferentes fontes de carbono além do metanol (FILES et al., 2001). O sorbitol, por exemplo, é uma fonte de carbono interessante que pode ser adicionado juntamente com o metanol para produção de proteínas recombinantes de *Pichia pastoris* (ARNAU et AL., 2010; WANG et al., 2010).

A partir do estudo realizado por Xie et. al (2005), testamos a suplementação do meio BMMY, com metanol (controle), ácido lático, sorbitol, acetato de amônio e glicerol, todos eles na concentração de 1%.

2.7.8. Efeito de peptonas de diferentes procedências

Um dos mais importantes pontos da formulação do meio de cultura é a fonte de nitrogênio, já que este elemento afeta a produção de proteínas. O nitrogênio é um elemento essencial encontrado em quase todas as macromoléculas (proteínas e ácidos nucléicos) dos organismos vivos (CHOI e PARK, 2006). Assim, com base nestas informações, testamos diferentes marcas de peptonas no meio controle de indução (BMMY).

As marcas testadas foram às seguintes: Bacto peptone (controle), Acumedia A, Difco, Merck (caseína) e Merck (carne).

2.7.9. Efeito da adição de sulfato de amônio

As leveduras podem utilizar uma ampla variedade de compostos nitrogenados e, entre estes, estão o íon amônio, aminoácidos e peptídeos. A adição do nitrogênio está diretamente relacionada com o aumento da atividade proteolítica e com o controle do pH e redução da fase lag do crescimento. Assim, realizamos ensaios com culturas crescidas em meio BMMY com adição de 1% de sulfato de amônio.

2.7.10. Efeito da adição da caseína e glicina

Extrato de levedura, peptona e casaminoácidos são ricos em peptídeos e aminoácidos, e, também, contém vitaminas e elementos traços. Esses compostos podem aumentar a biomassa e a síntese de proteínas heterólogas (BOZE et al., 2001).

A adição de casaminoácidos pode minimizar a degradação proteolítica na produção dessas proteínas heterólogas (TSUJIKAWA et al., 1996).

Segundo Silva (2009), em ensaio para a produção da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, foi testada a suplementação do meio BMMY com caseína 1% e 2% e também glicina 0,4 mol/litro. A partir disso, foi realizado o mesmo experimento, porém, para a produção de glicerol quinase.

2.7.11. Efeito do meio de crescimento BSM

O meio mais comumente utilizado para a fermentação de altas densidades de células de *P. pastoris* é o meio básico contendo sais (BSM) conforme mencionado nas diretrizes de processos de fermentação de *P. pastoris* propostas pela Invitrogen EasySelect® (EUA). Ele é considerado o primeiro meio utilizado na produção de proteínas recombinantes, embora possa não ser ótimo para produção de todas as proteínas heterólogas e tem alguns problemas importantes como precipitação, composição desequilibrada e elevada força iônica, etc. (COS et al., 2006).

Outros autores também utilizam o meio BSM para a produção de proteínas heterólogas (XIE et al., 2005; GHOSALKAR, SAHAI e SRIVASTAVA, 2008; WANG et al., 2010).

Com base nestas literaturas, foi realizado um experimento utilizando este meio em comparação com o meio BMMY (controle).

2.7.12. Efeito da liofilização do meio BMMY

Na tentativa de otimizar a produção da GK, utilizamos o processo de liofilização para concentrar a enzima. Neste ensaio, após o cultivo da levedura e indução da GK em meio BMMY, as células foram separadas por centrifugação e o sobrenadante foi congelado e liofilizado.

Uma amostra contendo 0,45 g do material liofilizado foi suspensa em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,01mol/L pH 7,2 para dosagem de atividade.

Foram feitos os seguintes ensaios: um controle (amostra sem liofilização), uma amostra liofilizada e outra, também liofilizada, contendo β-mercaptoetanol 2 mmol/L e sulfato de manganês 10 mmol/L.

2.8. Ensaio da atividade da enzima glicerol quinase (GK)

A reação enzimática da glicerol quinase foi realizada no ensaio e nos procedimentos de leitura e cálculo da atividade em espectrofotômetro, por meio de uma modificação de ensaio de WIELAND, 1962, utilizando-se da seguinte mistura: 0,07 mL de NAD 0,02 mol/L; 0,07 mL de ATP 0,05 mol/L; 0,9 mL de tampão glicina-hidrazina (0,1 mol/L de tampão glicina/HCl a pH 9,8, contendo 0,88 mol/L de hidrato de hidrazina); 0,9 mL de glicerol 6 mM; 0,210 mL de sulfato de magnésio 0,2 mol/L; 0,330 mL de cloreto de cálcio 0,1 mol/L; 0,220 mL de água destilada; 0,400mL de glicerol-3-fosfato desidrogenase (Sigma nº G6751); 0,200 mL de extrato enzimático (glicerol quinase) diluído, totalizando 3,3 mL em cubeta de quartzo, em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm.

Tanto a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, quanto o extrato enzimático de glicerol quinase foram diluídos em solução tampão Tris-NaF 10 mmol/L, pH 7,2.

A atividade da enzima foi observada mediante os seguintes passos: O espectrofotômetro foi ajustado a 340 nm e a velocidade de reação foi ajustada de 15 em 15 segundos durante um intervalo de 90 segundos. O aparelho foi zerado com o branco substrato, que é preparado com todos os reagentes da reação excetuando-se a amostra

enzimática, que é substituída por água destilada, tendo como objetivo descontar a absorbância de cada reagente na reação final.

Iniciou-se o processo com a leitura do branco-enzima, preparado com todos os reagentes excetuando-se o substrato, cujo objetivo é descontar da reação a absorbância dada pela amostra contendo a enzima. Fez-se a leitura da reação contendo todos os reagentes e a amostra contendo a enzima.

Os valores do branco-enzima foram subtraídos dos valores da reação contendo a amostra enzimática e as diferenças foram utilizadas para a realização dos cálculos de atividade e a obtenção das curvas de tempo.

$$U/_{mL} = \frac{\Delta A * V * dil}{\Delta t * \varepsilon * d * v}$$

Onde:

ΔA= variação da absorbância no comprimento de onda em λ = 340nm

V = volume do ensaio (mL)

dil = diluição da enzima

Δt = variação do tempo (min)

ε = coeficiente de absortividade molar do NADH ($6{,}22 \times 10^{6} M \times cm^{-1}$)

d = caminho ótico (cm)

v = volume de amostra no ensaio (mL)

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

2.9. Determinação da proteína total do extrato celular de levedura

O conteúdo protéico (Cp) do extrato celular de levedura foi determinado pelo método LOWRY et. al, (1951), tendo soroalbumina bovina como padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção e comparação de clones

Os quatro clones da levedura geneticamente modificada foram submetidos à análise da atividade da enzima glicerol quinase, e apresentaram diferenças entre si (Tabela 1). Verifica-se que o clone quatro possui o maior valor de atividade e atividade específica. Logo, esse clone foi utilizado para os demais experimentos e será utilizado ao longo deste trabalho.

Tabela 1. Atividade da glicerol quinase dos diferentes clones

Clones	Atividade U/mL	Atividade Específica U/mg x 10^{-3}
1	0,207 ± 0,05	14,0 ± 2,00
2	0,127 ± 0,02	8,0 ± 1,00
3	0,00	0,00
4	0,318 ± 0,00	20,0 ± 2,00

[a] condições: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de célula de 0,05mg/mL e 2 dias de indução.

3.2. Crescimento celular (determinação da biomassa)

O fator de conversão (F) utilizado foi 0,28 $(\text{mgcélula/mL})^{-1}$, que foi obtido para o espectrofotômetro UV-visível Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences), e representa a correlação entre valores de massa seca e absorbância. A fórmula geral utilizada foi a seguinte: [mg/mL] = F x ΔA x diluição. O valor de F corresponde ao coeficiente angular desta curva.

A massa seca das suspensões concentradas de células para a linhagem de levedura *P. pastoris* (7,36 mg/mL) foi determinada e, a partir desta suspensão concentrada, foram feitas diluições. A Figura 2 mostra a curva que relaciona as massas secas equivalentes, de cada suspensão diluída, com as absorbâncias.

A regressão linear Y = A + B*X mostrou os seguintes parâmetros: A = 3,52222 com desvio de 0,22979, B = 0,07451 com desvio de 0,03319 e o fator de correlação da reta (R = 0,9916). O coeficiente angular (F = 1/B = 1/0,07451) considerado foi o fator de correlação F = 0,28 com desvio padrão (SD) de 0,00258.

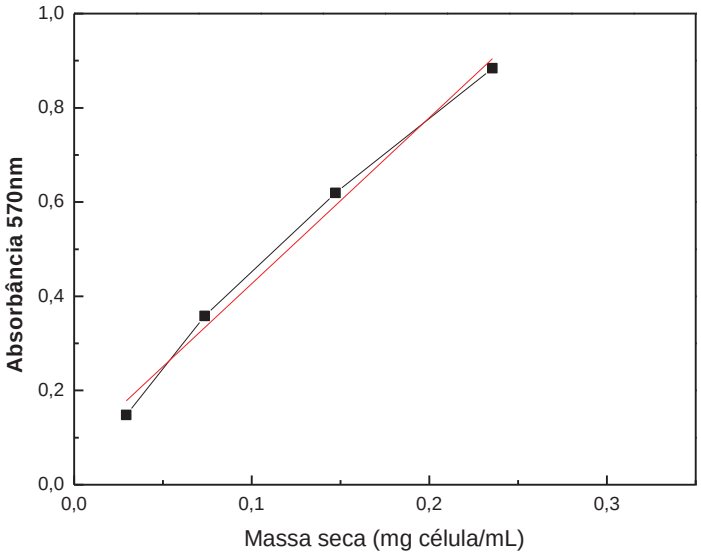

Figura 2. Determinação de massa seca (mg células/mL) da linhagem *P. pastoris* em absorbância a 570 nm.

3.3. Curva de crescimento

A partir do crescimento da levedura em meio BMGY foi possível verificar no período de 120 horas a produção de biomassa e a viabilidade (Figura 3).

Segundo Peres et al., (2010), para produção da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, também utilizando o sistema *Pichia pastoris*, o crescimento da levedura no meio BMGY pode ser realizado no tempo de 24 horas, sem prejuízo da geração da proteína

heteróloga. Também optamos pelo crescimento de 24 horas no preparo do inoculo nos demais ensaios.

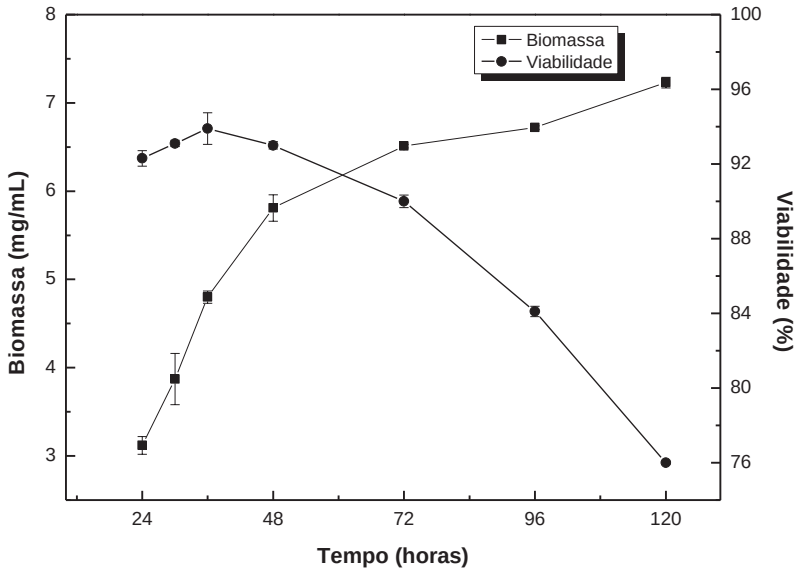

Figura 3. Determinação de biomassa e viabilidade celular do crescimento de *Pichia pastoris* em meio BMGY.

3.4. Curva de crescimento

Após 96 horas de crescimento e indução em meio BMMY, foi possível detectar o tempo ideal para a determinação da máxima atividade enzimática, que no caso foi de 48 horas. Na figura 4 encontra-se a produção de biomassa e viabilidade celular, e na figura 5 encontra-se a atividade enzimática, a qual sugere que os demais experimentos foram realizados com 48 horas de indução para a expressão da enzima glicerol quinase.

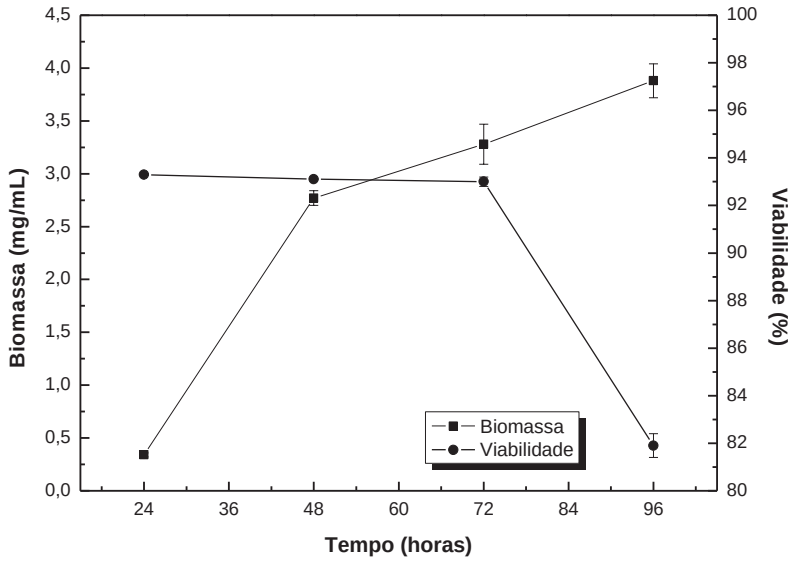

Figura 4. Determinação de biomassa e viabilidade celular do crescimento de *Pichia pastoris* em meio BMMY.

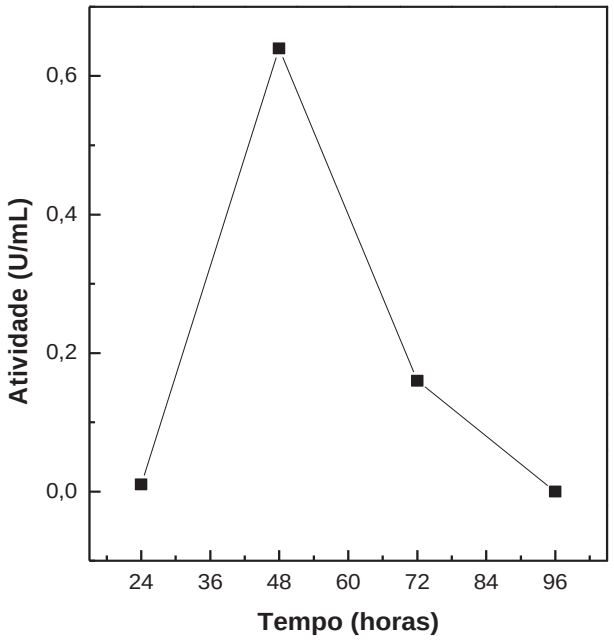

Figura 5. Atividade da glicerol quinase de *Pichia pastoris* em função do tempo em meio BMMY.

3.5. Padronização da concentração do meio BMMY

O melhor resultado obtido foi na concentração de 20 vezes (Figura 6), possuindo um melhor valor na atividade enzimática e específica, e, portanto, passamos a utilizar esta padronização para quantificar a atividade da GK.

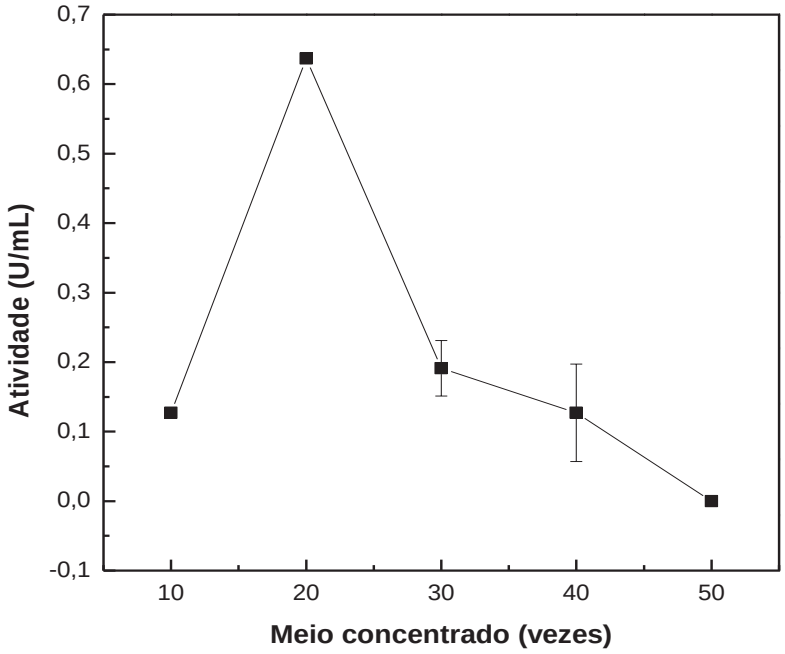

Figura 6. Determinação da atividade da glicerol quinase em função da concentração do meio de cultura.

3.6. Efeito do tamanho do inoculo

Análises de biomassa, viabilidade e atividade de glicerol quinase após 48 horas de crescimento foram obtidas com a levedura *P. pastoris* utilizando densidades iniciais de célula (tamanho do inoculo) de 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/mL e estão representados graficamente nas figuras 7 e 8. A decisão pela melhor concentração inicial de células foi feita levando-se em consideração a atividade da enzima, embora a biomassa tenha aumentado com o aumento do inoculo. Assim, a partir destes dados optamos pela concentração de 0,1 mg/mL, pois apresentou maior atividade.

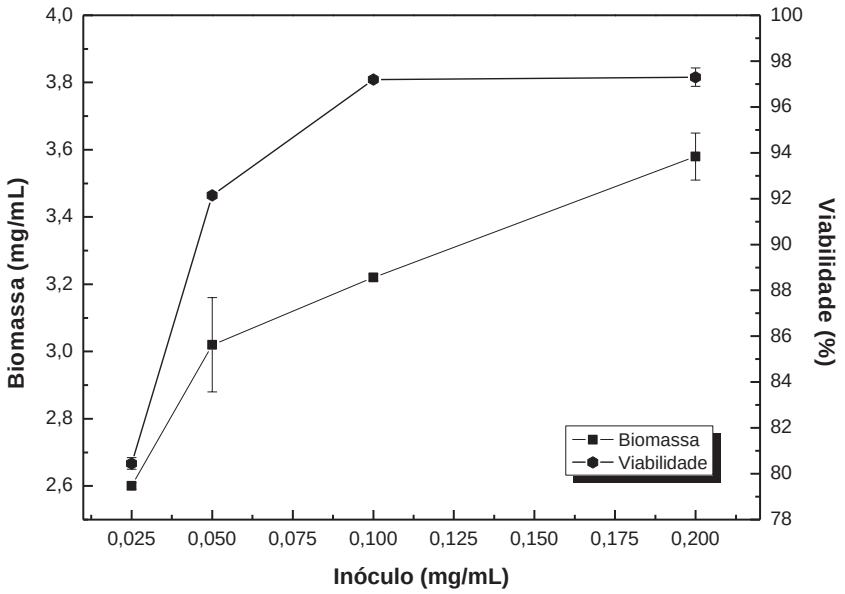

Figura 7. Determinação da produção de biomassa e viabilidade em função da densidade inicial de células de *Pichia pastoris*.

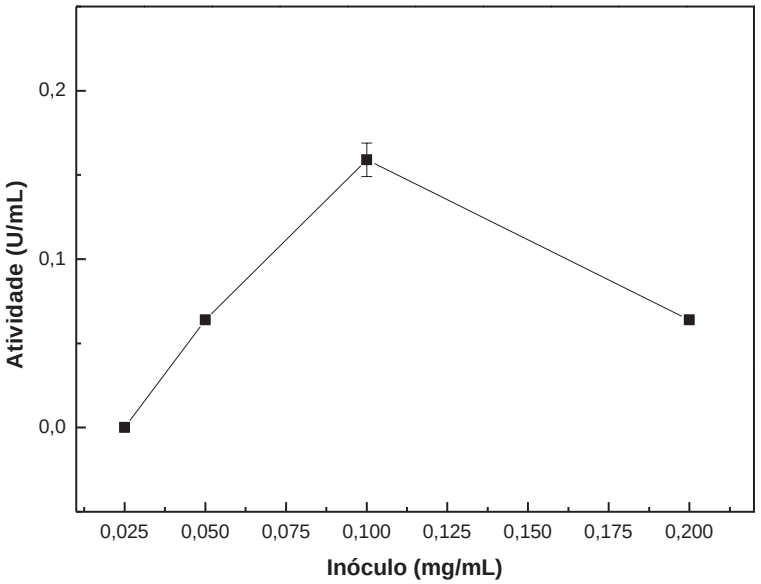

Figura 8. Atividade da enzima glicerol quinase em função da densidade inicial de células de *Pichia pastoris.*

3.7. Efeito da concentração de metanol na fase de indução no meio de cultura

Normalmente, a concentração de metanol no meio de cultura para indução de proteínas recombinantes varia de 0,5 -1,0% (v/v) usando o sistema *Pichia pastoris*. Mas, há variações na concentração de metanol, de 0,15 à 1,0% (v/v), como foi utilizado para a elevação dos nos níveis de expressão da β-2-glicoproteina I domínio V (DALY e HEARN, 2005).

Testamos concentrações de 0,25%; 0,5%; 1%; 2% e 3% de metanol no meio de cultura após 48 horas de crescimento e indução, e os dados obtidos estão expressos nas Figuras 9 e 10. Optamos por utilizar a concentração de 1% de metanol no meio de cultura nos experimentos seguintes visto que apresentou um melhor valor de atividade enzimática.

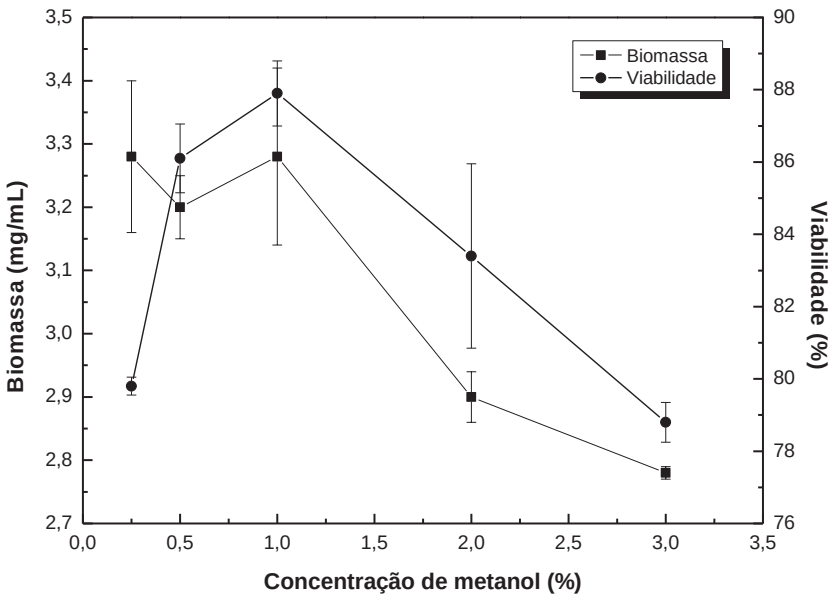

Figura 9. Efeito da concentração de metanol sobre a produção de biomassa e viabilidade celular.

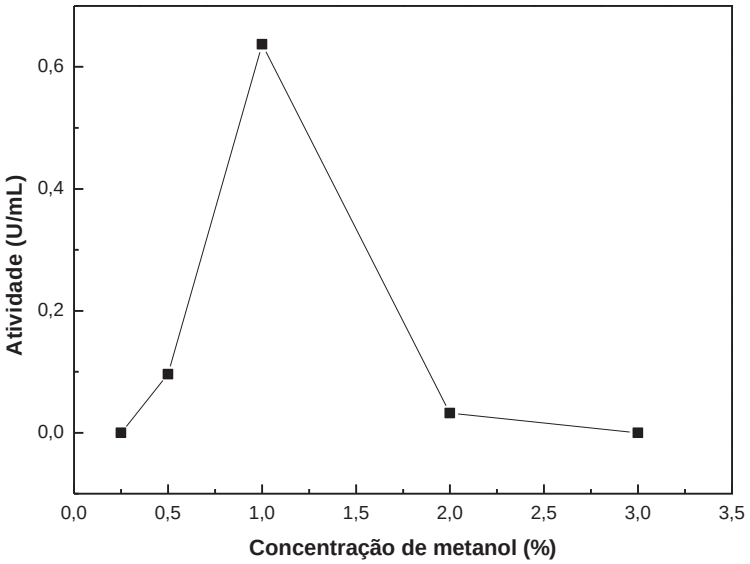

Figura 10. Efeito da concentração de metanol sobre a atividade da enzima glicerol quinase.

3.8. Efeito da natureza do tampão no meio de cultura

De acordo com a literatura, o pH de melhor expressão para diferentes enzimas pode variar (CREGG et. al.,1993), por isso, experimentos foram realizados utilizando o meio BMMY contendo tampão fosfato de potássio 100 mmol/L (controle), tampão citrato de potássio 100 mmol/L e tampão citrato fosfato de potássio 100 mmol/L (todos a pH 6,0) para determinar a natureza do tampão que melhor expressasse a enzima glicerol quinase.

Os dados de produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade estão apresentados na Tabela 2. Em relação ao acúmulo de biomassa, inicialmente os três tampões foram similares, mas o tampão fosfato de potássio mostrou-se melhor em atividade enzimática, assim, o tampão fosfato de potássio foi considerado como ideal para os próximos experimentos.

Tabela 2. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de diferentes tampões.

				Atividade	
Tampão	**Biomassa (mg/mL)**	**Viabilidade (%)**	**Proteína (mg/mL)**	**(U/mL)**	**(U/mg x 10^{-3})**
Fosfato de potássio	3,44 ± 0,02	93,90 ± 1,50	20,18 ± 1,44	0,637 ± 0,72	31,57
Citrato de potássio	3,02 ± 0,01	65,60 ± 1,60	17,68 ± 1,40	0,00	0,00
Citrato fosfato de potássio	3,91 ± 0,01	94,20 ± 0,15	23,20 ± 1,18	0,255 ± 0,03	10,99

3.9. Efeito do pH

Segundo Inan et al. (1999), a produção da proteína heteróloga AcAP-5 (anticoagulant peptide) apresentou máxima expressão em pH entre 6,8 e 7,0, evitando a degradação proteolítica.

No presente estudo, observa-se, que o pH 6,0 (tampão fosfato de potássio 100 mmol/L) foi o melhor e que coincide com os protocolos sugeridos EasySelect (Invitrogen), em que este meio é o mais indicado na indução da expressão de proteínas heterólogas. Os dados de produção de biomassa e atividade da GK estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de diferentes valores de pH, com tampão citrato fosfato de potássio 100 mmol/L.

				Atividade	
pH	**Biomassa (mg/mL)**	**Viabilidade (%)**	**Proteína (mg/mL)**	**(U/mL)**	**(U/mg x 10^{-3})**
4,0	3,49 ± 0,05	93,30 ± 1,45	14,66 ± 1,43	0,00	0,00
5,0	3,60 ± 0,03	93,00 ± 1,50	17,16 ± 0,83	0,00	0,00
6,0	3,91 ± 0,01	94,20 ± 0,15	23,20 ± 1,18	0,255 ± 0,03	10,99

Tabela 4. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de diferentes valores de pH, com tampão fosfato de potássio 100 mmol/L.

				Atividade	
pH	**Biomassa (mg/mL)**	**Viabilidade (%)**	**Proteína (mg/mL)**	**(U/mL)**	**(U/mg x 10^{-3})**
6,0	3,48 ± 0,05	93,00 ± 0,20	15,91 ± 1,74	1,569 ± 0,06	98,62
7,0	3,18 ± 0,02	82,40 ± 3,00	14,24 ± 1,00	1,315 ± 0,04	92,35
8,0	2,53 ± 0,19	66,80 ± 0,15	13,72 ± 0,94	0,382 ± 0,00	27,84

3.10.Efeito da suplementação do meio BMMY

Segundo McGrew et al. (1997), em alguns casos, a adição de glicerol leva a aumentos na formação de biomassa e maior produção de proteína recombinante, que coincidiu com o presente estudo. Após adicionar diferentes fontes de carbono como ácido lático, sorbitol, acetato de amônio e glicerol, verificamos que com a adição de glicerol houve um maior aumento na produção de biomassa e, também, da atividade enzimática (Tabela 5).

Dessa forma, optamos por trabalhar com o meio com este tipo de suplementação nos experimentos seguintes.

Estratégias de alimentação mista, em que o metanol e o glicerol são adicionados simultaneamente durante a fase de indução, têm sido aplicados para aumentar o rendimento da proteína heteróloga (LOEWEN et al., 1997), também confirmando o resultado deste estudo.

A adição de glicerol juntamente com o metanol é vantajosa, pois a utilização simultânea desses substratos garante o crescimento das células, enquanto induz a expressão da proteína heteróloga (THORPE, D'ANJOU e DAUGULIS, 1999). No entanto, o nível máximo de expressão de proteína pode não ser alcançado devido à repressão parcial do promotor AOX1 pelo glicerol residual (HANG et al., 2009). Assim, várias fontes de carbono não repressivas tem sido recentemente estudadas a fim de substituir o glicerol para produção de proteína recombinante (THORPE, D'ANJOU e DAUGULIS, 1999).

Para Xie et al. (2005), o sorbitol é amplamente aceito como fonte de carbono não repressiva para *Pichia pastoris*, que pode produzir níveis similares de proteína comparada àqueles em que se adiciona glicerol. Porém, o presente estudo apresentou atividade enzimática nula com a adição de sorbitol, embora a biomassa tenha aumentado em relação à adição das demais fontes de carbono.

O uso de fontes de carbono que ajudam no crescimento e que não reprimem o promotor AOX1 é essencial para o processo de fermentação (XIE et al., 2005).

Tabela 5. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase com diferentes suplementações do meio.

Meio	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade (U/mg x 10^{-3})
BMMY (controle)	3,53 ± 0,04	94,14 ± 0,48	14,14 ± 0,18	0,764 ± 0,52	54,03
BMMY + ácido lático	3,33 ± 0,08	90,88 ± 1,65	15,59 ± 0,31	0,127 ± 0,00	8,15
BMMY + glicerol	6,02 ± 0,11	98,31 ± 0,33	14,55 ± 0,95	0,891 ± 0,00	118,14
BMMY + acetato de amônio	3,62 ± 0,05	93,79 ± 1,10	13,93 ± 0,18	0,509 ± 0,00	36,54
BMMY + sorbitol	5,67 ± 0,15	94,14 ± 0,52	14,94 ± 0,54	0,00	0,00

3.11.Efeito de peptonas de diferentes procedências

Testamos peptonas de diferentes procedências no meio controle de indução (BMMY) e os dados estão expressos na Tabela 6.

A peptona da Difco apresentou melhor valor de atividade enzimática, e a Acumedia A foi a melhor em relação à atividade específica, porém passamos a utilizar nos próximos experimentos a da marca Difco por ter quantidade suficiente em nosso laboratório para a continuidade do presente estudo.

Tabela 6. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de peptonas de diferentes procedências.

Peptonas	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade (U/mg x 10^{-3})
Bacto (controle)	5,99 ± 0,07	96,90 ± 0,85	13,61 ± 3,31	0,509 ± 0,00	37,4
Acumedia A	5,50 ± 0,04	97,10 ± 0,40	9,24 ± 3,07	0,700 ± 0,58	75,76
Difco	6,69 ± 0,07	98,40 ± 0,45	45,48 ± 4,15	0,764 ± 0,00	16,68
Merck (caseína)	7,10 ± 0,02	98,30 ± 0,40	15,39 ± 2,95	0,00	0,00
Merck (carne)	6,00 ± 0,01	98,30 ± 0,00	11,32 ± 2,55	0,00	0,00

3.12.Efeito da adição de sulfato de amônio

Realizamos ensaios com culturas crescidas em meio BMMY com adição de 1% de (NH4)2SO4 e os dados estão apresentados na Tabela 7. Observa-se que a atividade proteolítica aumenta no meio de cultura com a adição de sulfato de amônio, mas não há

melhorias na produção enzimática. Então o meio controle, sem adição de sulfato de amônio, foi utilizado nos próximos experimentos.

Tabela 7. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de sulfato de amônio.

				Atividade	
$(NH_4)_2SO_4$	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Proteína (mg/mL)	(U/mL)	(U/mg x 10^{-3})
pH 6 (controle)	6,79 ± 0,08	97,00 ± 0,09	39,55 ± 0,18	0,509 ± 0,00	12,87
pH 6 com $(NH_4)_2SO_4$	6,51 ± 0,27	94,41 ± 0,28	54,03 ± 2,71	0,382 ± 0,00	7,07

3.13.Efeito da adição da caseína e glicina

Segundo Hu et al., (2006) e Riedstra et al., (2007) a adição de 2% casaminoácidos em meio BMMY para produção de anticorpo de cadeia simples (scFv) utilizando o micro-organismo *Pichia pastoris* aumentou cerca de 1,5 vezes, enquanto a utilização de 0,4M de glicina no meio BMMY mostrou redução significativa do anticorpo, a partir da *Pichia pastoris* (RIEDSTRA et al., 2007).

Em nossos experimentos (Tabela 8), não foi possível realizar a medida de atividade enzimática nos ensaios com adição de caseína, visto que com a adição desta, o meio BMMY ficou viscoso, impedindo a concentração em membrana filtrante.

Com a adição de glicina 0,4 mol/litro no meio BMMY, houve indução da síntese da glicerol quinase pela levedura, mas sem a adição desta, a atividade enzimática foi maior. Dessa forma, o meio BMMY permaneceu sem adição de caseína 1%, 2% e glicina 0,4 mol/litro nos próximos experimentos.

Tabela 8. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase na presença de caseína 1% e 2% e glicina 0,4 mol/litro.

				Atividade	
Meio	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Proteína (mg/mL)	(U/mL)	(U/mg x 10^{-3})
BMMY (controle)	6,93 ± 0,43	96,19 ± 0,32	18,20 ± 1,09	0,509 ± 0,13	28,00
BMMY + caseína 1%	8,32 ± 0,25	97,45 ± 0,35	50,07 ± 2,35	0,00	0,00
BMMY + caseína 2%	8,91 ± 0,41	80,00 ± 0,33	50,80 ± 1,00	0,00	0,00
BMMY + glicina 0,4M	6,89 ± 0,09	95,68 ± 0,27	19,55 ± 0,79	0,382 ± 0,00	19,54

3.14.Efeito do meio de crescimento BSM

Não obtivemos bons resultados em relação ao meio BSM devido ao baixo conteúdo de biomassa e atividade enzimática nula (Tabela 9), além de problemas no preparo do meio, tais como: precipitação e turvação, que segundo ZHANG et al. (2003), o meio BSM contém sais de cátions bivalentes e trivalentes que precipitam a pH acima de 5,5.

Assim, devido as dificuldade do uso do meio BSM, decidimos continuar os demais experimentos utilizando o meio BMMY.

Tabela 9. Produção de biomassa, viabilidade, proteína e atividade da glicerol quinase em meio BMMY e BSM.

				Atividade	
Meio	**Biomassa (mg/mL)**	**Viabilidade (%)**	**Proteína (mg/mL)**	**(U/mL)**	**(U/mg x 10^{-3})**
BMMY (controle)	7,25 ± 0,52	96,01 ± 0,02	31,43 ± 1,26	0,662 ± 0,44	21,06
BSM	4,23 ± 0,06	96,53 ± 0,66	6,23 ± 0,04	0,00	0,00

3.15.Efeito da liofilização

O sobrenadante da centrifugação (aproximadamente 46 mL) obtido a partir de 2 Erlenmeyers do crescimento da *Pichia pastoris* em meio BMMY foi congelado e liofilizado.

A Tabela 10 mostra os resultados do efeito da liofilização do extrato bruto sobre a atividade da GK. O proceso de liofilização da amostra resultou no aumento da atividade da enzimática. A enzima liofilizada com adição de β-mercaptoetanol 2 mmol/L e sulfato de manganês 10 mmol/L também obteve uma melhora na atividade da GK, quando comparado à amostra concentrada em membrana filtrante (controle).

Tabela 10. Efeito da liofilização sobre a atividade enzimática presente no sobrenadante do meio de cultivo BMMY.

Amostras	(U/mL)
BMMY (controle)	0,662 ± 0,44
Liofilizado	0,955 ± 0,00
Liofilizado com mercaptoetanol e sulfato de manganês	0,318 ± 0,09

4. CONCLUSÃO

A partir dos ensaios realizados, as melhores condições obtidas foram:

- O clone de *Pichia pastoris* selecionado foi o de número quatro.
- O tempo de crescimento em meio BMGY foi de 24 horas, e o tempo de indução no meio BMMY de 48 horas.
- O tamanho de inoculo para a produção da enzima GK foi de 0,1 mg/mL.
- A concentração inicial de metanol no meio BMMY e a indução por este álcool foi de 1%.
- A solução tampão selecionada para o meio BMMY é tampão fosfato de potássio 100 mmol/L pH 6,0.
- A suplementação do meio BMMY com 1% de glicerol resultou no aumento de atividade da GK em torno de 17%.
- A melhor marca de peptona utilizada no meio BMMY foi Difco. Peptonas da marca Merck (caseína) e Merck (carne) inibiram completamente a secreção da enzima no meio de indução.
- A adição de 1% de sulfato de amônio no meio BMMY provocou uma redução na atividade da GK da ordem de 1,3 vezes.
- A adição de diferentes concentrações de caseína ou 0,4 mol/L de glicina não mostrou aumento de atividade da enzima.
- Não houve produção da enzima GK em meio BSM.
- A concentração da amostra através da liofilização foi mais favorável na determinação da atividade da GK.

5. REFERÊNCIAS

ARNAU, C.; RAMON, R.; CASAS, C.; VALERO, F. Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 494-500, 2010.

ANDO, K.; ARUNWANICH, P.; KOBAYASHI, T. Production of Fv fragment of monoclonal antibody from recombinant methylotrophic yeast, *Pichia Pastoris*. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 29, p. 390-393, 1996.

BOETTNER, M.; PRINZ, B.; HOLZ, C.; STAHL, U.; LANG C. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris.* **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 51-62, 2002.

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

BREJNING, J.; JESPERSEN, L. Protein expression during lag phase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae.* **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 27-38, 2002.

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

COS, O.; RAMON, R.; MONTESINOS, J.; VALERO, F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotropic yeast *Pichia* pastoris under different promoters. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 17-37, 2006.

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

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

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

GHOSALKAR, A.; SAHAI, V.; SRIVASTAVA, A. Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7906-7910, 2008.

GUARNA, M. M.; LESNICKI, G. J.; TAM, B. M., ROBINSON, J.; RADZIMINSKI, C. Z.; HASENWINKLE, D.; BORASTON, A.; JERVIS, E.; MACGILLIVRAY, R. T. A.; TURNER, R. F. B.; KILBURN, D. G. On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 279-286, 1997.

GUO, W.; WORLEY, K.; ADAMS, V.; MASON, J.; SYLVESTER-JACKSON, D.; ZHANG, Y.-H.; TOWBIN, J. A.; FOGT, D. D.; MADU, S.; WHEELER, D. A.; MCCABE, E. R. B. Genomic scanning for expressed sequences in xp21 identifies the glycerol kinase gene. **Nature Genetics**, v. 4, p. 367-372, 1993.

HANG, H.; YE, X.; GUO, M.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, S. A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p.185-188, 2009.

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

INAN, M.; CHIRUVOLU, V.; ESKRIDGE, K. M.; VLASUK, G. P.; DICKERSON, K. BROWN, S.; MEAGHER, M. M. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (Ancylostoma caninum) anticoagulant by *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 438-445, 1999.

JUNGO, C.; SCHENK, J.; PASQUIER, M,; MARISSON, I W.; STOCKAR, U VON. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the

production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 57-66, 2007.

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

LOEWEN, M. C., LIU, X., DAVIES, P. L., DAUGULIS, A. J. Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 480-486, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

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

MCGREW, J. T.; LEISKE, D.; DELL, B.; KLINKE, R.; KRASTS, D.; WEE, S.F.; ABBOTT, N.; ARMITAGE, R.; HARRINGTON, K. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. **Gene**, v. 187, p. 193-200, 1997.

PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M. Recombinant protein therapeutics - success rats, market trends and values to 2010. Nature Biotechnology, v. 22, n. 12, p. 1513-1519, 2004.

PERES, M. F. S.; SILVA, V. C; VALENTINI, S. R.; GATTÁS, E. A. L. Recombinant expression of glycerol-3-fosfato desidrogenase using the *Pichia pastoris* system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p.128-132, 2010.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, 2010.

RIEDSTRAS, S.; CEREJO, L.; BRÁS, S.; COSTA, P. M. P.; FERREIRA, J. P. M. Optimization of the conditions for the expression of na anti-transthyretin scFv in *Pichia pastoris.* **Abstracts/J. Biotec.**, v. 131, p. 251-252, 2007.

SAKASEGAWA, S.; TAKEHARA, H.; YOSHIOKA, I.; TAKAHASHI, M.; KAGIMOTO, Y.; MISAKI, H.; SAKURABA, H.; OHSHIMA, T. Increasing the thermostability of *Flavobacterium meningosepticum* glycerol kinase by changing Ser329 to Asp in the subunit interface region. **Protein Engineering**, v. 14, n. 9, p. 663-667, 2001.

SEHOVIC, D.; PETRAVIC, V.; MARIC, V. Glycerol and Wine Industry, Glycerol Determination in Grape Must and Wine. **Kem. Ind**. v. 53, n. 11, p. 505-516, 2004.

SILVA, V. C. **Indução da expressão da glicerol-3-fosfato desidrogenase em levedura.** 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara- SP, 2009.

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

TSUJIKAWA, M.; OKABAYASHI, K.; MORITA, M.; TANABE, T. Secretion of a variant of human single-chain urokinase-type plasminogen activator without an N-glycosylation site in the methylotrophic yeast, **Pichia pastoris** and characterization of the secreted product. **Yeast**, v. 12, p.541-53, 1996.

WANG, Z.; WANG, Y.; ZHANG, D.; LI, J.; HUA, Z.; DU, G.; CHEN, J. Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1318-1323, 2010.

WIELAND, O. Glycerol, U.V. Method**. Methods in enzymology**, v. 5, p. 354-361, 1962.

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

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

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

Capítulo 3 - Estudo de parâmetros cinéticos da enzima recombinante glicerol quinase.

RESUMO

No presente trabalho, a atividade da enzima glicerol quinase (GK; EC 2.7.1.30; ATP: glicerol 3-fosfotransferase), proveniente da levedura *Pichia pastoris* geneticamente modificada, foi otimizada. O extrato celular foi liofilizado e a atividade enzimática realizada por meio de uma modificação do ensaio de Wieland, 1962. A atividade máxima da GK foi obtida em pH 9,8, a 50ºC e 2,5 μM de substrato, por metodologia clássica, além da presença de sulfato de magnésio e diluição da enzima de 30 vezes. A enzima apresentou alta estabilidade térmica — a atividade foi completamente mantida até 50ºC, durante uma hora — e em pH 7,0 por 7 dias, e o extrato liofilizado mantido sob refrigeração apresentou queda na atividade enzimática. Calculados pelos métodos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee, o valor da constante de Michaelis (Km) da enzima variou entre 0,63 μM e 1,29 μM, e a Vmax, entre 1,03 U/mL e 1,43 U/mL. Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR) para melhor definição dos parâmetros da reação enzimática, observando-se que os valores máximos de atividade são obtidos aos maiores valores de pH e baixas temperaturas e a altas temperaturas e menores valores de pH, sem um ponto máximo no domínio experimental. Este modelo é descrito por uma superfície do tipo sela ("saddle-like surface"), ou seja, não possuem um único ponto estacionário (máximo), mas, sim, são caracterizadas por possuírem um conjunto de pontos que maximizam a resposta.

Palavras-chave: *Pichia patoris*, glicerol quinase, metodologia de superfície de resposta.

ABSTRACT

In this study, the activity of the enzyme glycerol kinase (GK, EC 2.7.1.30, ATP: glycerol 3-phosphotransferase) from the genetically modified yeast *Pichia pastoris* was optimized. The cell extract was lyophilized and enzymatic activity performed by a modification of the test Wieland, 1962. The maximum activity of GK was obtained at pH 9.8 at 50°C and 2.5 μM substrate by conventional method, besides the presence of magnesium sulfate and diluting the enzyme 30 times. The enzyme showed high thermal stability – the activity was fully maintained up to 50°C for one hour – and at pH 7.0 for 7 days and kept under refrigeration, freeze-dried extract showed a decrease in enzymatic activity. Calculated by the methods of Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf and Eadie-Hofstee, the value of Michaelis constant (Km) of the enzyme varied between 0.63 mM and 1.29 mM, and Vmax, between 1.03 U/mL and 1.43 U/mL. We used the response surface methodology (RSM) to better define the parameters of the enzymatic reaction, noting that the maximum activity is obtained at higher pH values and low temperatures and high temperatures and lower pH values, without a peak in the experimental field. This model is described by a surface of a saddle ("saddle-like surface"), and therefore do not have a single stationary point (maximum), but rather are characterized by having a set of points that maximize the response.

Keywords: *Pichia pastoris*, glycerol kinase, response surface methodology.

1. INTRODUÇÃO

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é um poderoso sistema de expressão para a produção de proteínas recombinantes (ÇELIK, ÇALIK e OLIVER, 2009). Em recentes estudos, mais de 500 proteínas foram clonadas e expressas usando esse sistema (FREIVALDS et al., 2011; HANG et al., 2009).

As vantagens deste sistema são a elevada expressão potencial (KOBAYASHI et al., 2000; RICHTER et al., 2006), eficiente secreção extracelular (INAN et al., 2006), modificações pós-traducionais (TSAI et al., 2006) e o crescimento em altas densidades celulares em um meio mínimo definido (CEREGHINO e CREGG, 2000; HONG, MEINANDER e JONSSON, 2002).

Além das vantagens citadas acima, esse sistema libera relativamente poucas proteínas endógenas no meio de cultura enquanto secretam grandes quantidades de proteína recombinante, sendo uma grande vantagem para uma subseqüente purificação (SHI et al., 2003).

A glicerol quinase é uma enzima que catalisa a transferência do fosfato terminal do ATP para o glicerol formando glicerol-3-fosfato e ADP (AGOSTO e MCCABE, 2006). Esta reação é reconhecida não somente em mamíferos, mas também em vários tipos de bactérias, fungos e protozoários (KUWADA et al., 2005).

Como a determinação de glicerol é importante para o controle de qualidade industrial, são necessários métodos rápidos, sensíveis, confiáveis e econômicos para a rotina de análise (OLIVEIRA et al., 2006).

Neste trabalho, descrevemos alguns parâmetros cinéticos da enzima glicerol quinase produzida pela levedura *Pichia pastoris* geneticamente modificada, e os resultados podem ser úteis para uma futura elaboração de um kit para determinação rápida e eficiente de glicerol em amostras fermentadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

Pichia pastoris geneticamente modificada foi o micro-organismo utilizado na produção extracelular da enzima glicerol quinase (GK), a partir do gene GUT 1 integrado artificialmente no genoma da levedura. Essa levedura foi obtida em parceria com o grupo do Prof. Dr. Sandro R. Valentini, FCFar – Unesp. Para a construção dessa linhagem, o sistema de expressão da Invitrogen EasySelect® foi utilizado.

2.2. Preparação das células de *Pichia pastoris* para a indução da glicerol quinase

Inicialmente, as células foram crescidas em meio YPDA por 24 horas a 30°C. Para o preparo do pré-inoculo, uma alça de célula foi transferida para 25 mL de meio BMGY contidos em Erlenmeyer de 125 mL e submetidas à agitação por 24 horas a 120 rpm à 30ºC.

As células foram mantidas em repouso à 4ºC por aproximadamente 2 horas para a sedimentação da biomassa. O sobrenadante foi descartado, e as células concentradas foram utilizadas como inoculo, para uma densidade inicial de célula de 0,1 mg/mL, em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de BMMY. Os experimentos foram realizados em mesa agitadora operando a 120 rpm à 30ºC durante 48 horas.

Após as primeiras 24 horas em meio BMMY, foi adicionado um volume de metanol para concentração final de 1% para manutenção da indução a fim de realizar a medida da atividade da enzima estudada.

Após 48 horas de crescimento e indução em BMMY, o conteúdo do meio foi reunido e centrifugado a 15.000 *x g* durante 10 minutos, a fim de retirar as células de levedura e ficar com o sobrenadante. Esse sobrenadante foi congelado e liofilizado.

Para a dosagem da atividade enzimática, uma amostra contendo 0,45 g do material liofilizado foi suspensa em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,01 mol/L pH 7,2.

2.3. Ensaio da atividade da enzima glicerol quinase (GK)

A reação enzimática da glicerol quinase foi realizada no ensaio e nos procedimentos de leitura e cálculo da atividade em espectrofotômetro, por meio de uma modificação de ensaio de WIELAND (1962), utilizando-se da seguinte mistura: 0,07 mL de NAD 0,02 mol/L; 0,07 de ATP mL 0,05 mol/L; 0,9 mL de tampão glicina-hidrazina (0,1 mol/L de tampão glicina/HCl a pH 9,8, contendo 0,88 mol/L de hidrato de hidrazina); 0,9 mL de glicerol 6 mM; 0,210 mL de sulfato de magnésio 0,2 mol/L; 0,330 mL de cloreto de cálcio 0,1 mol/L; 0,220 mL de água destilada; 0,400 mL de glicerol-3-fosfato desidrogenase (Sigma nº G6751); 0,200 mL de extrato enzimático (glicerol quinase) diluído, totalizando 3,3 mL em cubeta de quartzo, em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm.

Tanto a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, quanto o extrato enzimático de glicerol quinase foram diluídos em solução tampão Tris-HCl, contendo NaF 10 mmol/L, pH 7,2.

2.4. Concentração de substrato

Para a realização desse ensaio, utilizaram-se valores de concentração de glicerol de 0,25 μM, 0,50 μM, 0,75 μM, 1,25 μM e 2,50 μM.

Inicialmente foi feita a determinação da curva de substrato, com as concentrações citadas acima, e a partir disso, outros ensaios foram feitos para determinação do pH ótimo, temperatura ótima, etc. Após obter os melhores resultados, uma nova determinação de substrato foi feita com todos os valores ótimos obtidos a fim de construir uma curva de substrato otimizada.

O cálculo dos valores de Km e Vmax foi feito por três métodos, visando-se a uma comparação entre eles: Lineweaver-Burk (1/v *versus* 1/[S]), Hanes-Woolf ([S]/v *versus* [S]) e Eadie-Hofstee (v *versus* v/[S]), a partir da curva de substrato otimizada.

2.5. Determinação do pH de reação

Para a determinação do pH ótimo de reação, foram realizados ensaios com diversos valores: pH 9,0; pH 9,5; pH 9,8; pH 10,0 e pH 10,5 (tampão glicina-HCl).

2.6. Diluição do extrato enzimático

O extrato enzimático de glicerol quinase foi diluído em tampão Tris-HCl 0,01 mol/L, pH 7,2. As diluições foram de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 vezes.

2.7. Temperatura do ensaio

A temperatura ótima foi obtida pela realização de ensaios, nas mesmas condições, variando-se apenas as temperaturas de cada banho-maria, que foram de 25ºC (controle), 30ºC, 35ºC, 40ºC, 45ºC 50ºC, 55ºC, 60ºC e 70ºC

2.8. Efeito da adição de metais sobre a atividade da GK

A fim de testar o efeito de diferentes metais na atividade enzimática da glicerol quinase, foram realizados ensaios com os seguintes sais na concentração final do ensaio de 2mM: $MgSO_4$, Na_2SO_4, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, KCl, $CoCl_2$ e $FeCl_3$ (TININIS, 2001) e $ZnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ e $FeCl_2$ (HUANG et al., 1997).

2.9. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima glicerol quinase foi determinada pela medida de sua atividade após incubação do extrato, por uma hora, em temperaturas de 30ºC, 40ºC, 45ºC, 50ºC, 55ºC e 60ºC. Os valores foram comparados com um controle, em que a enzima se encontrava em temperatura de refrigeração (4ºC). Após uma hora, nas diversas

temperaturas, o extrato foi diluído em tampão Tris-HCl 0,01 mol/L pH 7,2, procedendo-se, então, a dosagem.

2.10.Estabilidade ao pH

O extrato enzimático foi armazenado a 30ºC (banho-maria), em diferentes valores de pH, por 11 dias, sendo realizadas dosagens de atividade periódicas. O tampão utilizado foi o Tris-HCl 0,01 mol/L (pH 7,0, pH 8,0 e pH 9,0).

A pré-incubação da enzima nos pH indicados foram feitas, mas a medida da atividade enzimática foi medida no pH ótimo (pH 9,8).

2.11.Estabilidade do extrato liofilizado

O extrato enzimático liofilizado foi armazenado em refrigeração (4ºC) por 68 dias, sendo realizadas dosagens de atividade periódicas para verificar a sua estabilidade.

2.12.Análise dos dados

Em um primeiro momento, foram realizados experimentos com a finalidade de se determinarem as melhores condições isoladas de ação da enzima glicerol quinase, testando os seguintes fatores: concentração de substrato (glicerol), pH reacional, diluição da enzima, temperatura e diferentes tipos de metais. Nessa fase, os dados considerados neste trabalho foram plotados em gráficos no software OriginPro® 7.0 (OriginLab Corporation).

Em uma segunda etapa, as melhores condições para a reação enzimática (temperatura da reação e pH do meio reacional) foram estabelecidas pela metodologia de superfície de resposta (MSR), mantendo constantes os restantes fatores (concentração de glicerol e diluição da enzima). Os experimentos foram feitos seguindo-se uma matriz central compósita rotativa (“Central Composite Rotatable Design”- CCRD) em função da temperatura de reação e pH do meio, que consiste num modelo fatorial (ensaios 1 a 4), com adição de pontos estrela (ensaios 5 a 8) e centrais (ensaios 9 a 12), (Tabela 11). Realizaram-

se assim 12 experimentos: 4 pontos fatoriais (níveis codificados como (+1) e (-1)), 4 pontos estrela (níveis codificados como (+α= 1,414) e (-α= -1,414)) e 4 pontos centrais (codificados como 0). A temperatura variou de 43ºC a 55ºC e o pH, de 9,5 a 10,1. O estabelecimento dessas variações foi baseado nos resultados previamente obtidos, onde a concentração de glicerol foi fixada em 2,5 μM e a enzima 10 vezes diluída.

Os experimentos foram feitos seguindo-se um modelo fatorial, com adição de pontos centrais, em função da temperatura de reação e pH do meio (Tabela 1). Realizaram-se 12 experimentos: 8 pontos fatoriais (níveis codificados como (+1) e (-1)) e 4 pontos centrais (codificados como 0). A temperatura variou de 43ºC a 55ºC, a concentração de substrato, e o pH, de 9,5 a 10,1. O estabelecimento dessas variações foi baseado nos resultados previamente obtidos.

Os resultados dos 12 experimentos foram analisados por meio do software "Statistica TM", versão 6 (Statsoft®, Tulsa, EUA). Calcularam-se os efeitos linear e quadrático de cada uma das variáveis independentes sob estudo, assim como suas interações na atividade da glicerol quinase. A significância foi avaliada por análise de variância. A superfície, descrita por uma equação polinomial de segundo grau em função dos fatores com efeito significativo, foi ajustada aos dados experimentais, sendo o ajuste avaliado pelos coeficientes de determinação R^2 e R^2 ajustado ($Radj^2$) (CAGULA e SINGH, 1984; HAALAND, 1989).

Tabela 11. Matriz de experiências com os níveis codificados e descodificados.

	Níveis codificados		Níveis descodificados	
Ensaio	**T**	**pH**	**T (ºC)**	**pH**
1	-1	-1	45	9,6
2	-1	1	45	10,0
3	1	-1	55	9,6
4	1	1	55	10,0
5	-1,4142	0	43	9,8
6	1,41421	0	57	9,8
7	0	-1,41421	50	9,5
8	0	1,41421	50	10,1
9	0	0	50	9,8
10	0	0	50	9,8
11	0	0	50	9,8
12	0	0	50	9,8

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Concentração de substrato

O substrato utilizado para a reação de dosagem da glicerol quinase foi o glicerol. A Figura 11 mostra a atividade da GK em relação à concentração de substrato. O aumento inicial da atividade deve-se, provavelmente, à maior interação entre substrato e enzima. Essa interação vai diminuindo devido à redução da concentração de enzima livre no meio de reação, na formação do complexo enzima-substrato e do subseqüente produto.

A atividade demonstra linearidade até a concentração de 2,5 µM de glicerol, com coeficiente de correlação linear de 0,98, ponto considerado ótimo para o ensaio.

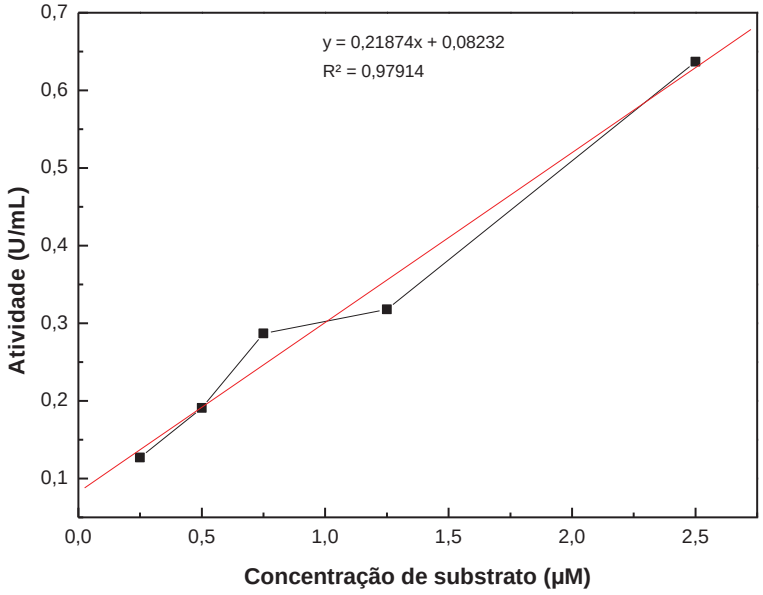

Figura 11. Efeito da concentração de glicerol sobre a atividade da glicerol quinase.

3.2. Determinação do pH de reação

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima. Assim, a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo. A influência do pH sobre a catálise enzimática é exercida sobre os grupos dissociáveis de vários aminoácidos. Alguns desses grupos podem fazer parte do sítio ativo ou ser importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula (TORRES, 2001).

A Figura 12 mostra que o pH ótimo da GK de *Pichia pastoris* no presente estudo foi 9,8. O pH ótimo é próximo dos valores encontrados por Huang et al. (1997) para a GK de *Thermus flavus*, que foi entre 9,0 e 9,5, e por Hayashi e Lin (1967), de pH 9,8 em *E. coli*.

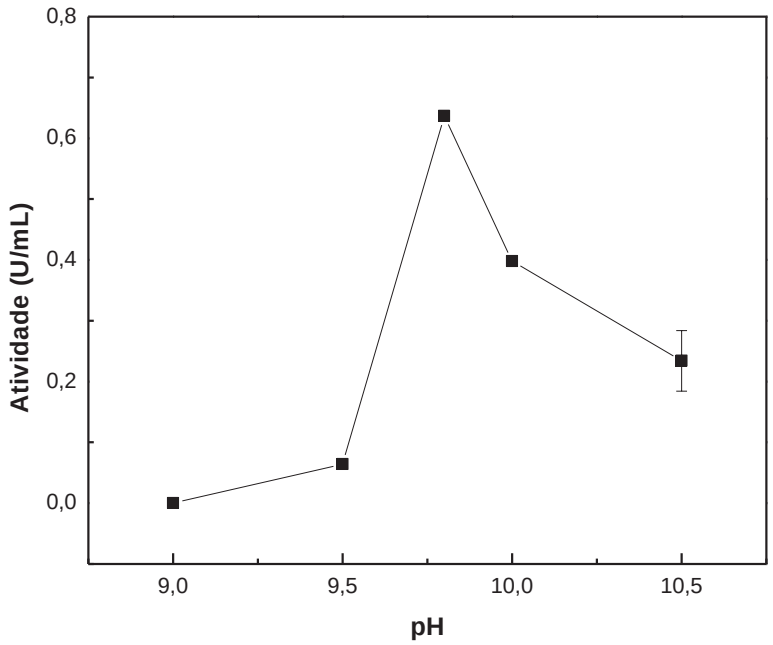

Figura 12. Efeito do pH sobre a atividade da glicerol quinase.

Krakow e Wang (1990) estudaram GK de *Trypanosoma brucei*, e a atividade ótima foi igual entre pH 7,0 e 9,5. Ramabrahmam e Subrahmanyam, (1983) também estudaram o

pH da GK, porém em larvas de *Culex pipiens fatigans*, a enzima foi ativa em uma ampla faixa de pH alcalino (7,0-12,0), e mostrou pH ótimo de 7,0 e 10,0.

O pH ótimo deste estudo foi superior ao da GK de *Trypanosoma brucei* — de pH 8,5 (STEINBORN et al., 2000), na faixa de 7,0 e 8,0 de *Debaryomyces hansenii* (Nilsson, Klaus e Adler, 1989) e 8,0 (KRÁLOVÁ et al., 2000; SAKASEGAWA et al., 1998) —, além da GK de bactérias lácticas *Pediococcus pentosaceus*, cujo pH ótimo foi 7,0 (PASTERIS e STRASSER DE SAAD, 1998).

3.3. Diluição do extrato enzimático

Na Figura 13, observa-se que o melhor valor de diluição do extrato enzimático foi de 30 vezes.

A diluição da enzima durante o ensaio da atividade não deve ser maior que 30 vezes, pois a partir desse ponto não existe uma correlação linear entre absorbância e diluição do extrato celular.

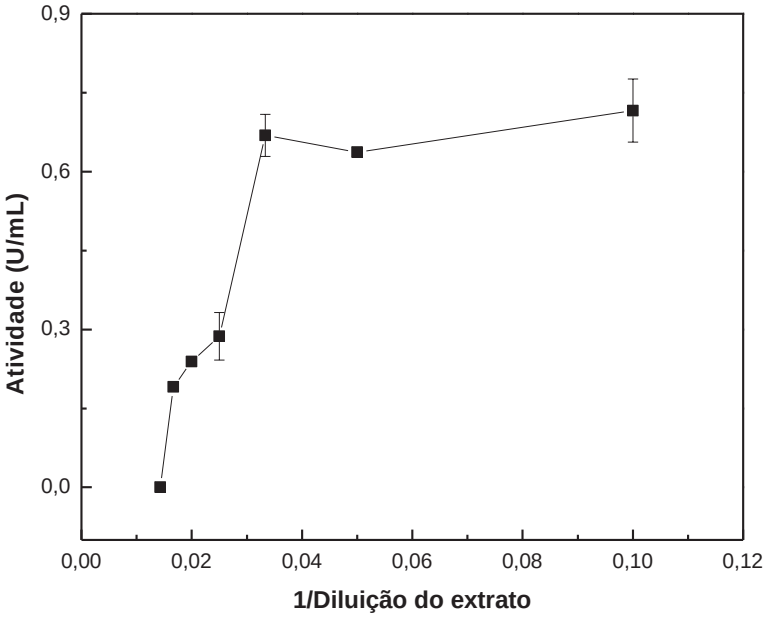

Figura 13. Efeito da diluição do extrato enzimático sobre a atividade da glicerol quinase.

Aragon (2008), estudando a GK, de *Saccharomyces cerevisiae*, determinou que na diluição de 60 vezes, atingiu-se a concentração ideal de enzima para um melhor valor de atividade enzimática.

3.4. Temperatura do ensaio

As velocidades das reações enzimáticas aumentam com a elevação da temperatura, até atingir a maior velocidade. Temperaturas elevadas aumentam a velocidade da reação enzimática, por intensificar a energia cinética das moléculas componentes do sistema e a probabilidade de choques efetivos entre elas. No entanto, temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima, ou seja, à perda de sua atividade catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional (TORRES, 2001).

Dentro de um intervalo relativamente pequeno de temperatura (por exemplo, 0 ºC a 50ºC), a velocidade de uma reação catalisada por enzima comumente aumenta no início para depois diminuir, à medida que a temperatura se eleva, fazendo parecer que existe um ótimo de temperatura no qual a enzima é a mais ativa (MORRIS, 1972).

Na Figura 14, observa-se que a temperatura ótima para o ensaio da GK foi de 50ºC. A partir desse ponto, nota-se clara diminuição da atividade, por possível desnaturação da enzima.

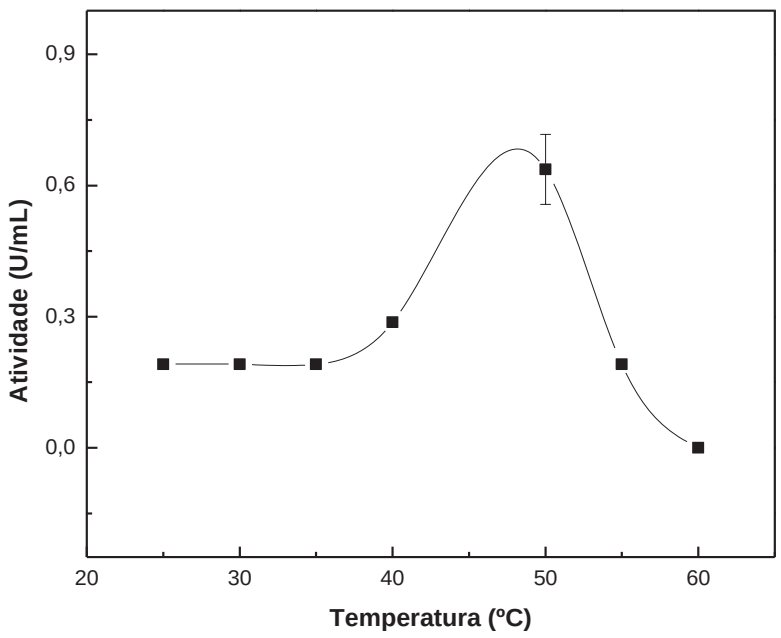

Figura 14. Efeito da temperatura sobre a atividade da glicerol quinase.

A temperatura ótima encontra-se dentro da faixa ótima estudada por Huang et al. (1997), em GK de *Thermus flavus*, que foi entre 50ºC e 70ºC.

Já para Ramabrahman e Subrahmanyam (1983), a enzima glicerol quinase de *Culex pipiens fatigans* teve uma máxima atividade em 37°C, e foi estável ao calor por 10 minutos a 60°C. Em contrapartida, para Sakasegawa et al. (1998), a GK de *Flavobacterium meningosepticum*, foi ativa em 80 ºC.

A reta tangente foi traçada no gráfico de Arrhenius (Figura 15), apenas nos pontos crescentes de atividade enzimática (35ºC a 50ºC), possibilitando o cálculo da energia de ativação, que foi de 13,89 Kcal mol^{-1}.

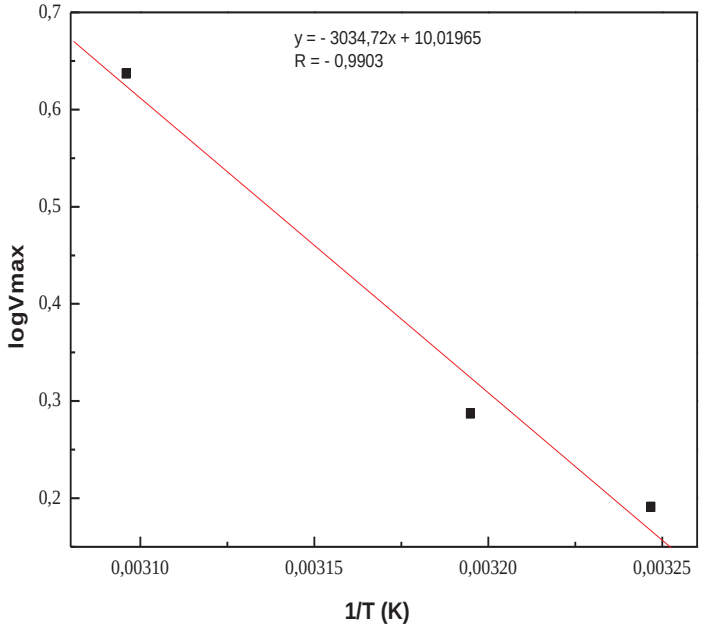

Figura 15. Determinação da energia de ativação segundo Arrhenius.

3.5. Efeito da adição de metais sobre a atividade da GK

O efeito da adição de sais sobre a atividade da GK foi determinado utilizando diferentes compostos salinos, na concentração final no ensaio de 2 mM, como pode ser observado na Tabela 12.

A adição do sal sulfato de magnésio, que estava sendo usado até então, apresentou o melhor valor de atividade enzimática (0,637 U/mL) e foi usado nos próximos experimentos.

A adição dos metais sulfato de cobre, cloreto de zinco e cloreto de magnésio apresentam valores de atividade abaixo do sulfato de magnésio, e adições de sulfato de sódio, sulfato de zinco, cloreto de potássio, cloreto de cobalto, cloreto de cálcio e cloreto ferroso inibiram completamente a reação.

Tabela 12. Efeito da adição de sais no ensaio enzimático da glicerol quinase.

Sais metálicos (2 mM)	**Atividade (U/mL)**
$MgSO_4$ (controle)	0,637 ± 0,00
Na_2SO_4	0,00
$CuSO_4$	0,191 ± 0,00
$ZnSO_4$	0,00
KCl	0,00
$CoCl_2$	0,00
$FeCl_3$	-
$ZnCl_2$	0,263 ± 0,00
$MgCl_2$	0,454 ± 0,00
$CaCl_2$	0,00
$FeCl_2$	0,00

(-) não foi possível a leitura

Nilsson, Thomson e Adler (1989) também estudaram o efeito de alguns sais sobre a atividade da GK, porém, da levedura *Debaryomyces hansenii*, e o aumento nas concentrações de KCl e Na_2SO_4 causaram ativação da enzima, sendo que no presente trabalho esses sais inibiram a atividade enzimática.

Segundo Ramabrahman e Subrahmanyam (1983), a enzima GK mostrou absoluta exigência de íons Mg^{+2} para uma ótima atividade enzimática, enquanto nenhuma atividade significativa foi observada com Ca^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} e Ba^{2+}. Uma significativa atividade foi observada com íons Mn^{2+}.

Tininis (2001), observou atividade enzimática ótima com o uso de $MgSO_4$, assim como no presente trabalho, e significativa atividade para os sais $ZnSO_4$ e KCl, diferente deste estudo. Huang et al., (1997) obteve a melhor atividade enzimática utilizando também o íon Mg^{2+}, porém a atividade não foi afetada pelos íons $MgCl_2$, $ZnCl_2$ e $CuSO_2$.

Sakasegawa et al. (1998) estudando GK de *Flavobacterium meningosepticum*, percebeu uma queda da atividade de 57% com $FeCl_2$ (2 mM), e nenhum dos seguintes sais (2 mM) tiveram influência na atividade enzimática: $MgCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $CoCl_2$, $CuSO_4$ e $MnCl_2$.

Koga et al. (1998) verificaram em *E. coli*, que a enzima GK, clonada do gene de *Pyrococcus kodakaraensis*, obteve os melhores valores de atividade enzimática na presença de Co^{2+} ou Zn^{2+}, que foram aproximadamente duas vezes mais elevadas que a atividade encontrada na presença do íon Mg^{2+}. A enzima também exibiu elevada atividade na presença dos íons Mn^{2+} e Zn^{2+}.

3.6. Concentração de substrato otimizado

Visando otimizar a atividade da glicerol quinase, foi feito novamente a determinação da concentração de substrato, porém, com os melhores valores obtidos nos resultados anteriores.

A Figura 16 mostra a atividade da GK em relação à concentração de substrato, e a atividade aumenta até a concentração de 2,5 μM de glicerol, ponto considerado ótimo para o ensaio.

Observando-se o comportamento da atividade enzimática em relação ao aumento da concentração do substrato, pode-se afirmar que a glicerol quinase obedece à cinética michaeliana.

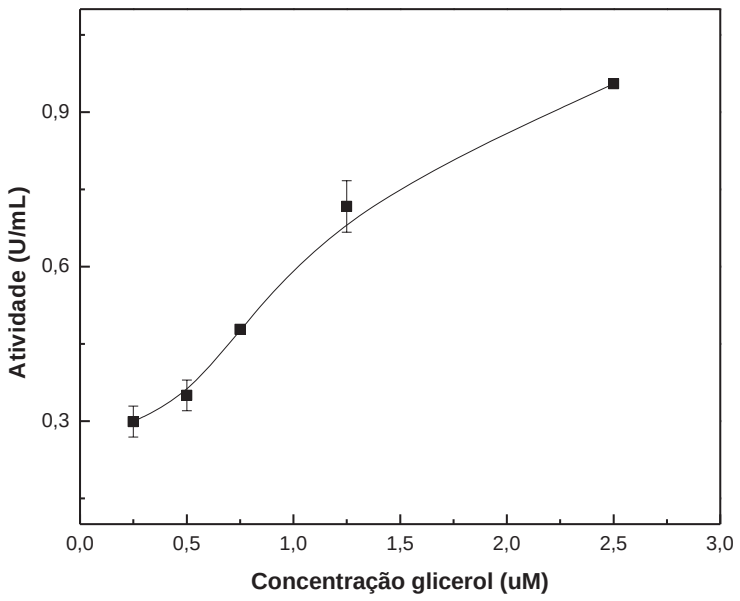

Figura 16. Efeito da concentração de glicerol sobre a atividade da glicerol quinase.

A constante Km, ou constante de Michaelis, é a concentração de substrato à qual corresponde uma velocidade igual à metade da máxima (TORRES, 2001). A partir dos métodos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee (Figuras 17-19), calcularam-se os valores da constante de Michaelis (Km) e da velocidade máxima da reação (Vmax), com o glicerol como substrato da GK. Tais valores estão mostrados na Tabela 13.

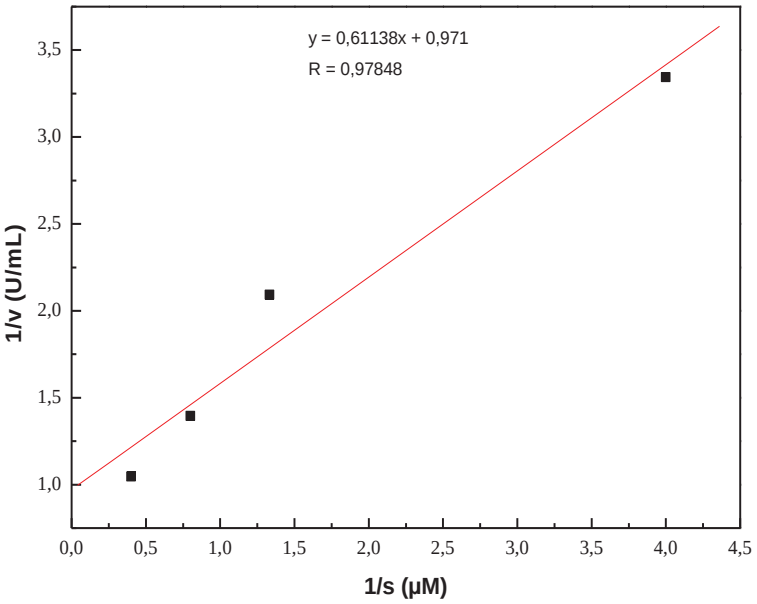

Figura 17. Determinação de Km e Vmax segundo Lineweaver-Burk.

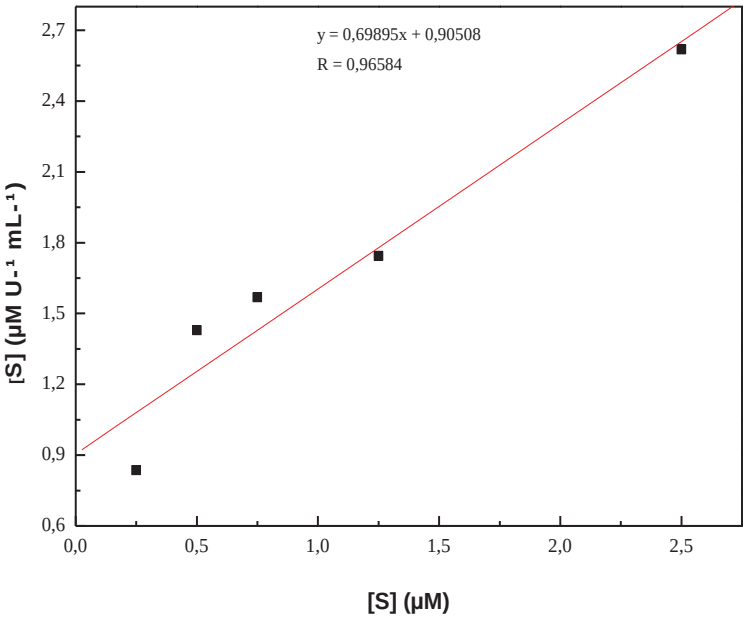

Figura 18. Determinação de Km e Vmax segundo Hanes-Woolf.

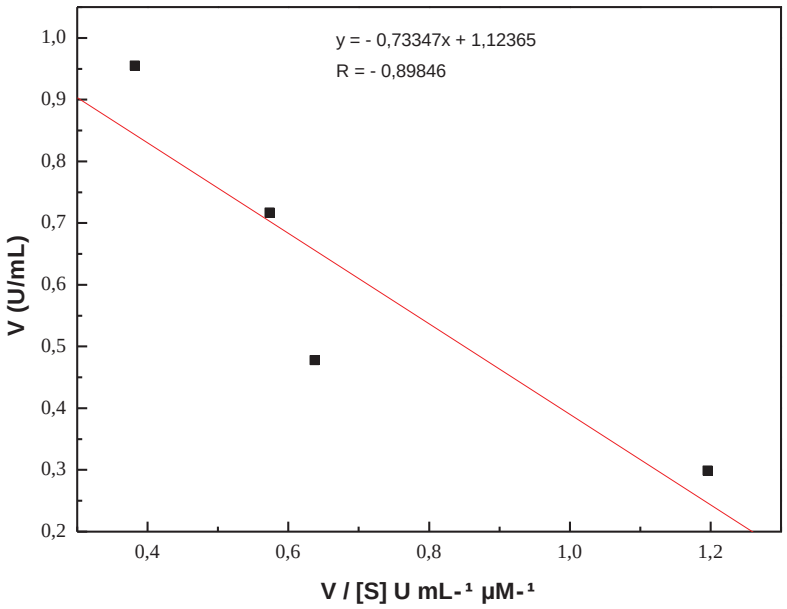

Figura 19. Determinação de Km e Vmax segundo Eadie-Hofstee.

Os valores de Km e Vmax foram próximos principalmente entre os métodos de Lineweaver-Burk e de Eadie-Hofstee. Por Hanes-Woolf, os valores foram pouco superiores, comparados aos outros cálculos. Esse comportamento é normalmente observado quando os erros experimentais que afetam a velocidade são pequenos (LESKOVAC, 2004).

Tabela 13. Valores de Km e Vmax, calculados pelos diferentes métodos.

	Lineweaver-Burk	**Hanes-Woolf**	**Eadie-Hofstee**
Km (µM)	0,63	1,29	0,73
Vmax (U/mL)	1,03	1,43	1,12

Os valores de Km encontrado no presente trabalho foram baixos quando comparado a diversos estudos, observados por Nilsson et al. (1989), em *Debaryomyces hansenii*, em que o Km foi próximo de 5 mM. Janson e Cleland (1974) verificaram, em *Candida mycoderma*, um Km igual a 15 µM e Thoner e Paulus (1973) um Km de 10 µM em *E. coli*.

Em GK de *Flavobacterium meningosepticum*, o Km foi igual a 0,088 mM (SAKASEGAWA et al., 1998) e para *Trypanosoma brucei*, o Km foi de 0,44 mM, considerado alto em relação a valores de 0,01-0,02 mM encontrados em *E. coli* e mamíferos (KRÁLOVÁ et al., 2000).

Já para Ramabrahman e Subrahmanyam (1983), o Km da enzima GK foi de 8,3 x 10^{-5}M que foi obtido a partir de Lineweaver-Burk.

3.7. Estabilidade térmica

Á medida que se aumenta o tempo de exposição de uma enzima em qualquer temperatura, a fração total da enzima é desnaturada, e dessa forma, diminui a eficiência catalítica desta. Assim, a temperatura ótima de uma enzima é um termo sem significado até que seja também registrado o tempo de sua exposição a essa temperatura (MORRIS, 1972).

Dessa maneira, os extratos enzimáticos foram submetidos à elevação da temperatura (de 0ºC a 60°C), por 60 minutos. A Figura 20 contém o gráfico de estabilidade térmica da GK. Observa-se que a atividade da enzima é favorecida pelo aumento da temperatura até 50ºC, passando a sofrer queda da atividade já com 55 ºC.

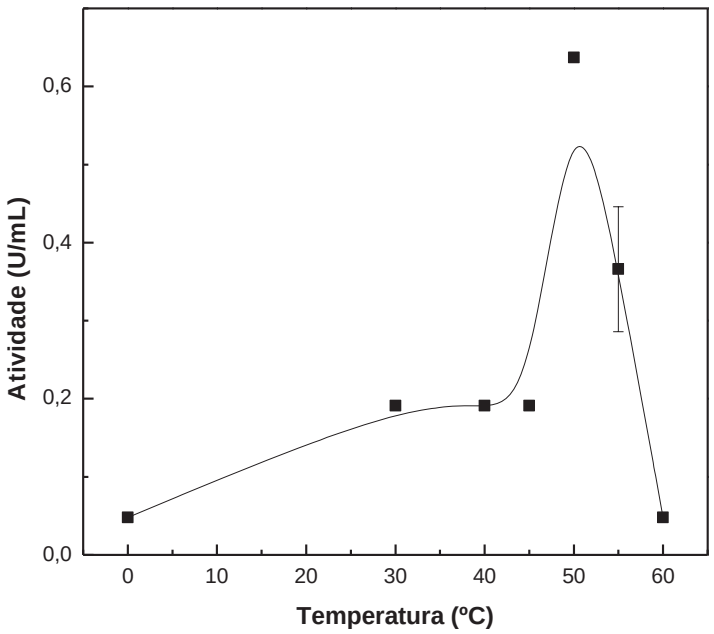

Figura 20. Estabilidade da atividade da glicerol quinase, durante estocagem por uma hora, em diferentes temperaturas.

O valor do presente trabalho é semelhante ao intervalo de 50ºC a 55ºC, encontrado por Koga et al. (2001), em GK de *E. coli*, porém, em 20 minutos de incubação, e observaram valor de T_{50} (temperatura em que a enzima perde metade de sua atividade) por volta de 95ºC, em GK de *Thermococcus kodakaraensis*.

Koga et al. (1998) verificaram em *E. coli*, que a enzima GK, clonada do gene de *Pyrococcus kodakaraensis*, mostrou-se bastante resistente a inativação térmica e ainda manteve 50% de sua atividade enzimática, após o aquecimento a 100ºC, por 30 minutos.

Sakasegawa et al. (1998), estudando a GK de *Flavobacterium meningosepticum*, observaram uma estabilidade da enzima a 65ºC por 10 minutos e ativa em 80 ºC. Além disso, não apresentou perda de atividade a 37 ºC por 2 semanas, enquanto *Bacillus stearothermophilus* e *Escherichia coli* perderam mais de 90% de suas atividades nas mesmas condições.

Os mesmos autores, em 2001, estudando a GK de *Flavobacterium meningosepticum*, obtiveram a T_{50} de 69ºC.

3.8. Estabilidade em diferentes valores de pH

Ensaios de estabilidade da GK foram realizados em diferentes valores do pH (6,0-8,0), demonstrando ser ela uma enzima de alta estabilidade (Figura 21).

No período analisado, vê-se que a GK é mais estável no pH próximo à neutralidade (pH 7,0), com valores de atividade enzimática mais altos. À medida que o tempo passa, os valores de estabilidade de todos os valores de pH testado diminuem.

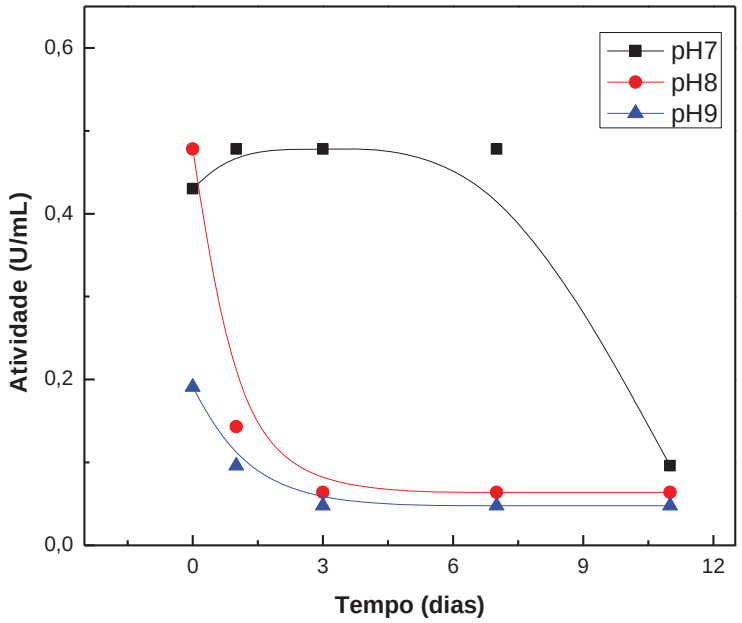

Figura 21. Estabilidade da atividade da glicerol quinase em diferentes valores de pH.

Sakasegawa et al. (1998), estudando a GK de *Flavobacterium meningosepticum* encontraram ampla faixa de estabilidade em pH (3,5-11,0) comparado com *E. coli* (6,0-7,0), *B. stearothermophilus* (3,2-9,7) e *Termus flavus* (6,5-11,0).

Crans e Whitesides (1985) observaram que a GK obtida de *S. cerevisiae* preservou menos de 20% da atividade da enzima, após 24 horas em pH 7,5 e a 4ºC, sendo que apenas a imobilização da mesma fez com que não houvesse perda da atividade, por seis meses, a 4ºC.

3.9. Estabilidade do extrato liofilizado

Houve queda da atividade da glicerol quinase contida nos extratos liofilizados por até 68 dias de estocagem, em temperatura de refrigeração, em torno de 4 a 5ºC (Figura 22), porém, nota-se uma boa estabilidade.

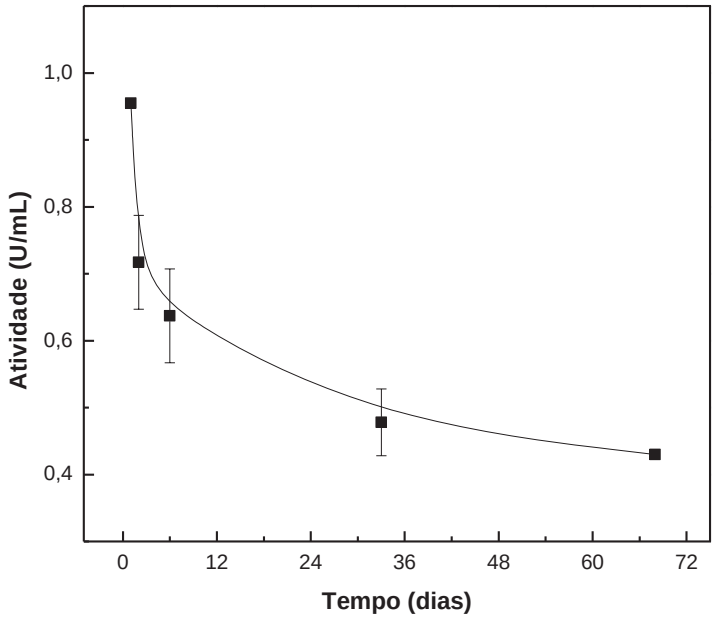

Figura 22. Estabilidade da atividade do extrato liofilizado de glicerol quinase em temperatura de refrigeração.

3.10.Metodologia de superfície de resposta

Os efeitos lineares e quadráticos da temperatura (T) e dos valores de pH e o efeito linear da interação (T x pH) na atividade da glicerol quinase são mostrados na Tabela 14.

No modelo final, a temperatura mostrou efeitos significantes na atividade enzimática da GK em nível linear e negativo e o pH um efeito significante em nível quadrático e negativo, o que significa uma superfície convexa. Um efeito quadrático negativo indicou a interação da temperatura com o pH, na qual o aumento do pH e da temperatura leva uma diminuição da atividade.

Tabela 14. Efeitos estimados dos fatores temperatura (T) e pH, em níveis lineares (L) e quadráticos (Q), e as respectivas interações, na atividade da glicerol quinase.

Fator/Interação	Efeito	Erro padrão	t(6)	p valor
Média/Interação	0,156000	0,024021	6,49438	0,000634
Temperatura (L)	-0,066710	0,033970	-1,96377	0,097186
Temperatura (Q)	-0,036749	0,037980	-0,96760	0,370612
pH (L)	0,028437	0,033971	0,83710	0,434607
pH (Q)	-0,084251	0,037981	-2,21825	0,068362
T x pH	-0,206500	0,048041	-4,29837	0,005102

Apenas a temperatura (L) e o pH (Q) e a interação T x pH tem efeito significativo na resposta e por isso, serão considerados no modelo polinomial final. A Tabela 15 é o modelo polinomial ajustado aos pontos experimentais.

Tabela 15. Coeficientes do modelo polinomial de segundo grau ajustado à atividade da glicerol quinase.

Fator/Interação	Efeito	Erro padrão	p valor
Média/Interação	-23,1799	7,684365	0,016648
Temperatura (L)	0,9247	0,30644	0,016621
pH (Q)	0,2460	0,079956	0,015203
T x pH	-0,0950	0,031266	0,016072

Observou-se uma interação significativa negativa entre T e pH (T x pH), o que significa que o aumento simultâneo da temperatura e do pH leva a uma diminuição da atividade enzimática. Os dados experimentais podem ser descritos pelo seguinte modelo polinomial de segundo grau:

$$\text{Atividade} = -23{,}18 + 0{,}925\ T + 0{,}246\ pH^2 - 0{,}095\ (T \times pH)$$

em que: a atividade é expressa em U/mL, e T é a temperatura (ºC),

Nessa equação, foram considerados apenas fatores e interações mostrando efeitos significantes de $p \leq 0{,}05$, ou possuindo um intervalo de confiança menor que o valor do efeito ou menor que o desvio padrão (dados não mostrados).

Para fins práticos é sempre desejável que o modelo ajustado seja o mais simples possível, e que ele tenha o menor número possível de parâmetros sem perder a qualidade assegurada na escolha criteriosa do delineamento experimental (RODRIGUES, 2009).

Espera-se, a partir das análises estatísticas, uma relação próxima entre os resultados experimentais e os valores teóricos preditos (HAALAND, 1989; WEISBERG, 1985). Este modelo apresentou valores de R^2 de 0,777 e R^2adj de 0,693, indicando que ele explica cerca de 78 % da variabilidade dos dados experimentais. Na prática, é desejável que R^2 seja pelo menos igual ou superior a 0,75; valores superiores a 0,90 são considerados muito bons (HAALAND, 1989).

Este modelo é descrito por uma superfície do tipo sela (“saddle-like surface”). Uma vez que duas variáveis (fatores) foram consideradas (temperatura e pH), a resposta situa-se em uma terceira dimensão, representada por uma superfícies de três dimensões, em função das duas variáveis consideradas (Figura 23).

As superfícies do tipo sela não possuem um único ponto estacionário (máximo), mas, sim, são caracterizadas por possuírem um conjunto de pontos que maximizam a resposta. Nesse caso, a análise dos gráficos de contorno foi útil para se encontrarem as melhores regiões no domínio experimental (Figura 24). Os valores máximos de atividade são obtidos aos maiores valores de pH e baixas temperaturas e a altas temperaturas e menores valores de pH, sem um ponto máximo no domínio experimental.

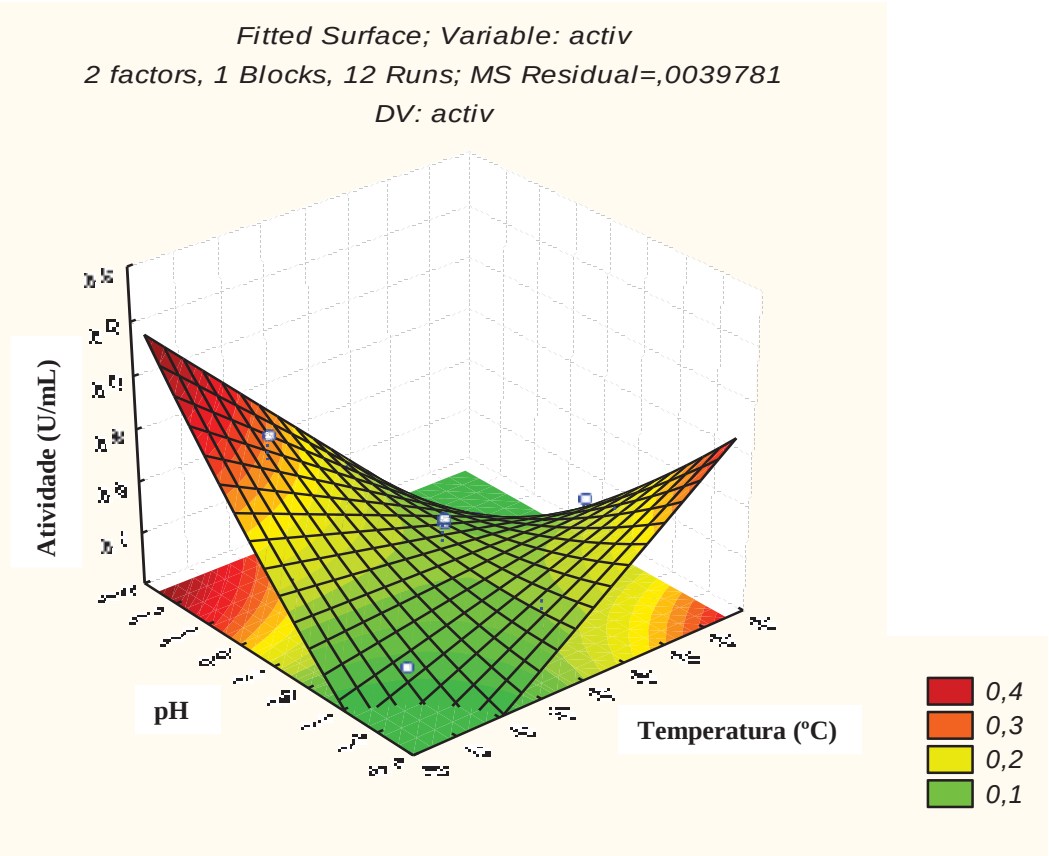

Figura 23. Superfície de resposta ajustada aos pontos dos dados experimentais correspondentes à atividade da glicerol quinase, em função da temperatura e pH em concentração inicial de substrato (glicerol) de 2,5 μM e diluição da enzima de 10 vezes.

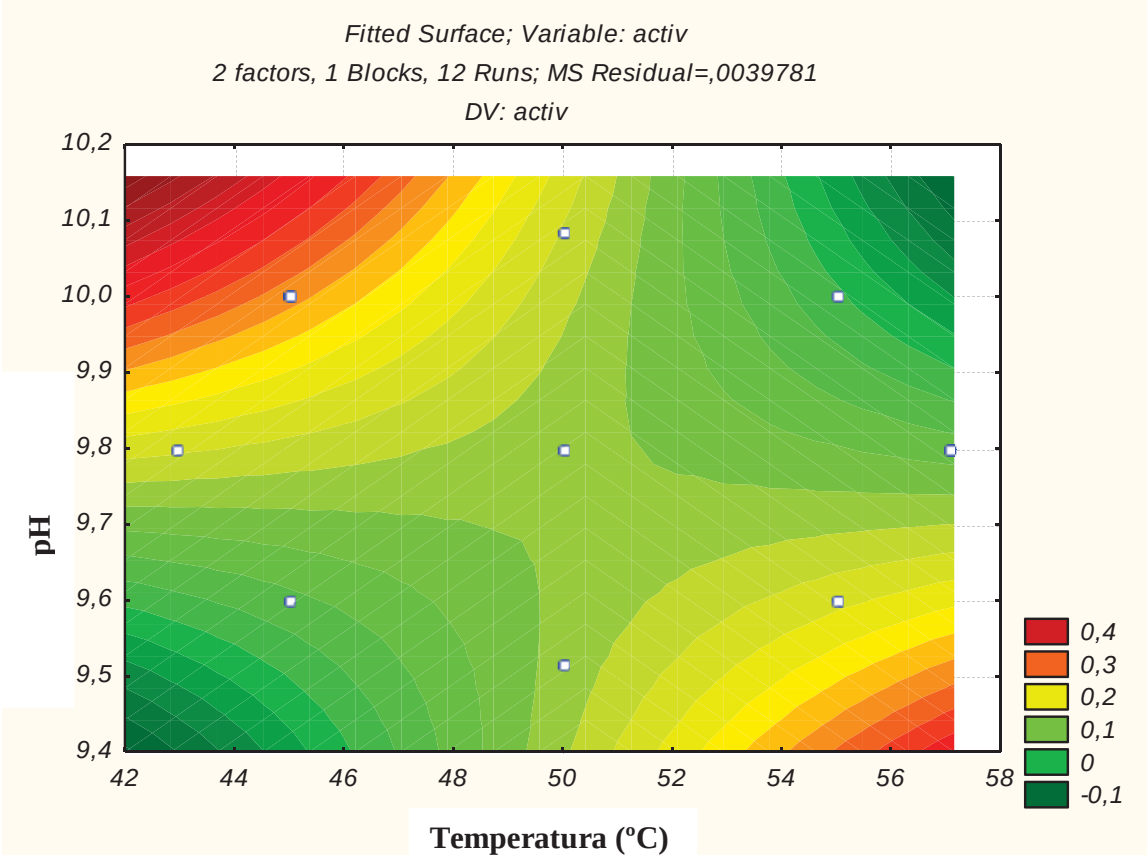

Figura 24. Gráfico de contorno das superfícies de resposta apresentada na Figura 13, em função da temperatura e pH, em concentração inicial de substrato de 2,5 µM e diluição da enzima de 10 vezes.

Analisando a superfície de resposta e curvas de contorno, podemos verificar a existência de uma região ótima para a atividade enzimática onde se encontra uma faixa de combinações de pH e temperatura. Esta metodologia fornece uma informação bem adequada pelo número de ensaios realizados. Evidentemente uma condição de temperatura e pH será fixada para a reação, no entanto, este resultado de faixa ótima das variáveis é muito mais interessante do que apenas um valor pontual pois ele fornece informação sobre a "robustez" do processo. Ou seja, qual é a variação de temperatura que pode ser admitida ao redor do seu valor ótimo e do pH ótimo, que mantém o processo na condição otimizada (RODRIGUES, 2009).

Este resultado é fundamental na etapa da definição dos sensores de pH e temperatura e dos controladores que deverão ser adquiridos, afetando diretamente a viabilidade e implantação do processo (RODRIGUES, 2009).

4. CONCLUSÃO

- O pH ótimo da GK de *Pichia pastoris* no presente estudo foi 9,8.
- O melhor valor de diluição do extrato enzimático foi de 30 vezes.
- A temperatura ótima para o ensaio da GK foi de 50ºC. A partir desse ponto, notou-se clara diminuição da atividade, por possível desnaturação da enzima.
- A adição do sal sulfato de magnésio apresentou o melhor valor de atividade enzimática (0,637 U/mL)
- A atividade da GK em relação à concentração de substrato demonstra linearidade até a concentração de 2,5 µM de glicerol.
- A atividade da enzima é favorecida pelo aumento da temperatura até 50ºC, passando a sofrer queda da atividade já com 55 ºC.
- A enzima possui alta estabilidade em diferentes valores de pH (6,0-8,0),sendo mais estável no pH próximo à neutralidade (pH 7,0), com valores de atividade enzimática mais altos.
- Houve queda da atividade da glicerol quinase contida nos extratos liofilizados por até 68 dias de estocagem, em temperatura de refrigeração.
- Calculados pelos métodos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee, o valor da constante de Michaelis (Km) da enzima variou entre 0,63 µM e 1,29 µM, e a Vmax, entre 1,03 U/mL e 1,43 U/mL.
- Através da metodologia de superfície de resposta (MSR) observou-se que os valores máximos de atividade são obtidos aos maiores valores de pH e baixas temperaturas e a altas temperaturas e menores valores de pH, sem um ponto máximo no domínio experimental.

5. REFERÊNCIAS

AGOSTO, J. A. M.; MCCABE, E. R. B. Conserved family of glycerol kinase loci in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 88, p.334-345, 2006.

ARAGON, C. C.; FERREIRA-DIAS, S.; GATTÁS, E. A. L.; PERES, M. F. S. Characterization of glycerol kinase from baker's yeast: Response surface modeling of the enzymatic reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 113-120, 2008.

GACULA, J. R. M. C.; SINGH, J. Response surface designs and analysis. In:_____. **Statistical methods in food and consumer research:** Food Science and Technology. New York: Academic Press, 1984. p. 214.

ÇELIK, E.; ÇALIK, P.; OLIVER, S. G. A structured kineticmodel for recombinant protein production by Mut^+ strain of *Pichia pastoris*. **Chemical Engineering Science**, v. 64, p. 5028-5035, 2009.

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

CRANS, D.C.; WHITESIDES, G.M. Glycerol kinase: synthesis of dihydroxyacetone phosphate, sn-glycerol-3-phosphate, and chiral analogues. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 24, p. 7019-7027, 1985.

FREIVALDS, J.; DISLERS, A.; OSE, V.; PUMPENS, P.; TARS, K.; KAZAKS, A. Highly efficient production of phosphorylated hepatitis B core particles in yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 75, p. 218-224, 2011.

HAALAND, P. D. **Experimental design in biotechnology:** Statistics: textbooks and monographs. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 258.

HANG, H.; YE, X.; GUO, M.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; ZHANG, M.; ZHANG S. A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate**. Enzyme and Microbial Technology**, v. 44 p. 185-188, 2009.

HAYASHI, S.; LIN, E. C. C. Purification and properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.242, n.5, p.1030-1035, 1967.

HONG, F.; MEINANDER, N. Q.; JONSSON, L. J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, p. 438-449, 2002.

HUANG, H.-S.; YOSHIDA, T.; MENG, Y.; KABASHIMA, T.; ITO, K.; NISHIYA, Y.; KAWAMURA, Y.; YOSHIMOTO, T. Purification and characterization of thermostable glycerol kinase from *Thermus flavus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 328-332, 1997.

INAN, M.; ARYASOMAYAJULA, D.; SINHA, J.; MEAGHER, M. M. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, p.771-778, 2006.

JANSON, C.A.; CLELAND, W.W. The kinetic mechanism of glycerokinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 8, p. 2562-2566, 1974.

KOBAYASHI, K.; KUWAE, S.; OHYA, T.; OHDA, T.; OHYAMA, M.; TOMOMITSU, K. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, p. 280-288, 2000.

KOGA, Y.; HARUKI, M.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Stabilities of chimeras of hyperthermophilic and mesophilic glycerol kinases constructed by DNA shuffling. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 6, p. 551-556, 2001.

KOGA, Y.; MORIKAWA, M.; HARUKI, M.; NAKAMURA, H.; IMANAKA, T.; KANAYA, S. Thermostable glycerol kinase from a hyperthermophilic archaeon: gene cloning and characterization of the recombinant enzyme. **Protein Engineering**, v. 11, n. 12, p. 1219-1227, 1998.

KRAKOW, J. L.; WANG, C. C. Purification and characterization of glycerol kinase from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 43, p. 17-26, 1990.

KRÁLOVÁ, I.; RIGDEN, D. J.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. M. Glycerol kinase of *Trypanosoma brucei*: cloning, molecular characterization and mutagenesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 2323-2333, 2000.

KUWADA N.; NAGANO K.; MACLENNAN N.; HAVENS, J.; KUMAR, M.; DIPPLE, K. M.; MCCABE, E. R. B. Gene therapy for murine glycerol kinase deficiency: Importance of murine ortholog. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, p. 247-255, 2005.

LESKOVAC, V. **Comprehensive enzyme kinetics**. New York: Kluwer Academic Publ., 2004. 438p.

MORRIS, J. G. Físico-química para biólogos. In: MORRIS, J. G. **Físico-química para biólogos**. São Paulo: Editora da USP, 1972, p. 285-371, cap. 10.

NILSSON, A.; THOMSON, K. S.; ADLER, L. Purification and characterization of glycerol kinase in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 991, p. 296-302, 1989.

OLIVEIRA, H. M; SEGUNDO, M. A.; LIMA, J. L. F. C.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E. A. G. Kinetic enzymatic determination of glycerol in wine and beer using a sequential injection system with spectrophotometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 4136-4140, 2006.

PASTERIS, S. E.; STRASSER DE SAAD, A. M. Characterization of glycerol kinase and NAD-independent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Pediococcus pentosaceus* N5p**. Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 93-97, 1998.

RAMABRAHMAM, P.; SUBRAHMANYAM, D. Mitochondrial glycerol kinase of *Culex pipiens fatigans*. **Insect Biochemistry**, v. 13, n. 5, p. 523-528, 1983.

RICHTER, S.; NIEVELER, J.; SCHULZE, H.; BACHMANN, T.T.; SCHMID, R.D. High yield production of a mutant *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase in *Pichia pastoris* and its purification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, p. 1017-1022, 2006.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. – 2 ed. – Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 f.

SAKASEGAWA, S.; YOSHIOKA, I.; KOGA, S.; TAKAHASHI, M.; MATSUMOTO, K.; MISAKI, H.; OHSHIMA, T. A novel glycerol kinase from *Flavobacterium meningosepticum*: characterization, gene cloning and primary structure. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 12, p. 2388-2395, 1998.

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

STEINBORN, K.; SZALLIES, A.; MECKE, D.; DUSZENKO, M. Cloning, heterologous expression and kinetic analysis of glycerol kinase (TbGLK1) from *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 381, p. 1071-1077, 2000.

TININIS, C. R. C. S. **Ensaio enzimático para dosagem de glicerol.** 2001. 124 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara- SP, 2001.

THORNER, J. W.; PAULUS, H. Catalytic and allosteric properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 248, n. 11, p. 3922-3932, 1973.

TORRES, B. B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial:** fundamentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, cap. 5, p. 151-176.

TSAI, C. W.; DUGGAN, P.F.; SHIMP, J.; RICHARD, L.; MILLER, L.H.; NARUM, D.L. Overproduction of *Pichia pastori*s or *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase affects expression, folding and O-linked glycosylation of a malaria vaccine candidate expressed in *P. pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 458-470, 2006.

WEISBERG, S. Applied linear regression. New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 217.

WIELAND, O. Glycerol, U.V. Method**. Methods in enzymology**, v. 5, p. 354-361, 1962.

ANEXO TÉCNICO

1. MEIOS DE CULTURA

1.1. YPDA

Para a manutenção e propagação inicial do micro-organismo foi utilizado o meio YPDA na seguinte constituição:

Extrato de levedura (Biobrás)..... 1% (p/v)
Peptona (Bacto) ..... 2% (p/v)
Glicose (Synth) ..... 2% (p/v)
Agar (Biobrás) ..... 2% (p/v)

Para o preparo de um litro do meio YPDA, dissolveu-se 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona e 20 g de glicose em 900 mL de água destilada. Adicionou-se 20 g de agar e completou-se o volume para um litro. Autoclavou-se a 121°C, a 1 atm de pressão durante 15 minutos e distribuiu-se em placas de Petri estéreis.

As culturas foram conservadas nesse meio, em geladeira a 4°C, através de transferências, seguidas de crescimento em meio novo (repicagem) a cada experimento.

1.2. BMGY

O meio BMGY foi utilizado para o crescimento no inoculo e é constituído por:

Extrato de levedura (Biobrás)..... 1% (p/v)
Peptona (Bacto) ..... 2% (p/v)
Tampão fosfato de potássio ..... 100 mmol/L com pH 6,0 (v/v)
YNB (Difco)..... 1,34% (p/v)

Biotina (Sigma B4501-1G) ..... 4 x 10^{-5}% (p/v)
Glicerol (Synth) ..... 1% (v/v)

Preparo das soluções estoques:

Tampão fosfato de potássio 1mol/L, pH 6,0: foi adicionado 13,2 mL de K2HPO4 (Reagen) 1 mol/L a 86,8 mL de KH2PO4 (Synth) 1 mol/L, se necessário, ajustou-se o pH com NaOH (Synth) para pH 6,0. Esterilizou-se em autoclave a 121ºC, a 1 atm de pressão durante 15 minutos. O tempo de estabilidade é maior que um ano quando conservado a 4ºC.

Solução de YNB 13,4%: foi dissolvido 13,4 g de YNB (Yeast Nitrogen Base) em 100 mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de PVDF (0,22 μm). A solução se mantém estável por um ano quando conservado a 4°C.

Solução de biotina 0,02%: dissolveu-se 20 mg de biotina em 100 mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de PVDF (0,22μm). A solução se mantém estável aproximadamente um ano quando conservado a 4°C.

Glicerol concentrado: autoclavou-se uma quantidade suficiente de glicerol, a 121°C, 1 atm de pressão durante 15 minutos.

Para o preparo de um litro do meio de cultura BMGY dissolveu-se 10 g de extrato de levedo e 20 g de peptona em 790 mL de água destilada. Autoclavou-se a 121°C, a 1 atm de pressão durante 15 minutos. Adicionou-se 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 m mol/litro pH 6,0, 100 mL de YNB (10X), 2 mL de biotina 0,02% e 10 mL de glicerol concentrado.

1.3. BMMY

O meio BMMY foi utilizado para a expressão da atividade da enzima, e é constituído por:

Extrato de levedura (Biobrás)..... 1% (p/v)
Peptona (Bacto) ..... 2% (p/v)
Tampão fosfato de potássio ..... 100 mmol/L com pH 6,0 (v/v)
YNB (Difco)..... 1,34% (p/v)
Biotina (Sigma B4501-1G) ..... 4 x 10^{-5}% (p/v)
Metanol (Qhemis) ..... 0,5 ou 1% (v/v)

Preparo das soluções estoques:

As soluções de tampão fosfato de potássio 1 mol/L, pH 6,0, YNB e biotina foram preparadas como descrito anteriormente.

Solução de metanol 5%: adicionou-se 5 mL de metanol em 95 mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de PVDF (0,22µm). A solução se mantém estável a aproximadamente dois meses quando conservado a 4°C.

Para o preparo de um litro do meio de cultura BMMY dissolveu-se 10 g de extrato de levedo e 20 g de peptona em 700 mL de água destilada. Autoclavou-se a 121°C, a 1 atm de pressão durante 15 minutos. Adicionou-se 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 m mol/L pH 6,0, 100 mL de YNB (10X), 2 mL de biotina 0,02% e 100 mL de metanol 5%.

1.4. BSM

O meio BSM foi utilizado em um dos ensaios a fim de substituir o meio BMMY, para os experimentos de indução da enzima glicerol quinase e é constituído por:

Glicerol..... 40 g (v/v)
H_3PO_4 85% ..... 26,7 ml (p/p)
$CaSO_4$..... 0,93 g (p/v)
K_2SO_4 ..... 18,2 g (p/v)

$MgSO_4.7H_2O$ ..... 14,9 g (p/v)
KOH ..... 4,13 g (p/v)

Solução de traço de sais (PTM):

$CuSO_4$ ..... 6 g (p/v)
KI ..... 0,08 g (p/v)
$MnSO_4$ ..... 3 g (p/v)
Na_2MoO_4 ..... 0,2 g (p/v)
H_3BO_3 ..... 0,02 g (v/v)
$CoCl_2$ ..... 0,5 g (p/v)
$ZnCl_2$ ..... 20 g (p/v)
$FeSO_4.7H_2O$ ..... 65 g (p/v)
Biotina ..... 0,2 g (p/v)
H_2SO_4 98% ..... 5 mL (v/v)

Para o preparo de um litro do meio BSM adicionou-se 40 g de glicerol, 26,7 mL (p/p) H_3PO_4 85%, 0,93 g de $CaSO_4$, 18,2 g de K_2SO_4, 14,9 g de $MgSO_4$.7H2O, 4,13 g de KOH, e quantidade suficiente de água para completar 1 litro. Ajustou-se o pH 5, com NH_4OH 28%, e esterilizou em autoclave à 121°C por 15 min. Em temperatura ambiente, foi adicionado 4,35 mL de solução de traço de sais.

Solução traço de sais: Dissolveu-se 6 g de $CuSO_4$, 0,08 g de KI, 3 g de $MnSO_4$, 0,2 g de Na_2MoO_4, 0,02 g de H_3BO_3, 0,5 g de $CoCl_2$, 20 g de $ZnCl_2$, 65 g de $FeSO_4.7H_2O$, 0,2 g de biotina, 5 mL de H_2SO_4 98% (p/p), em 1 litro de água. Esterilizou por filtração e foi estocado a 4°C.

2. SOLUÇÃO DE RINGER

A solução de Ringer foi preparada a partir da seguinte constituição:

Azul de metileno (Laborclin) ..... 0,00002% (v/v)
Cloreto de sódio (Synth) ..... 0,0009% (p/v)
Cloreto de potássio (Synth) ..... 0,062% (p/v)
Cloreto de cálcio (Synth)..... 0,048% (p/v)
Bicarbonato de sódio (Reagen)..... 0,02% (p/v)
Glicose (Synth) ..... 1,0% (v/v)

A solução foi mantida a 30°C.

3. SOLUÇÕES ESTOQUES PARA O ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLICEROL QUINASE

Solução tampão de diluição Tris-HCl 10 mmolL, pH 7,2, contendo 10 mmol/L de NaF: pesou-se 0,1211g de Tris (hidroximetilamino metano, Sigma T1503-500G) e 0,042g de NaF (fluoreto de sódio, Merck), adicionou-se 80 mL de água destilada, ajustou o pH com HCl (Vetec) 6 mol/L e completou-se o volume para 100 mL.

Solução tampão de dosagem glicina-hidrazina, pH 9,8: pesou-se 0,75g de glicina (Merck), adicionou-se 18,53 mL de hidrato de hidrazina (solução 25%, Dinâmica), ajustou-se o pH para 9,8 com HCl (Vetec) 6 mol/L e completou-se o volume para 25 mL.

Glicerol 6 mmol/L: mediu-se 43,8 μL glicerol (Sigma G7757-1L, densidade 1,262 e pureza ≥ 99,0%) e completou-se o volume para 100 mL com água destilada. Conservou-se a solução em geladeira.

Solução de ATP 0,05 mol/L: pesou-se 0,0551 g de ATP (Sigma A3377-5G) e dissolveu-se em 2 mL de água. Preparou-se no instante do uso e manteve-se a solução em banho de gelo.

Solução NAD 0,02 mol/L: pesou-se 0,0265 g de βNAD (Sigma N6522-1G) e dissolveu-se em 2 mL de água destilada. Preparou-se no instante do uso e manteve-se a solução em banho de gelo.

Solução de cloreto de cálcio 0,1 mol/L: pesou-se 0,3676 g de $CaCl_2.2H_2O$ (Synth), dissolveu-se em 15 mL de água destilada e completou-se o volume para 25 mL. Conservou-se a solução em geladeira.

Solução sulfato de magnésio 0,2 mol/L: pesou-se 1,2324 g de $MgSO_4.2H_2O$ (Synth) e dissolveu-se em 15 mL de água destilada e completou-se o volume para 25 mL. Conservou-se a solução em geladeira.

4. SOLUÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

O conteúdo protéico (Cp) do extrato celular de levedura foi determinado pelo método LOWRY et. al, (1951), tendo soroalbumina bovina como padrão e utilizando as seguintes soluções:

- Reagente A: solução de Na_2CO_3 (Synth) a 2% em NaOH (Synth) 0,1N
- Reagente B: solução de $CuSO_4.5H_2O$ (Synth) a 0,5% e citrato de sódio (Synth) 1%
- Reagente C: no momento de usar, misturar 50 mL do reagente A + 1 mL do reagente B
- Reagente D: reagente de Folin Ciocalteau (Imbralab), diluído com água destilada a 1:2
- Solução padrão de albumina de soro bovino (BSA), Inlab
- 5 mg de albumina em 50 mL de NaOH 0,1N