

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

ALBERTO ENRIQUE MAESTRE PACHECO

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
CATALASE DE *Serratia marcescens***

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2021

ALBERTO ENRIQUE MAESTRE PACHECO

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
CATALASE DE *Serratia marcescens***

**Expression, purification and characterization of a catalase from *Serratia
marcescens***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof^a. Dr^a. Juliana Vitória Messias Bittencourt.

Coorientador: Prof. Dr. Marcio Silva

PONTA GROSSA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



ALBERTO ENRIQUE MAESTRE PACHECO

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CATALASE DE *Serratia marcescens*

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biomoléculas naturais

Data de aprovação: 18 de Maio de 2021

Prof.a Juliana Vitoria Messias Bittencourt, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Andrea Soares Da Costa Fuentes, Doutorado - Universidade Federal de São Carlos (Ufscar)

Prof Marcio Silva, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Nedia De Castilhos Ghisi, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 03/06/2021.

Folha de Aprovação assinada encontra-se na Secretaria do Programa

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar minha mais profunda e sincera gratidão a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me dar a sabedoria, saúde e força para enfrentar esta etapa maravilhosa da minha vida. Deus sempre é o meu maestro e amigo fiel, em quem confio e amo com todo o meu coração.

Aos meus pais, Isabel Pacheco e Huberto Maestre por sempre acreditar em mim, e por ser o meu maior incentivo na minha vida, sem vocês não tivesse sido possível chegar até esta etapa.

A meu irmão Jorge Maestre por sempre acreditar em mim e pelo apoio incondicional ao longo deste sonho.

A minha namorada Angie Rudas pelo grande apoio, pela paciência e suporte emocional durante esta etapa.

Agradeço aos meus orientadores, a Prof.^a Juliana Messias e o prof. Marcio Silva pelo contínuo apoio, dedicação e valiosa orientação ao longo desses anos. Estarei sempre grato.

Minha mais sincera gratidão a Prof.^a Andrea Soares da Costa, ao prof. Otavio Thiemann por abrir as portas dos seus laboratórios para mim, pelas suas valiosas dicas e sugestões.

Gostaria de agradecer a todas minhas colegas de mestrado, Isita, Sabrina, Malu, Marcelinha, Thaís e Adriane pela amizade, apoio e ajuda incondicional.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UFSCar, especialmente a minha amiga Sâmara Vieira pela sua ajuda, paciência, apoio e amizade.

Agradeço ao pessoal do Instituto de Física de São Carlos da USP, especialmente ao meu amigo Witer Souza, pelo seu apoio e ajuda incondicional; agradeço também a Diego Leonardo pela sua ajuda.

Finalmente e não menos importante agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. Número do projeto 223/216.

RESUMO

As enzimas constituem um fator fundamental em diversos processos indústrias devido a sua alta eficiência catalítica e o baixo consumo de energia. Dessa forma, os microrganismos graças ao seu rápido crescimento, versatilidade, altos níveis de produção, se tornam uma fonte importante de enzimas de interesse industrial; como as catalases, que são caracterizadas pelas suas aplicações em diferentes setores: alimentício, têxteis, farmacológico, odontológico, entre outros; contudo, existem algumas limitações para a produção de muitas enzimas microbianas por processos convencionais, uma dessas limitações é a dificuldade de mimetizar as condições ambientais e nutricionais para o crescimento de alguns microrganismos no nível laboratorial, assim, algumas técnicas da engenharia genética como a expressão heteróloga em diferentes sistemas de expressão, como a *E. coli* e a *Pichia pastoris*, constituem uma alternativa interessante dado que representam sistemas de expressão versáteis para a produção de inumeráveis enzimas e produtos de interesse biotecnológico a larga escala. Este trabalho tem como objetivo principal o estabelecimento de um sistema de expressão recombinante de uma catalase de *Serratia marcescens* em células de *Pichia pastoris* e *E. coli*. O fragmento *Kat* (codifica para uma catalase alcalina) da linhagem bacteriana *Serratia marcescens* FZSF01 foi subclonado previamente nos vetores de expressão pPICZαA e pET-28a. O plasmídeo recombinante pPICZαA_*Kat* foi utilizado para transformar células de *P. pastoris* KM71H e X-33, enquanto o vetor recombinante pET-28_*Kat* foi utilizado para transformar células de *E. coli* Rosetta(DE3). Os clones recombinantes de *P.pastoris* KM71H e X-33 foram induzidos com metanol (na concentração final de 0,75% e 1% respectivamente) por um período de 144 horas. A indução da expressão em *E.coli* foi feita com IPTG numa concentração final de 0,4 mM a 37°C e a purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de níquel. A atividade enzimática da catalase purificada foi realizada pelo método espectrofotométrico. As análises de expressão e purificação foram feitas em SDS-PAGE 12% corado com Comassie. A expressão da catalase em *P. pastoris* foi observada em pequena escala, sendo necessária a padronização dos ensaios de expressão a maior escala. Em células de *E.coli* Rosetta (DE3) apresentou significativas taxas de expressão, mostrando-se parcialmente solúvel o que permitiu realizar a purificação da proteína, obtendo-se um rendimento de 0,51 mg por litro de cultura. Posteriormente foram feitos os ensaios enzimáticos que demonstraram que a catalase estava ativa e que apresentou um comportamento Michaeliano.

Palavras chaves: Vetor de expressão. Proteína heteróloga. Peróxido de hidrogênio. Aplicação biotecnológica. *Serratia marcescens*.

ABSTRACT

Enzymes constitute a fundamental factor in a broad range of industrial process due to their high catalytic efficiency and low energy consumption. Thus, presenting a fast growth, versatility and high production levels, microorganisms become an important source of enzymes of industrial interest; such as catalases, which are characterized for by its applications in different sectors: food, textile, pharmacological, dental, among others. However, there are some limitations in the production of many enzymes through conventional process. One of them is the difficult in mimic the environmental and nutritional conditions for the growth of some microorganisms in laboratorial. So, some techniques of genetic engineering as heterologous expression in different expression systems, as *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*, constitute an interest alternative, since they are versatile expression systems for the production of innumerable enzymes and products of biotechnological interest in large scale. This work has as main objective the establishment of a recombinant expression system of a catalase from *Serratia marcescens* in cells of *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. The *Kat* fragment (encoding an alkaline catalase) from bacterial strain *Serratia marcescens* FZSF01 was previously subcloned in the expression vectors pPICZαA and pET-28a. The recombinant plasmid pPICZαA_*Kat* was used to transform cells of *P. pastoris* KM71H and X-33, while the recombinant vector pET-28_*Kat* was used to transform cells of *E. coli* Rosetta (DE3). The recombinant clones of *P. pastoris* KM71H and X-33 were induced with methanol (final concentration of 0.75% and 1%, respectively) for a period of 144 hours. The induction in *E. coli* was made with IPTG in a final concentration of 0,4 mM at 37 °C and the purification was made by affinity chromatography in nickel resin. The purified catalase enzyme activity was made by spectrophotometer method. Analysis of expression and purification were made in SDS-PAGE 12% colored with Comassie. Catalase expression in *P. pastoris* was observed in small scale, being necessary the standardization of the expression assays in a larger scale. In *E. coli* Rosetta (DE3) cells, it presented significative expression rates, presenting a partial solubility, which allowed the protein purification, obtaining a yield of 0.51 mg per liter of culture. After, it was done enzymatic assays that demonstrated that the catalase was active and it presented a Michaelian behavior.

Key words: Expression vector. Heterologous protein. Hydrogen peroxide. Biotechnological application. *Serratia marcescens*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação da estrutura do monômero da heme catalase monofuncional DR1998 de <i>Deinococcus radiodurans</i>	27
Figura 2- Sequência de nucleotídeos que constitui ao fragmento <i>Kat</i>	36
Figura 3- Sequência de aminoácidos que constitui á catalase codificada pelo fragmento <i>Kat</i>	36
Figura 4- Resultados da análise feita com ProtParam Tool.	37
Figura 5- Polaridade dos aminoácidos que compõe á catalase	37
Figura 6- Predição de estruturas secundaria da catalase	38
Figura 7- Resultados da predição de modificações pós-traducionais (N-glicosilação e peptídeo sinal).....	38
Figura 8- Resultados da predição de modificações pós-traducionais da catalase (O-glicosilação).....	39
Figura 9- Representação esquemática da construção molecular pGEM-T_ <i>Kat</i>	41
Figura 10A- Representação esquemática da construção molecular pPICZ α A_ <i>Kat</i> ..	43
Figura 11 A. Representação esquemática da construção molecular pET-28a_ <i>Kat</i> ..	48
Figura 12- Curva de calibração do peróxido de hidrogênio	52
Figura 13- PCR de colônias resultantes da transformação de células de <i>E. coli</i> DH5- α com a construção pPICZ α A_ <i>Kat</i>	53
Figura 14- Digestão do DNA plasmidial pPICZ α A_ <i>Kat</i> dos clones 5 e 10 com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i>	54
Figura 15- Linearização do vetor de expressão pPICZ α A_ <i>Kat</i> com a enzima de restrição <i>SacI</i>	55
Figura 16- Seleção de clones positivos de <i>P. pastoris</i> KM71H em placas com YPDS contendo Zeocina.....	56
Figura 17- Seleção de clones positivos de <i>P. pastoris</i> X-33 em placas com YPDS contendo Zeocina.....	57
Figura 18- Análise expressão da catalase em pequena escala em <i>P.pastoris</i> KM71H (72 horas de indução com metanol)	58
Figura 19- Análise expressão da catalase em pequena escala em <i>P.pastoris</i> X-33 (72 horas de indução com metanol)	59
Figura 20- Análise expressão da catalase em pequena escala em <i>P.pastoris</i> X-33 (96 horas de indução com metanol)	59

Figura 21- PCR de colônias resultantes da transformação de células de <i>E. coli</i> DH5- α com a construção pET-28a_ <i>Kat</i>	62
Figura 22- Digestão do DNA plasmidial pET-28a_ <i>Kat</i> dos clones 5 e 6 com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i>	62
Figura 23- Análise expressão da catalase em <i>E. coli</i> (Rosetta) a 37°C	63
Figura 24A- Análise da purificação e solubilidade da catalase expressa em <i>E. coli</i> .	64
Figura 24B- Análise da purificação da catalase expressa em <i>E. coli</i>	65
Figura 24C- Análise da purificação da catalase expressa em <i>E. coli</i>	65
Figura 25- Curva de degradação do peróxido de hidrogênio pela catalase em 1 min de reação	68
Figura 26-Representação gráfica da degradação do peróxido de hidrogênio pela catalase.....	68
Figura 27- Comportamento Michaeliano da catalase	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AOX	Álcool oxidase
ARG4	Argininosuccinato liase
bp	Par de bases
BMGY	Meio tamponado complexo contendo glicerol
BMMY	Meio tamponado complexo contendo metanol
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HIS4	Histinidol desidrogenase
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
<i>KAT</i>	Fragmento que codifica para uma catalase alcalina
kV	Quilovolt
LacZ	Gene que codifica para b-galactosidase
LB	Lysogeny Broth
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
Mut ^s	Methanol utilization slow (utilização de metanol lenta)
PBR1	Gene que codifica para proteinase B
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR1	Gene que codifica para carboxipeptidase Y
PEP4	Gene que codifica proteinase A vacuolar
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)
RPM	Rotações por minuto
SCP	Single-cell protein (produção de proteínas unicelulares)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
μ mol/l	Micromol por litro
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

YPD	Extrato de levedura peptona e dextrose
YPDS	Extrato de levedura peptona e dextrose contendo sorbitol
YNB	Base nitrogenada para leveduras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS DE INTERESSE INDUSTRIAL	16
2.2 SISTEMAS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGOS	18
2.3 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM <i>Pichia pastoris</i>	22
2.3.1 Promotores clássicos em <i>P. pastoris</i>	24
2.3.2 Principais linhagens hospedeiras de <i>P. pastoris</i>	25
2.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA CATALASE	26
2.4.1 Mecanismo de reação das catalases	27
2.4.2 Expressão recombinante de catalase em <i>E. coli</i> e suas aplicações	29
2.4.3 Catalase no setor odontológico	31
2.4.4 Produção recombinante de catalase bacteriana em células de <i>P. pastoris</i>	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO FRAGMENTO <i>Kat</i>	36
4.2 AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO <i>KAT</i> A PARTIR DO VETOR RECOMBINANTE pPIC9K_ <i>Kat</i>	39
4.3 CLONAGEM DO FRAGMENTO <i>KAT</i> NO VETOR DE PROPAGAÇÃO pGEM-T Easy	40
4.4 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pPICZ α A_ <i>Kat</i>	41
4.5 EXPRESSÃO DA CATALASE NO SISTEMA <i>Pichia pastoris</i>	44
4.5.1 Linearização e precipitação do vetor de expressão pPICZ α A_ <i>Kat</i>	44
4.5.2 Preparação de células competentes de <i>P. pastoris</i> KM71H e X-33	44
4.5.3 Transformação da construção pPICZ α A_ <i>Kat</i> em células de <i>P. pastoris</i>	45
4.5.4 Seleção de clones positivos para a transformação da construção pPICZ α A_ <i>Kat</i> em células de <i>P.pastoris</i>	45
4.5.5 Ensaio de expressão em pequena escala da catalase recombinante em células de <i>P.pastoris</i>	46
4.5.6 Análise de expressão da proteína recombinante em <i>P. pastoris</i>	46
4.6 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-28a_ <i>Kat</i>	47
4.7 ENSAIO DA EXPRESSÃO DA CATALASE NO SISTEMA <i>E. coli</i>	49
4.7.1 Ensaio de solubilidade e purificação da catalase expressa em <i>E.coli</i>	50
4.8 ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pPICZ α A_ <i>Kat</i>	53
5.1.2 Transformação em células de <i>P. pastoris</i>	54

5.1.3 Seleção de clones positivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71H e X-33 em placas com YPDS contendo Zeocina	55
5.1.4 Análise da expressão da catalase em células de <i>P. pastoris</i> em pequena escala	57
5.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-28a_ <i>Kat</i>	61
5.2.1 Expressão da catalase em células de <i>E. coli</i>	63
5.2.2 Solubilidade e purificação da catalase expressa em <i>E.coli</i>	63
5.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	67
6 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são definidas como biocatalisadores em sua maioria de origem proteica, estas desempenham um papel crucial na aceleração de diversas reações e processos metabólicos (THAPA et al., 2019). Há muito tempo as enzimas pelas suas características como o baixo consumo de energia, por serem ecologicamente viáveis, pela sua alta eficiência e alta especificidade de substrato, têm-se tornado fatores importantes no desenvolvimento de diferentes bioprocessos industriais (LIU et al., 2013; THAPA et al., 2019).

Inumeráveis enzimas são obtidas de vegetais, animais e microrganismos, no entanto, estes últimos se tornam uma fonte interessante de enzimas para aplicações industriais devido aos altos rendimentos, cultivo relativamente rápido e fácil manuseio. Todos esses fatores somados aos diferentes desafios ambientais enfrentados na atualidade e a crescente necessidade de abordá-los de uma forma sustentável, tem aumentado a demanda de enzimas industriais; conseqüentemente o mercado global de enzimas industriais atingiu quase US \$ 4,6 bilhões em 2014 e estima-se que aumente a US \$ 6,3 bilhões em 2021(THAPA et al., 2019; <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>)

Assim, técnicas da engenharia genética representam uma ferramenta alternativa para a produção de inúmeras enzimas de interesse industrial a larga escala. Uma dessas técnicas é a expressão de proteínas heterólogas, que constitui uma abordagem bem estabelecida que tem permitido clonar e expressar genes de organismos difíceis de manter em condições laboratoriais em organismos altamente eficientes como *E. coli*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*, entre outros. Muitas enzimas e outros produtos proteicos comercializados com sucesso têm sido produzidos através deste tipo de processos biotecnológicos, alguns exemplos são: insulina, interferões, vacina da hepatite B, α -amilase, proteases, lipases, peroxidases, xilanase, fitase, catalase, entre outras (DEMAIN & VAISHNAV, 2009; KAUR et al., 2018; SANCHEZ-GARCIA et al., 2016).

Nesta pesquisa pretende-se expressar uma catalase da bactéria *Serratia marcescens* em células de *E. coli* e *P.pastoris* visando uma aplicação biotecnológica. As catalases (EC 1.11.1.6) são metaloenzimas antioxidantes omnipresentes entre organismos aeróbicos, que tem como principal função proteger as células do estresse oxidativo causado pelo excesso de peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) catalisando a sua decomposição em água e oxigênio molecular. Além da sua função antioxidante as catalase são caracterizadas por vários potenciais biotecnológicos que abrangem diferentes setores industriais como: alimentício, têxteis, farmacológico, entre outros (JIA et al., 2017; SHAEER et a., 2019; TIAN et al., 2013).

Recentemente tem se desenvolvido trabalhos que evidenciam a aplicação da catalase no setor odontológico dado que muitos tratamentos de clareamento dental utilizam altas concentrações de peróxidos, e sabe-se que o uso de peróxidos em altas concentrações pode causar sensibilidade dentária, alteração na morfologia da superfície do esmalte, redução na resistência de união de materiais de resina e até carcinogenicidade, assim a catalase se torna uma alternativa ideal para reduzir o estresse oxidativo no tecido dental e remover de maneira eficaz os radicais livres residuais (SHARMA et al., 2015).

Um estudo demonstrou que a remoção eficaz dos radicais livres pela catalase melhora a remineralização da microestrutura do esmalte dos dentes mediada por flúor, em dentes previamente tratados com altas concentrações de peróxidos (SHARMA et al., 2015; THAKUR et al., 2015).

Todas as pesquisas relacionadas com a produção de catalase recombinante e a sua respectiva aplicação indicam que pode ser uma estratégia promissora de aplicação não apenas nos diferentes setores industriais, mas também no setor odontológico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Os microrganismos são considerados um dos maiores reservatórios de enzimas extremamente diversas e multifuncionais, o que os torna um pilar fundamental da biotecnologia industrial e de uma economia de base biológica (LI et al., 2016; LIU et al., 2013; THAPA et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

Os diferentes atributos de algumas enzimas microbianas como a termoestabilidade, estabilidade em amplas faixas de valores de pH e versatilidade catalítica as tornam fatores promissores em diferentes processos biotecnológicos sob diversas condições físicas e químicas. O surgimento da tecnologia de DNA recombinante tem permitido explorar novas combinações de genes de diferentes organismos e a expressão de proteínas codificadas por esses genes, tudo isso tem promovido a produção de inúmeras enzimas e produtos microbianos de forma recombinante; visando a sua aplicação industrial (KAUR et al., 2018; THAPA et al., 2019).

Assim, a expressão de proteínas heterólogas pela sua alta eficiência, baixos custos de execução, a fácil manipulação genética e molecular dos organismos utilizados para este fim, tem se convertido numa ferramenta interessante para a produção de enzimas (α -amilase, lipases, proteases, pululanase, lacase, peroxidase, catalase, endoglucanase, pectinase, xilanase, fitase) com diferentes usos industriais como processamento de alimentos (FANG et al., 2019; ZHANG et al., 2019b RANJAN & SATYANARAYANA, 2016; RESINA et al., 2004), síntese de polímeros, produção de biofármacos (SAMUEL et al., 2013), fabricação de detergentes, têxteis, branqueamento de papel (CAYETANO-CRUZ et al., 2016; SASAKI et al., 2019), refinarias de biocombustíveis, tratamento de resíduos industriais (AVELAR et al., 2017; LU et al., 2013; YADAV et al., 2018), entre outros.

A maioria dos processos industriais são realizados em ambientes agressivos como altas temperaturas, condições extremas de pH, alta concentração de sais, entre outros. No entanto, algumas enzimas utilizadas atualmente na indústria são obtidas a partir de organismos mesófilos (algumas bactérias, fungos, plantas e animais) assim, técnicas biotecnológicas como a do DNA recombinante têm

permitido a expressão de proteínas provenientes de microrganismos que são difíceis de manipular e de manter em condições laboratoriais como algumas espécies dos gêneros *Dictyoglomus* (BERGQUIST et al., 2002), *Geobacillus* (SHAEER et al., 2019), *Bacillus* (SUMMPUNN et al., 2011; LU et al., 2013), *Thermus* (ROCHA et al., 2011), *Thermothelomyces* (ZERVA et al., 2019), *Thermomonospora* (LÁZARO et al., 2017), *Thermomyces*, entre outros (RANJAN & SATYANARAYANA, 2016; RIGOLDI et al., 2018).

Atualmente existem muitos trabalhos focados na produção de enzimas utilizando diferentes sistemas heterólogos, com a finalidade de atender a crescente demanda de utilização de enzimas e outras biomoléculas para aplicações em diferentes setores da indústria. Por exemplo, Ranjan & Satyanarayana, 2016 expressaram a enzima fitase do fungo termófilo *Sporotrichum thermophile* em *Pichia pastoris*, produzindo uma concentração de fitase recombinante 40 vezes superior à proteína nativa. A enzima fitase é um ingrediente fundamental na ração de animais não ruminantes, pois melhora a absorção de fósforo presente nos fitatos (forma de armazenamento de fósforo nas plantas), além disso, bloqueia a translocação do fósforo para o solo, o que está relacionado com a eutrofização; um problema ambiental de grande impacto (RIGOLDI et al., 2018)

Igualmente Zhang et al., (2019a). Expressaram a enzima xilose redutase do fungo *Thermomyces lanuginosus* nas linhagens *P. pastoris* GS115 e *Saccharomyces cerevisiae* Y294 respectivamente. A enzima purificada mostrou uma atividade eficiente em uma ampla faixa de valores de pH e temperatura, características que a tornam uma enzima promissora na fermentação de biomassa lignocelulósica para a produção de xilitol e outros produtos de interesse industrial. Dessa forma a produção de xilitol por processos biotecnológicos se torna mais econômica e amigável com o meio ambiente (MEDINA et al., 2018).

Outra enzima de grande valor industrial produzida por processos biotecnológicos é a lacase da bactéria gram positiva *Streptomyces coelicolor* que utilizaram a *Pichia pastoris* como sistema de expressão obtendo altos níveis de lacase recombinante ativa (YADAV et al., 2018).

A maior parte das lacases utilizadas na atualidade são produzidas por fungos, cuja atividade é limitada por processos industriais agressivos, neste sentido a lacase bacteriana é considerada uma alternativa interessante pelas suas características desejáveis, como a atividade eficiente em altas temperaturas e pH

alcalino. As lacases são enzimas oxidativas que tem como principais substratos as aminas e fenóis, isto as torna enzimas versáteis com diversas aplicações biotecnológicas como o tratamento de águas residuais, biorremediação de solo contaminado, produção de bioetanol e biossensores, entre outras (RIGOLDI et al., 2018; THAPA et al., 2019).

A enzima Pro-transglutaminase da bactéria *Streptomyces mobaraensis* de grande relevância na indústria de alimentos também foi expressa em *Pichia pastoris* obtendo uma atividade enzimática 37.640 U/L quando os experimentos foram realizados em larga escala a uma temperatura de 20°C, pH 7 e 20% de oxigênio dissolvido. As transglutaminase são enzimas encontradas em tecidos de animais, plantas e em microrganismos; as de origem microbiana catalisam a formação de ligações cruzadas em grande parte das proteínas de alimentos e são utilizadas habitualmente como agentes aglutinantes em produtos cárneos e na produção de laticínios (iogurte, queijo, sorvete, entre outros) (THAPA et al., 2019; ÖZÇELİK et al., 2019)

2.2 SISTEMAS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGOS

A expressão gênica é um processo natural onde a informação armazenada em um gene de uma célula é convertido em produto funcional (proteína ou RNA). Este processo é fortemente regulado, assim a célula pode bloquear ou ativar a expressão de diferentes genes, como resultado de resposta a diferentes estímulos, e isto permite que uma célula responda de maneira eficiente às diversas mudanças no ambiente. Um exemplo típico em procariontes é a regulação da expressão do gene que codifica para a β - galactosidase em *E. coli*, cuja função principal é que catalisar a hidrólise da lactose para formar glicose e galactose, sendo sintetizada em resposta à presença de lactose no meio de cultivo (MCADAMS & ARKIN, 1997; ZAHA et al., 2014).

Existem vários hospedeiros utilizados para a expressão de proteínas recombinantes, como bactérias, leveduras, insetos, plantas e animais, no entanto *Escherichia coli* tem sido o sistema mais usado para produzir proteínas e peptídeos há várias décadas, por exemplo, a insulina humana (GOVENDER et al., 2020), peptídeo antimicrobiano (PR-39) (AZARI et al., 2020), vacina contra o parvovirus porcino (WANG et al., 2020), hormônio de crescimento humano (hGH)

(DOOZANDEH-JUIBARI et al., 2020), fator estimulador de colônias de granulócitos humanos (rhG-CSF) (DEWI et al., 2020), entre outros.

O sistema de expressão em células de *E. coli* possui a capacidade de crescer em meios de baixo custo sob condições laboratoriais bem definidas, além de ter um tempo de geração muito curto (20 minutos) o que torna a seleção de clones transformados relativamente fácil e conveniente, além disso, as células deste microrganismo são altamente eficientes para incorporar DNA estranho (vetores) e expressar proteínas recombinantes a uma taxa muito alta (YIN et al., 2007).

Apesar de todos esses atributos que esse sistema possui, algumas características como a baixa secreção extracelular de proteínas, toxicidade, incapacidade para realizar modificações pós-traducionais e a formação de corpos de inclusão, limitam a utilização desse sistema (GONÇALVES et al., 2013; YIN et al., 2007).

Por outro lado, algumas espécies de bactérias do gênero *Bacillus* como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* têm sido utilizadas como sistemas de expressão procarióticos alternativos, devido à capacidade de produzir e secretar grandes quantidades de proteínas no meio extracelular, além de não ter lipopolissacarídeo (LPS), que estão presentes em bactérias gram negativas como *E.coli* e podem provocar alguns distúrbios na saúde humana e animal, limitando assim o uso de proteínas recombinantes expressas nestes sistemas (YIN et al., 2007). Contudo, a necessidade de expressar proteínas recombinantes mais complexas que precisarem de modificações pós-traducionais e dobramento específico para o seu correto funcionamento, levou ao uso sistemas de expressão mais complexos como células de leveduras, fungos filamentosos, insetos, mamíferos, plantas e alguns organismos transgênicos (KAUR et al, 2018; TRUNG et al., 2019).

É evidente que os sistemas de expressão eucarióticos oferecem diferentes vantagens sobre os sistemas de expressão procarióticos como, por exemplo, a secreção extracelular eficiente de grandes quantidades de proteínas heterólogas, diferentes modificações pós-traducionais (glicosilação ligada a N e O, acilação com ácidos graxos, fosforilação, formação de ligações dissulfeto e clivagem proteolítica), além disso, muitos sistemas eucarióticos são mais seguros do que alguns sistemas procarióticos pela ausência de endotoxinas e oncogenes (BAGHBAN et al., 2019; GRAUMANN & PREMSTALLER, 2006)

O primeiro sistema eucariótico utilizado para a expressão de proteínas heterólogas foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tornando-se um hospedeiro de inúmeras proteínas recombinantes de alto valor comercial e produtos biofarmacêuticos de grande relevância médica como, por exemplo, o antígeno de superfície da hepatite B, urato oxidase, glucagon, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), hirudina, fator de crescimento derivado de plaquetas, entre outros (BAGHBAN et al., 2019; DEMAINE & VAISHNAV, 2009).

O sucesso de *S. cerevisiae* como sistema de expressão é devido à sua capacidade de processar e secretar adequadamente proteínas recombinantes no meio extracelular. Ademais, é um microrganismo que cresce facilmente em meios quimicamente definidos e de baixo custo; as técnicas para a sua manipulação genética estão bem estabelecidas, é um sistema geralmente considerado seguro pela ausência de endotoxinas (YIN et al., 2007).

Apesar de tudo o supracitado, *S. cerevisiae* exibe algumas características que limitam o uso dos seus produtos, uma dessas características é a adição de cadeias longas de manose (hiperglicosilação) o que pode levar a uma menor atividade funcional e maior imunogenicidade do produto recombinante (BAGHBAN et al., 2019; SASAKI et al., 2019; YIN et al., 2007). Essas limitações resultaram na utilização de outras leveduras como sistemas de expressão alternativos, incluindo *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Arxula adenivorans*, *Pichia pastoris*, entre outras (DEMAINE e VAISHNAV, 2009; GRAUMANN e PREMSTALLER, 2006; MCALEER et al., 1984;). Na tabela 1 apresentam-se alguns exemplos de produtos recombinantes de interesse produzidos em sistemas de levedura alternativos.

Tabela 1- Produtos recombinantes de interesse produzidos em sistemas de leveduras alternativos

(Continua)

Sistema de expressão	Produto	Tipo de produto
<i>Hansenula polymorpha</i>	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg)	Proteína/peptídeo
	Catalase	Enzima
	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1)	Proteína/peptídeo
	Fitase	Enzima
	Glicose oxidase	Enzima
	Hirudina	Proteína/Peptídeo
	Proteínas quiméricas L1/L2 do vírus do papiloma humano (HPV-16)	Proteína
<i>Yarrowia lipolytica</i>	α -amilase	Enzima
	Endo- β -mananase	Enzima
	Interferão alfa-2b	Proteína
	Lacase	Enzima
	Lipase B	Enzima
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Glicoproteínas E2 do envelope do vírus da hepatite C	Glicoproteína
	Interleucina 1 beta (IL-1 β)	Proteína
	Inulinase	Enzima
	Lacase	Enzima
	Lipase A	Enzima
	Renina (quimosina)	Enzima
<i>Arxula adenivorans</i>	Tirosinase	Enzima
	Interleucina 6 (IL-6)	Proteína
	Receptor de estrogênio α (hER α)	Proteína
	Tanase	Enzima

Tabela 1- Produtos recombinantes de interesse produzidos em sistemas de leveduras alternativos

		(Conclusão)
Sistema de expressão	Produto	Tipo de produto
<i>Pichia pastoris</i>	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B	Proteína/peptídeo
	Catalase	Enzima
	Fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1)	Proteína/peptídeo
	Fator inibitório da leucemia (LIF)	Glicoproteína
	Glicoproteína D do herpesvírus bovino-1 (BoHV-1)	Glicoproteína
	Insulina	Proteína/peptídeo
	Interferão alfa-2b glicosilado	Proteína
	Interleucina-17 (hIL-17)	Proteína
	Lipase B	Enzima
	Xilanase	Enzima

Fonte: adaptado de Çelik & Çalik (2012); Cereghino & Cregg (2000); Madzak (2015); Sibirny, (2017); Spohner et al. (2016); Wagner & Alper (2016).

2.3 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é uma levedura anaeróbica facultativa e metilotrófica. Este microrganismo inicialmente foi utilizado pela Philips Petroleum Company para a produção de proteína unicelular (SCP) a fim de ser comercializada como complemento da ração animal, no entanto o aumento do preço do metanol pela crise do petróleo, além da queda do preço da soja em 1970 foram os principais fatores que tornaram a produção de SCP pouco rentável economicamente; conseqüentemente, dez anos depois a Philips Petroleum contatou a Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA) para realizar diversos estudos genéticos e moleculares com o objetivo de desenvolver *P. pastoris* como um sistema de expressão de proteínas heterólogas (CEREGHINO & CREGG, 2000; CREGG et al., 2000; JUTURU & WU, 2018).

Atualmente *P. pastoris* é considerado um sistema bem-sucedido de expressão de proteínas de interesse industrial, terapêutico e comercial; tudo isso é atribuído à capacidade de atingir altas densidades celulares em meios complexos e mínimos, sua alta eficiência de secreção de proteínas, seu repertório de promotores

induzíveis e constitutivos, a capacidade de realizar modificações pós-traducionais próprias de organismos eucarióticos superiores (dobragem correta de proteínas, glicosilação, formações de ligação de disulfeto, entre outras). (CREGG et al., 2000; JUTURU & WU, 2018; YANG & ZHANG, 2018).

Além dessas características, existem algumas vantagens que tornam a *P. pastoris* como um sistema preferencial sobre *S. cerevisiae*, a citar: a capacidade de secretar grandes quantidades de proteínas, a adição de uma baixa quantidade de resíduos de manose durante o processo de glicosilação do produto recombinante (8 a 14 resíduos); sabe-se que a *S. cerevisiae* adiciona entre 50 a 100 resíduos de manose durante o processo de glicosilação, o que pode alterar o funcionamento das proteínas; outra vantagem é a ausência de ligações α -1,3 glicano entre os resíduos de manose, os quais são responsáveis pela atividade hiper-antigênica de muitas proteínas expressas em *S. cerevisiae*, o que limita o uso delas no setor terapêutico (DARBY et al., 2012; JUTURU & WU, 2018).

Com o desenvolvimento de *P. pastoris* como um sistema de expressão de proteínas têm sido realizadas pesquisas que visam não apenas a expressão de altos níveis de proteínas recombinante, mas também o melhoramento do sistema para gerar uma expressão eficiente de proteínas funcionalmente ativas (JUTURU & WU, 2018).

Algumas pesquisas atuais com este microrganismo são, por exemplo, a expressão e caracterização da enzima lipase termoestável (LK1) na linhagem *P. pastoris* GS115. A LK1 foi expressa em um peso molecular de 35.5 kDa e mostrou uma boa atividade enzimática com uma temperatura de 60 °C e pH 8. As lipases termoestáveis são cruciais em processos industriais complexos, sendo a expressão recombinante em *P. pastoris* uma alternativa para produzir lipases ativas em altos níveis visando uma aplicação industrial (FURQAN, 2020).

Por outro lado, Zhang et al., 2020 expressaram uma peroxidase de manganês do fungo *Cerrena unicolor* BBP6 em *P. pastoris*. A proteína foi expressa com sucesso na linhagem *P.pastoris* X-33. A enzima recombinante (rMnP3-BBP6) mostrou uma atividade de 154.5 U/L, uma forte ação descolorante e capacidade para degradar efetivamente o fluoreno e o fenantreno. Este estudo demonstrou que o rMnP3-BBP6 tem um potencial promissor na biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e na indústria têxtil.

2.3.1 Promotores clássicos em *P. pastoris*

Os promotores desempenham um papel fundamental nos sistemas de expressão já que estes controlam o início do processo de transcrição do gene alvo. Algumas características básicas que devem ter um promotor ideal são: ser o suficientemente forte para permitir a expressão de uma considerável quantidade de produto e ser fortemente regulado para evitar a produção de produtos tóxicos (KAUR et al., 2018).

A enzima álcool oxidase desempenha um papel importante no metabolismo do metanol, pois catalisa o primeiro passo da sua assimilação, oxidando o metanol em formaldeído e peróxido de hidrogênio; o genoma de *P. pastoris* tem dois genes (AOX1 e AOX2) que codificam a álcool oxidase e sua síntese está regulada, maiormente pelo promotor P_{AOX1} que constitui um dos promotores mais utilizados para promover a expressão proteínas heterólogas devido à sua regulação rígida e forte indutibilidade quando o metanol é usado como única fonte de carbono. A regulação da expressão de AOX1 é controlada no nível da transcrição e envolve dois mecanismos, um mecanismo de repressão/desrepressão por catabólito (glicose, glicerol ou etanol) e outro de indução pelo metanol. As condições de desrepressão não são suficientes para ocorrer transcrição significativa do gene AOX1 o que requer a presença do agente indutor. Embora o P_{AOX1} seja o promotor mais amplamente estudado e utilizado, até hoje continua sendo o foco de muitas pesquisas que visam o desenvolvimento de novos sistemas de expressão que não requerem do metanol (CEREGHINO & CREGG, 2000).

O uso do metanol como indutor limita a aplicação de proteínas na indústria de alimentos e farmacêutica pela sua alta toxicidade. Desse modo, existem outros promotores como o P_{GAP} do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase que fornece uma alternativa para promover a expressão de proteínas utilizando glicose como indutor (CEREGHINO & CREGG, 2000).

O P_{GAP} é caracterizado por uma expressão constitutiva de alto nível o que torna mais adequado para o cultivo contínuo devido a controles de processos mais simples (CEREGHINO & CREGG, 2000; YANG & ZHANG, 2018).

2.3.2 Principais linhagens hospedeiras de *P. pastoris*

Todas as linhagens da levedura *P. pastoris* utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes são derivadas da NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories), e são classificadas principalmente em auxotróficas e deficientes de proteases. As linhagens auxotróficas mais utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes são GS115 (*his4*), KM71 (*his4*, *aox1::ARG4*, *arg4*), KM71H (*aox1::ARG4*, *arg4*). Algumas linhagens auxotróficas que tem o gene AOX deletado são utilizadas para expressar proteínas de aplicação na indústria farmacêutica e de alimentos, dado que requer menor quantidade de metanol para induzir a expressão, isso também pode significar uma grande vantagem na produção de proteínas em larga escala por processos fermentativos, onde a utilização de grandes quantidades de metanol pode representar riscos de incêndios (CREGG et al., 2000; JUTURU e WU, 2018).

A linhagem GS115 (*his4*) e KM71 tem em comum uma mutação no gene que codifica para a enzima histinidol desidrogenase, que catalisa várias etapas da biossíntese da histidina, isso permite a seleção de transformantes com vetor contendo o gene *HIS4*; enquanto as linhagens KM71 e a KM71H tem o gene *AOX1* deletado e substituído pelo gene *ARG4* da levedura *Saccharomyces cerevisiae*; estas linhagens normalmente crescem a uma taxa lenta em presença de metanol (fenótipo Mut^s) contrário ao que acontece com linhagens selvagens como a X-33 que tem um crescimento rápido em presença de metanol (fenótipo Mut⁺) (ANG et al., 2016; CEREGHINO & CREGG, 2000; CREGG et al., 2000; JUTURU & WU, 2018).

Muitas proteínas recombinantes secretadas por *P. pastoris* são altamente sensíveis às proteases vacuolares produzidas em culturas de altas densidades celulares, isso representa um grande problema na atividade e rendimento do produto, porém o desenvolvimento de linhagens deficientes em proteases como MD1165 (*his4 prb1*), SMD1168 (*his4 pep4*), SMD1163 (*his4 pep4 prb1*), entre outras, apesar de apresentar taxas de crescimento mais lentas, menor eficiência de transformação e menor viabilidade podem fornecer um ambiente propício para a expressão de proteínas recombinantes sensíveis a proteases. O gene *PEP4* codifica para uma protease vacuolar denominada protease A, que é fundamental para a ativação de mais duas proteases, a carboxipeptidase Y e a proteinase B, que são

codificadas pelos genes PCR1 e PBR1 respectivamente, assim as linhagens com mutações nos genes PEP4 e PBR1 são as mais eficazes na prevenção da degradação proteica (AHMAD et al., 2014; CREGG et al., 2000; JUTURU & WU, 2018).

2.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA CATALASE

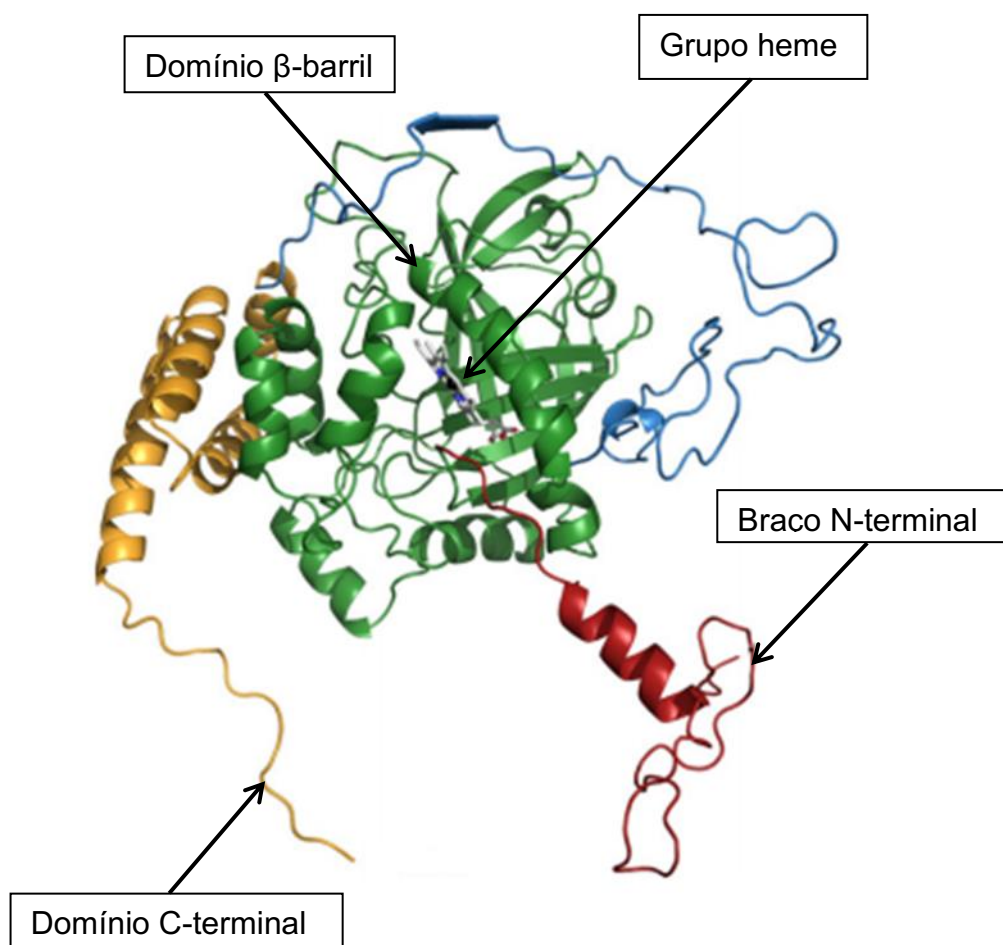
Catalases (EC1. 11.1.6), são enzimas da família oxidorreductase, estão presentes nos três domínios da vida e constituem um dos principais componentes no processo de detoxificação celular dado que catalisam a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em moléculas inócuas (água e oxigênio), evitando assim a formação de outras espécies reativas de oxigênio (ROS) como os radicais hidroxilas, quem constituem um dos fatores causantes do estresse oxidativo nas células. As ROS são poderosos agentes oxidantes que interagem com macromoléculas, como as proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, afetando a sua integridade e conformação, o que causa danos irreversíveis nas células (CZYZEWSKA e TRUSEK, 2018; SHAEER et al., 2019; SOOCH et al., 2014).

Baseado nas suas propriedades físicas e bioquímicas as catalases podem ser classificadas em três classes, a classe 1 e 2 contém as heme catalases cujo centro ativo é uma porfirina de ferro mononuclear e a terceira classe contém as catalases não heme. As catalases monofuncionais (classe 1) são as mais amplamente estendidas e caracterizadas, estão onipresentes entre animais, plantas e microrganismos; a sua estrutura varia com respeito ao número e a identidade de domínios em diferentes espécies, o seu grupo prostético (heme) é o responsável da atividade catalítica da enzima. A massa molecular desse tipo de catalases é de 200–340 kDa com um grupo protético heme no centro catalítico. A catalase utilizada neste estudo é uma catalase da classe 1 (monofuncional). Na Figura 1 pode-se observar a estrutura de um monômero de uma heme catalase monofuncional bacteriana.

A segunda classe é composta por catalase-peroxidases contendo heme bifuncional que exibe atividade de catalase e peroxidase, é a classe menos prevalente, encontrada principalmente em bactérias aeróbicas, não está presente em plantas e animais, mas se assemelham às peroxidases de plantas e fungos; tem uma massa molecular na faixa de 120-340 kDa.

Por último a terceira classe, catalases não heme, utiliza manganês em vez de ferro e é conhecida como catalase de manganês ou pseudocatalase, são catalases menores encontradas principalmente em procariotos. Essas enzimas exibem peso molecular na faixa de 170–210 kDa (KLOTZ & LOEWEN, 2003; SHAEER et al., 2019; SOOCH et al., 2014; ZENG et al., 2011).

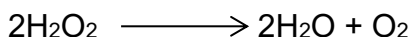
Figura 1- Representação da estrutura do monômero da heme catalase monofuncional DR1998 de *Deinococcus radiodurans*.



Fonte: Borges et al.(2014)

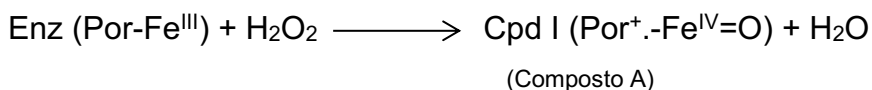
2.4.1 Mecanismo de reação das catalases

A principal reação das catalases é degradar duas moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (CHELIKANI et al., 2004; ZAMOCKY et al., 2008; SOOCH et al., 2014).

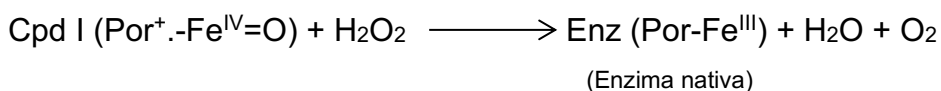
Reação 1:

Esta reação geral pode ser dividida em duas fases, mas o que está envolvido em cada uma das fases depende do tipo de catalase. As heme catalase têm em comum um mecanismo de duas etapas para a degradação de H_2O_2 (CHELIKANI et al., 2004; ZAMOCKY et al., 2008; SOOCH et al., 2014).

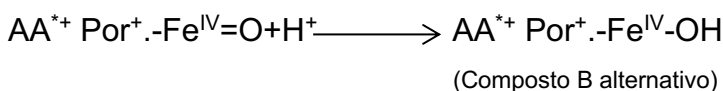
Etapa 1. Uma molécula de peróxido de hidrogênio oxida o heme a uma espécie de oxiferrila na qual um equivalente de oxidação é removido do ferro e do anel de porfirina para gerar um radical de cátion porfirina (**Reação 2**) (CHELIKANI et al., 2004; SOOCH et al., 2014).



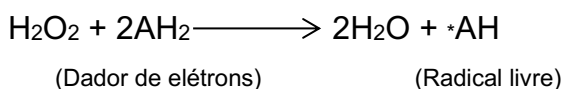
Etapa 2. A segunda molécula de peróxido de hidrogênio é utilizada como um redutor do composto A para regenerar a enzima em estado de repouso, água e oxigênio (**Reação 3**) (CHELIKANI et al., 2004; ZAMOCKY et al., 2008; SOOCH et al., 2014).



Outro composto alternativo B cataliticamente inativo pode ser formado do composto A por redução intramolecular de elétron único (com ou sem um próton), o que leva à diminuição da atividade da catalase ao longo do tempo (**Reação 3**). Nesta reação, um radical porfiril é reduzido pelo elétron doado pela porção da proteína (AA é um aminoácido alternativo próximo ao heme). (SOOCH et al., 2014).

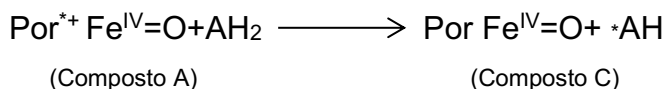


Atualmente existem debates sobre se as reações 1 e 2 também ocorrem na catálise catalase-peroxidase. No entanto, foi estabelecido que as catalases de manganês seguem um esquema de reação diferente (ZAMOCKY et al., 2008). De maneira geral a catalase-peroxidase catalisa uma reação peroxidática (**Reação 4**) envolvendo o uso de um doador de elétrons orgânico (AH_2) para a redução do composto A.

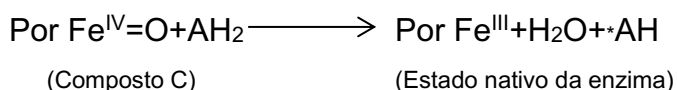


O ciclo catalítico da catalase-peroxidase consiste em três etapas de reação:

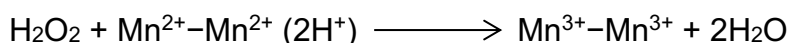
- ✓ Formação do Composto A (**Reação 2**)
- ✓ Redução do composto A no composto C (**Reação 5**)



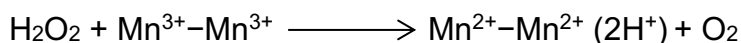
- ✓ Finalmente, a redução do composto C de volta ao estado nativo da enzima (**Reação 6**)



O mecanismo de reação da degradação do peróxido de hidrogênio pelas catalases de manganês é diferente das outras catalases. O sítio ativo da enzima acomoda ambos os estados do núcleo de dimanganês durante a reação catalítica. A polarização da ligação O - O pelo aglomerado $\text{Mn}^{2+} - \text{Mn}^{2+}$ causa a clivagem heterolítica da ligação peroxídica junto com a liberação da molécula de água (**Reação 7**) (WHITTAKER et al., 2003).



A oxidação do peróxido de hidrogênio leva à liberação de dióxigênio por uma simples transferência de elétrons (**Reação 8**) (WHITTAKER et al., 2003).



2.4.2 Expressão recombinante de catalase em *E. coli* e suas aplicações

As catalases além da sua poderosa capacidade de decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, são caracterizadas por vários potenciais biotecnológicos que abrangem diferentes setores industriais como: alimentícios (CZYZEWSKA & TRUSEK, 2018), têxteis, farmacológicos (JIA et al., 2017), entre outros. Atualmente catalases comerciais são obtidas a partir de organismos mesófilos e por processos que podem ser realmente custosos. Uma das alternativas eficazes para a produção de proteínas com aplicação industrial é a expressão recombinante, assim os microrganismos são uma fonte preferida de catalase para pesquisas e aplicações devido aos seus altos níveis de atividade (LUO et al., 2012; ZENG et al., 2011).

Por outro lado, o peróxido de hidrogênio graças ao seu alto potencial oxidante é utilizado comercialmente em vários processos, incluindo o

branqueamento de papel e têxtil, tratamento de águas, conservação de alimentos como o leite devido as suas propriedades esporicidas e bactericidas, também é utilizado como agente esterilizante de materiais de embalagem e dispositivos médicos; a pesar disso, o peróxido de hidrogênio em altas concentrações pode tornar-se altamente tóxico para o ambiente, a saúde humana e animal. Algumas alternativas para remover o peróxido de hidrogênio residual podem ser custosas e até gerar mais agentes contaminantes, assim a catalase se torna uma alternativa realmente promissora para a remoção rápida e efetiva de H_2O_2 . (CZYZEWSKA & TRUSEK, 2018; JIA et al., 2017).

A maioria dos processos industriais onde é utilizado o H_2O_2 são efetuados em condições de extrema temperatura e pH, deste modo a produção de enzimas termoestáveis constitui uma alternativa promissora. Porém, a principal fonte deste tipo de enzimas são organismos termófilos cujas exigências para a sua manutenção são difíceis de atender no laboratório, assim a expressão recombinante se torna uma alternativa rápida e eficiente para suprir estas necessidades (JIA et al., 2017; SHAEER et al., 2019).

Diante do exposto, tem-se promovido muitas pesquisas que visam à expressão de catalase termoestáveis para aplicação biotecnológica. Desta forma podem-se ressaltar o trabalho de Shaeer et al. (2019). Que produziu uma catalase de manganês da bactéria termófila *Geobacillus thermopakistaniensis* em células de *E. coli*. A proteína foi expressa em corpos de inclusão inativos, no entanto por processo de solubilização foram ativados e alcançaram uma atividade específica de $18.521 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ durante 1 hora a 100°C . Todos esses atributos o tornam um catalisador valioso para aplicações industriais

Dessa forma, uma catalase monofuncional de *Geobacillus* sp. foi produzida em células de *E. coli*. A catalase recombinante foi altamente solúvel e exibiu uma atividade específica de 40.526 U/mg, além de mostrar uma excelente atividade em uma ampla faixa de temperaturas de reação, variando de 10°C a 90°C . A enzima reteve 94.7% de sua atividade residual após a incubação a 60°C por 1 hora. O alto rendimento e as excelentes propriedades termoestáveis desta catalase são recursos interessantes para a aplicação em diferentes setores industriais (JIA et al., 2016).

Por outro lado, um tipo de catalase recombinante de uma bactéria do gênero *Serratia* que exibe uma alta atividade em uma ampla faixa de pH foi encapsulada em uma estrutura de hidrogel para ser utilizada como um agente removedor de H_2O_2

residual no setor de laticínios. Após o encapsulamento a catalase mostrou uma alta atividade em condições ácidas (pH entre 4,4 a 6,6) e em baixas temperaturas (6°C a 15°C) além de exibir uma alta estabilidade nos meios naturais, especialmente no leite. Sua alta atividade durante a decomposição do peróxido no leite e a possibilidade de reutilização constitui uma alternativa de aplicação na indústria de alimentos (CZYZEWSKA e TRUSEK, 2018).

Existem varias espécies do gênero *Serratia*, como a *S. marcescens* que é um bacilo Gram negativo anaeróbio facultativo, que constitui uma fonte interessante de enzimas de interesse industrial, como quitinases, metaloproteases, catalases, entre outras. Algumas linhagens como a *S. marcescens* FZSF01, *S. marcescens* SYBC-01 e *S. marcescens* SYBC08 produzem catalases altamente eficientes (ZENG et al., 2010; ZENG et al., 2011; JIA et al., 2017; VÉLEZ-GÓMEZ et al., 2019; LI et al., 2020; ABBAS e GODA, 2021).

Por outro lado, existem outras linhagens desta espécie que são conhecidas no âmbito clínico como um microrganismo oportunista emergente que pode causar infecções associadas à saúde (ZENG et al., 2010; JIA et al., 2017; VÉLEZ-GÓMEZ et al., 2019; LI et al., 2020; ABBAS e GODA, 2021).

2.4.3 Catalase no setor odontológico

Nos últimos anos o clareamento dental tem-se tornado um dos procedimentos estéticos mais solicitados na odontologia estética devido a que produz resultados clínicos relativamente rápidos (LIMA et al., 2010; SOARES et al., 2019; AKABANE et al., 2021)

Atualmente sabe-se que um dos produtos utilizado para este tipo de terapias é o peróxido de hidrogênio em altas concentrações (30-40%), que é o principal responsável do clareamento da estrutura dental devido ao seu alto poder oxidante e aos seus produtos de reação, quem têm o potencial de quebrar os agentes cromóforos presentes na estrutura dentária, transformando-os em moléculas menores, menos coloridas e mais difusíveis, o que resulta no clareamento dos dentes (SOARES et al., 2019; AKABANE et al., 2021).

Alguns estudos têm demonstrado que os agentes clareadores como o peróxido de hidrogênio podem causar alterações na morfologia e dureza do esmalte o que está relacionada com a redução na resistência de união de materiais

resinosos (COCESKA et al., 2016; JUREMA et al., 2018; LIMA et al., 2019; AKABANE et al., 2021).

Por outro lado, um esmalte desmineralizado facilitaria a penetração das espécies reativas do oxigênio, levando à sensibilidade dentária, uma vez que também pode atingir o complexo dentina-polpa, resultando em respostas inflamatórias, alterações celulares e possível dano pulpar (TRINDADE et al., 2009; LIMA et al., 2010; SOARES et al., 2013; AKABANE et al., 2021).

Todos esses efeitos negativos ocasionados pelo peróxido de hidrogênio podem ser mitigados usando algum agente antioxidante que consiga neutralizar a maioria de radicais livres residuais originados pela decomposição do peróxido de hidrogênio no procedimento de clareamento dental; sendo o uso de catalase recombinante uma estratégia promissora (THAKUR et al., 2015; SHARMA et al., 2015).

Atualmente não existem trabalhos que visem o desenvolvimento de um produto odontológico que tenha como agente antioxidante uma catalase recombinante, isso representa uma ideia sustentável e inovadora; como por exemplo, a produção de um gel que contenham uma catalase recombinante utilizada como tratamento pós-branqueamento para retirar agentes oxidantes residuais.

Existem alguns estudos como os de THAKUR et al., (2015) e SHARMA et al., (2015) que têm demonstrado que o uso de catalase e verniz fluoretado melhora a remineralização da microestrutura do esmalte nos dentes previamente tratados com altas concentrações de peróxidos (37%). Estes estudos tornam-se um ponto de partida para futuros trabalhos que visem o desenvolvimento de algum produto que mitigue os efeitos negativos dos principais agentes químicos utilizados no processo de clareamento dental.

2.4.4 Produção recombinante de catalase bacteriana em células de *P. pastoris*

Há quase três décadas desde que foi desenvolvido *P. pastoris* como um sistema de expressão heterólogo de proteínas, têm-se produzido várias proteínas tanto em escala laboratorial como industrial. Algumas proteínas de importância médica como insulina, antígeno de superfície da hepatite B, albumina sérica humana, fator de crescimento epidérmico, entre outras foram produzidas comercialmente via expressão em *P. pastoris*, igualmente no setor da biotecnologia

industrial enzimas valiosas, incluindo fitase, lipase, mananase, xilanase, entre outras, também foram produzidas em escala comercial usando *P. pastoris* como sistema de expressão (JUTURU & WU, 2018; ZHU et al., 2019).

Existem muitas pesquisas que têm produzido proteínas bacterianas de grande valor biotecnológico em *P. pastoris*, como exemplo, lacase de *Bacillus licheniformis*, *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus pumilus* (LU et al., 2013; XIA et al., 2019; YADAV et al., 2018), transglutaminase de *Streptomyces mobaraensis* (TÜRKANOĞLU et al., 2019), L-Asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* (EFFER et al., 2019), xilanase A de *Bacillus amyloliquefaciens* (LIU et al., 2017), endoglucanase (E1) de *Acidothermus cellulolyticus* (LINDENMUTH & MCDONALD, 2011), xilanase de *Cellulomonas uda* (CAYETANO-CRUZ et al., 2016), protease alcalina de *Bacillus stearothermophilus* FI (LATIFFI et al., 2013), inulina frutotransferase de *Arthrobacter aureus* (ZHAN et al., 2015), proteína estafilocócica A (SPA) de *Staphylococcus aureus* (HAO et al., 2013), queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1 (PORRES et al., 2002), haloalcano desalogenase de *Sphingomonas paucimobilis* (NAKAMURA et al., 2006).

Apesar disso, são poucos os trabalhos que visam à expressão heteróloga de catalase bacteriana em *P. pastoris*; as maiorias das catalases expressas neste sistema são de origem eucariótica, assim este trabalho se converte em uma das poucas pesquisas que tem como objetivo produzir uma catalase de uma bactéria no hospedeiro *P. pastoris*.

Em relação à expressão de catalase de origem eucariótica em células de *P. pastoris* podem-se destacar alguns trabalhos atuais como o de Zhang et al.,(2019b) que produziu uma catalase do trigo; igualmente Shi et al.,(2013) que produziu uma catalase humana recombinante (rhCAT) e testou os seus efeitos terapêuticos no tratamento da pneumonia induzida pelo vírus H1N1, neste trabalho foi verificado que o rhCAT pode restaurar a fagocitose alterada e reduzir a carga viral do tecido pulmonar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

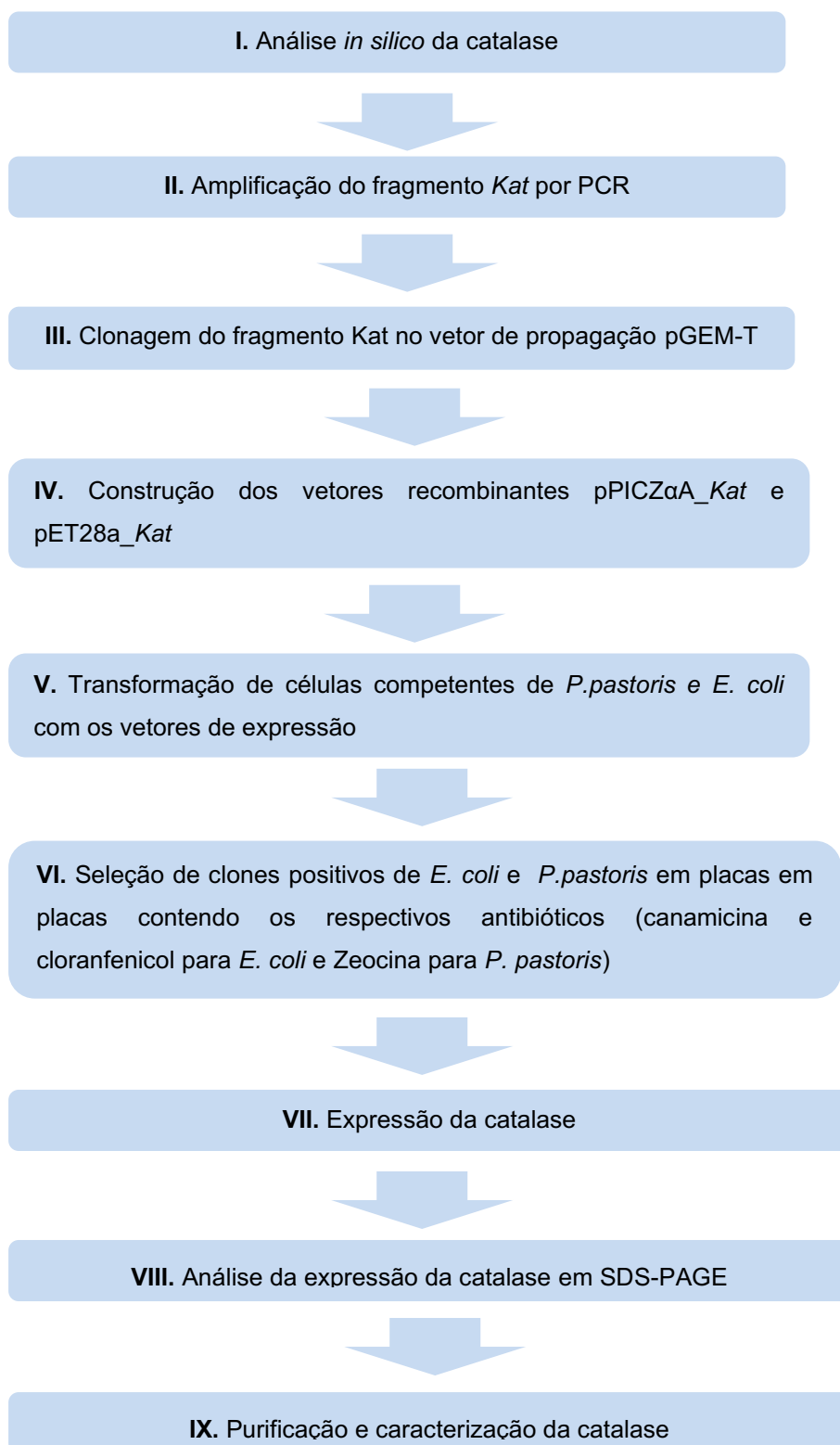
Utilizar os sistemas de expressão *E. coli* e *P. pastoris* para produzir uma catalase de *Serratia marcescens*, visando uma futura aplicação biotecnológica.

3.2 Objetivos específicos

- A. Construção do vetor de expressão contendo o fragmento *Kat*, utilizando pPICZαA
- B. Transformar células de *P. pastoris* com o vetor de expressão pPICZαA contendo o fragmento *Kat*
- C. Selecionar clones positivos em *P. pastoris* para a expressão da catalase recombinante
- D. Analisar a expressão da catalase recombinante no sistema de expressão *Pichia pastoris*
- E. Construção do vetor de expressão contendo o fragmento *Kat*, utilizando o pET-28a como base
- F. Transformar células de *E.coli* com vetor de expressão pET-28a contendo o fragmento *kat*
- G. Selecionar clones positivos *E.coli* para a expressão da catalase recombinante
- H. Analisar a expressão da catalase recombinante no sistema de expressão *E.coli*
- I. Purificar e caracterizar a catalase recombinante expressa em *E.coli*
- J. Testar a atividade da catalase recombinante purificada

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos desta pesquisa foram realizados na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBV) e na Universidade Estadual de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos (IFSC). O seguinte fluxograma apresenta a síntese das etapas realizadas neste estudo:



4.1 ANÁLISE *IN SILICO* DO FRAGMENTO *Kat*

Realizou-se uma análise *in silico* do fragmento *Kat* que codifica para um tipo de catalase alcalina, utilizando as ferramentas das plataformas Expasy, NCBI e PSIPRED.

De acordo com NCBI o fragmento *Kat* que codifica para a catalase tem 1437 pb e a proteína está constituída de 478 aminoácidos.

Figura 2- Sequência de nucleotídeos que constitui ao fragmento *Kat*. Número de acesso KU350659.

```
ATGAGCAGGAAAGGACTGACCACCGCAGCCGGCGCCCCGGTTGTCGATAACAATAACGTGATCACCGCAG
GCAAACCGCGGCCCGATGCTGTTGCAGGACGTGTGGTTCCTGGAAAACTGGCCCACTTCGACCGTGAAGT
CATCCCCGAGCGTCGCATGCACGCCAAGGGTTCGGCGCCTACGGCACCTTTACCGTCACCCATGACATC
ACCCGCTACACGCGCGCCAAGATCTTCTCCGAAATCGGTAAGCAGACCGACATGTTTATCCGCTTCTCCA
CCGTCGCCGGTGAGCGCGCGGCCGATGCCGAACGCGACATTCGCGGTTTCGCCATGAAGTTCTATAC
CGAAGAAGGCAACTGGGATTTGGTGGGTAACGATACGCCGGTGTTTTATCTGCGCGATCCGCTGAAATTC
CCCGATCTCAACCACGTGGTGAACGCGATCCGCATACCAACCTGCGCAACCCAGTCTACAAGTGGGACT
TCTTCTCCACCTGCCGGAGTCGCTGCACCAGCTGACCATCGACTTCAGCGATCGCGGCATTCCGAAATC
CTACCGTCACATGCACGGTTTCGGCAGCCACACCTTCAGCTTTATCAATGCCGCCAACGAACGTTTCTGG
GTGAAATTCACCTCCGCTGCGAGCAAGGCATTGAAAACCTGATGGATGAAGAAGCGGAAGCGATCATCG
CCAAGGATCGCGAAAGCTCACAGCGCGATCTGTTTCGATGCGATCAAACGCGGCGACTTCCCGCGCTGGAA
GCTGCAAATTCAGATCATGCCGGAGCATGAGGCCTCGCAGACGCCATAACAACCCGTTTCGACCTAACCAAG
GTGTGGCCGCACGGCGACTACCCGCTGATCGACGTCGGCTTTTTTCGAGCTGAACCGCAACCCCGACAAC
ACTTCTCCGAGGTTGAGCAGGTGGCGATGAACCCCGCTAACGTGGTGGCGGCATCAGTTTCTCGCCGGA
TAAATGCTGCAGGGCCGCCTGTTCTCCTATGGCGATGCGCACCCGCTACCGCCTGGGCGTCAACCACCAC
CAGATCCCGGTGAACGGCGCCAAATGCCCGTTCACAACCTACCATCGCGACGGCGCGATGCGCGTGGACG
GCAACAGCGGCAACGGCGCCACCTACGAACCGAACAGCTTCGGCCTGTTCCAGGAGCAGCCGGACTTCAG
CGAGCCGCGCTGAGCATTGAGGGCGCGGCCGACCACTGGAATCATCGTGAAGACGACGATTACTACAGC
CAGCCGCGCGCTGTTCAACCTGCTGAGCGCCGAAGAGCACCAGCGCATGTTACCCCGCATCGCCGGCG
AACTGTGCGAGGTGCCGGAACACATCCAGCGCCGTCAAGTCGAGCTGTTACCAAGGTGCACCCCGACTA
CGGCGCCGGCGTCAACAAGGCGTTAGGACTGAAATAA
```

Fonte: NCBI

Figura 3- Sequência de aminoácidos que constitui á catalase codificada pelo fragmento *Kat*. Número de acesso ANG60484.

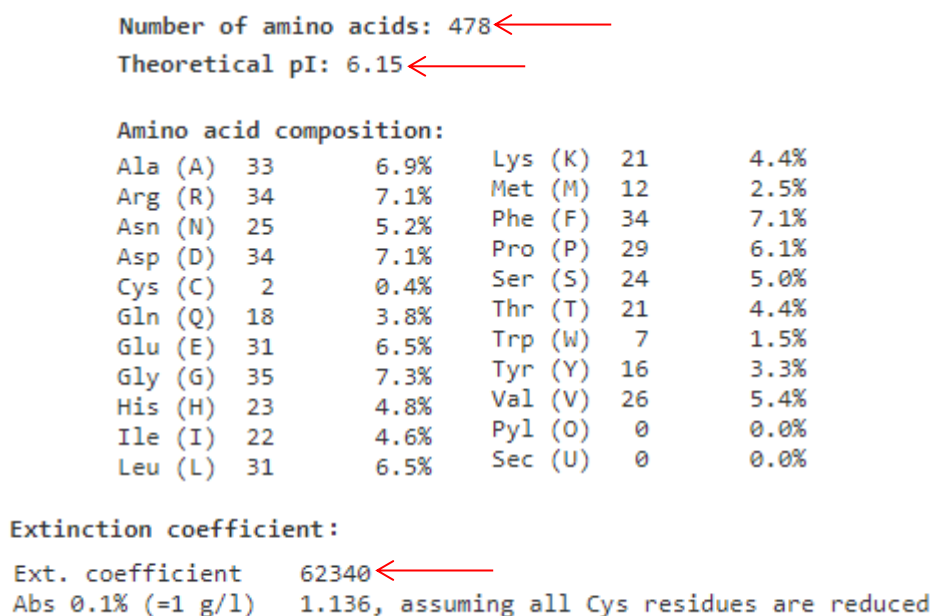
```
MSRKGLTTAAGAPVVDNNNVITAGKRGPMMLLQDVWFLEKLAHFDREVIPERRMHAKGSGAYGTFVTHDI
TRYTRAKIFSEIGKQTD MFIRFSTVAGERGAADAERDIRGFAMKFYTEEGNNDLVGN DTPVFYLRDPLKF
PDLNHVVKRD PHTNLRNPVYKWDFFSHLPESLHQLTIDFSDRGIPKSYRHMHGFGSHTFSFINAANERFW
VKFHFRC EQGIENLMDEEA EAI IAKDRESSQRDLFDAIKRGDFPRWKLQIQIMPEHEASQTPYNPFDLTK
VWPHGDYPLIDVGF FELNRNPDNYFSEVEQVAMNPANVVPGISFSPDKMLQGR LFSYGDAHRYRLGVNHH
QIPVNGAKCPFHNYHRD GMRVDGNSGN GATYEPNSFGLFQE QPDFSEPPLSIEGAADHWNHREDDDYYS
QPRALFNLLSAEEHQRMF TRIAGEL SQVPEHIQRRQVELFTKVHPDYGAGVTKALGLK
```

Fonte: NCBI

Para obter informação sobre algumas características da catalase em estudo, a sequência de aminoácidos foi submetida a outras análises, utilizando a ferramenta Expsy (ProtParam Tool), NetNGlyc 1.0 Server, NetOGlyc 4.0 Server e a plataforma PSIPRED.

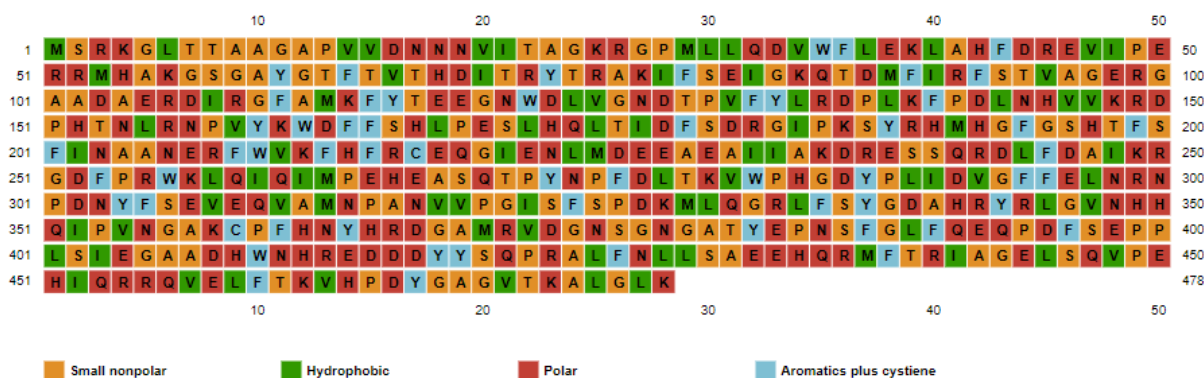
O resultado da análise feita com a ferramenta ProtParam Tool, informou o número e a proporção de aminoácidos que compõem a proteína, o coeficiente de extinção e o Potencial Isoelétrico teórico (pI) (Figura 4).

Figura 4- Resultados da análise feita com ProtParam Tool, em destaque com setas o número de aminoácidos, peso molecular, potencial isoelétrico e coeficiente de extinção.



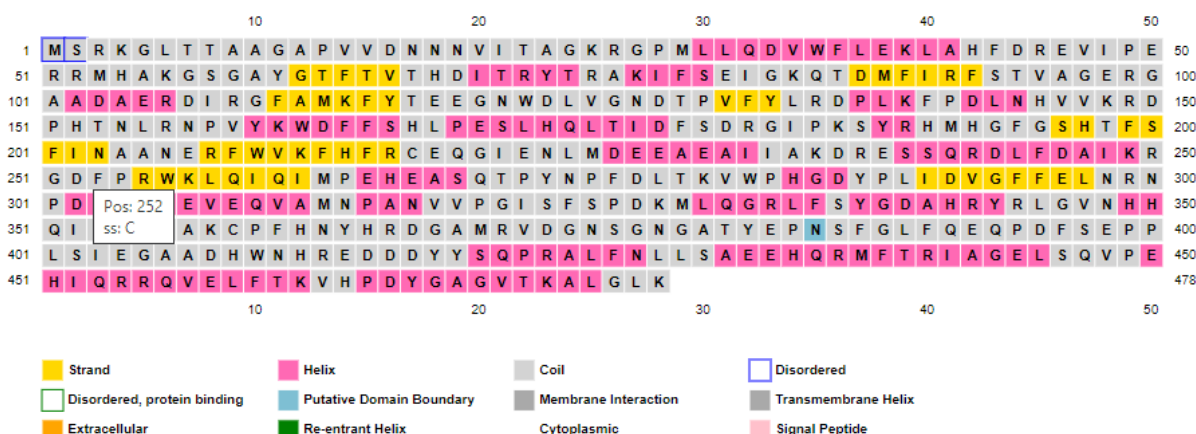
Fonte: Expsy

Figura 5- Polaridade dos aminoácidos que compõe á catalase



Fonte: PSIPRED.

Figura 6- Predição de estruturas secundária da catalase



Fonte: PSIPRED.

A ferramenta NetNGlyc 1.0 Server previu que a proteína em questão não tem N-glicosilação nem peptídeo sinal, enquanto que a ferramenta NetOGlyc 4.0 Server previu que a proteína tem dois possíveis sítios de O-glicosilação .

Figura 7- Resultados da predição de modificações pós-traducionais (N-glicosilação e peptídeo sinal)



Fonte: NetNGlyc 1.0 Server

Figura 8- Resultados da predição de modificações pós-traducionais da catalase (O-glicosilação)

```
##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13
##date 21-4-5
##Type Protein
#seqname      source  feature  start  end    score  strand  frame  comment
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  2      2      0.318689  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  7      7      0.606195  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  8      8      0.511418  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  22     22     0.166864  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  58     58     0.137936  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  63     63     0.0195966 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  65     65     0.0286292 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  67     67     0.224395  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  71     71     0.0774856 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  74     74     0.187536  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  80     80     0.0377158 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  86     86     0.0071491 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  93     93     0.298023  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  94     94     0.182947  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  117    117    0.023685  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  129    129    0.00268189 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  153    153    0.0619624 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  166    166    0.081726  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  171    171    0.0290046 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  176    176    0.0344486 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  180    180    0.067246  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  187    187    0.0168785 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  196    196    0.0251408 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  198    198    0.0222185 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  200    200    0.0125423 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  239    239    0.119647  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  240    240    0.315857  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  269    269    0.228616  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  271    271    0.149515  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  279    279    0.0760304 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  306    306    0.0442191 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  323    323    0.132774  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  325    325    0.105279  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  336    336    0.077788  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  376    376    0.315668  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  381    381    0.39701  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  386    386    0.174113  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  397    397    0.154504  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  402    402    0.163758  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  420    420    0.0390399 .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  430    430    0.04372  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  439    439    0.200258  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  446    446    0.10623  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  461    461    0.340032  .      .      .      .
ANG60484_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  472    472    0.133168  .      .      .      .
```

Fonte: NetOGlyc 4.0 Server

4.2 AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO *KAT* A PARTIR DO VETOR RECOMBINANTE pPIC9K_*Kat*

Para a amplificação do fragmento *Kat* foi utilizado como molde o vetor recombinante pPIC9K_*Kat* sintetizado pela empresa GenScript®, e para isso foi realizada uma PCR seguindo o protocolo de MULLIS et al. (1992) com adaptações. A reação foi constituída dos seguintes componentes: 1µL de DNA molde (12 ng) (vetor pPIC9K_*Kat*) representado na Figura 9A; 1µL dos primers forward e reverse (0,5 µM) (a sequência dos primers com os sítios de restrição *Eco*RI e *Not*I pode ser vista na Tabela 2); 5 µL de tampão de reação (1X); 1µL de dNTPs (0,2mM); 2,5 µL de MgCl₂ (1,25 mM); 0,25 µL de enzima Taq DNA polimerase (1U) (Thermo Fisher Scientific) e 37,25 µL de água destilada totalizando um volume de 50 µL. As

condições da PCR foram: 1 ciclo de 95°C por 3 minutos (desnaturação inicial); 34 ciclos de 98°C por 1 minuto (desnaturação), 1 minuto a 55°C (anelamento), 1 minuto e 30 segundos a 72°C (extensão) e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos (extensão final).

A análise de fragmentos amplificados foi realizada em eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado na concentração de 1% (p/v) de agarose em tampão de corrida TAE 1X, com brometo de etídio na concentração final de 0,4 µg/mL.

Tabela 2 – Sequência dos primers forward e reverse do fragmento *kat*

Primers	Sequência	Nº de bases
Primer forward	GTTAACGAATTC CCAGA AAG GGTTTGACTACTGC	35
Primer reverse	AAGCAT GCGGCCGC CTTCAAACCCAAAGCC	30

Obs: A cor vermelha representa o sítio de restrição para a enzima *EcoRI* e a cor Azul representa o sítio de restrição da enzima *NotI*. **Negrito:** regiões de anelamento no *Kat*.

Fonte: autoria própria

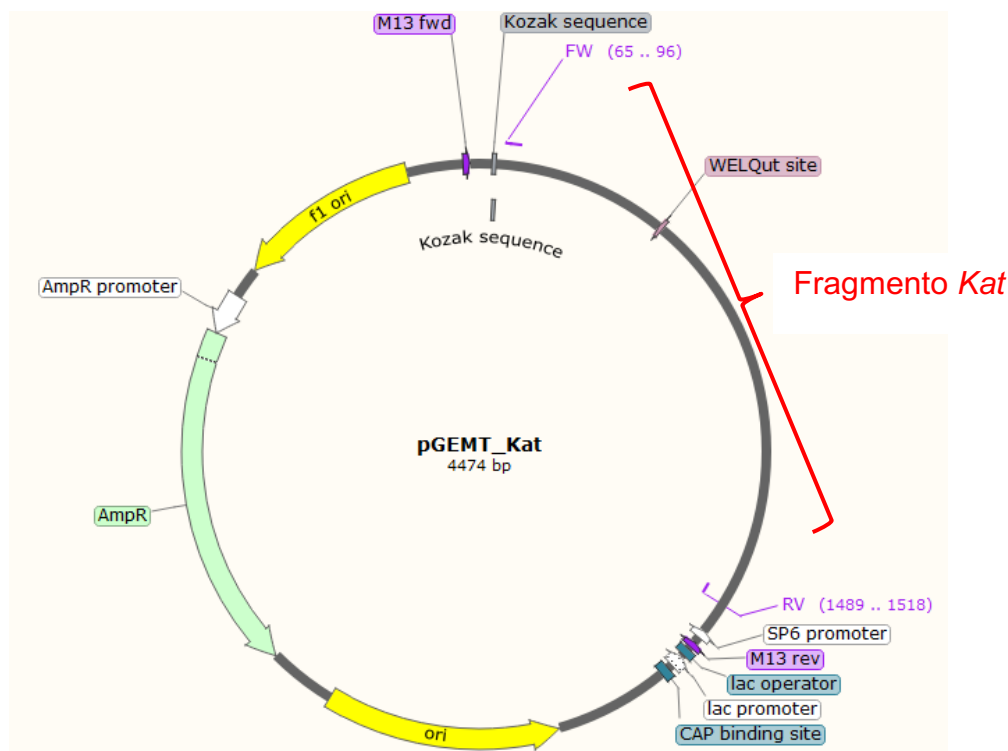
4.3 CLONAGEM DO FRAGMENTO *KAT* NO VETOR DE PROPAGAÇÃO pGEM-T Easy

O produto da amplificação por PCR foi purificado com o kit de purificação Agarose Gel Extraction kit (Cellco), seguindo as indicações do fabricante. Posteriormente, o fragmento *kat* purificado foi utilizado para a clonagem no vetor de propagação pGEM-T Easy. As reações de ligação foram feitas com uma proporção molar de aproximadamente 1:3 (vetor/inserto) seguindo o protocolo da PROMEGA™. A reação de ligação foi constituída dos seguintes componentes: 1 µL do fragmento *kat* (120 ng); 1 µL do pGEM-T Easy (50 ng) (Figura 9); 5µL buffer de reação (1X), 1 µL da enzima T4 DNA ligase (1U) (*Thermo Fisher Scientific*) e 2 µL destilada totalizando um volume de 10 µL. A reação foi incubada por um período de 16 horas a 4°C.

A reação de ligação foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5-α de acordo com SAMBROOK et al., (1989). As bactérias foram selecionadas em meio LB ágar contendo 20 µL de ampicilina (100 ug/µL), 40 µL X-gal (5-bromo-4-cloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) (20 mg/mL) e 50 µL de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (0,4 mM). As colônias positivas foram

utilizadas para a extração do plasmídeo recombinante pGEM-T_ *kat* de acordo com o protocolo do kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (250) (QIAGEN).

Figura 9- Representação esquemática da construção molecular pGEM-T_ *Kat* (4474 pb). Em destaque o fragmento *Kat*.



Fonte: SnapGene®

4.4 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pPICZ α A_ *Kat*

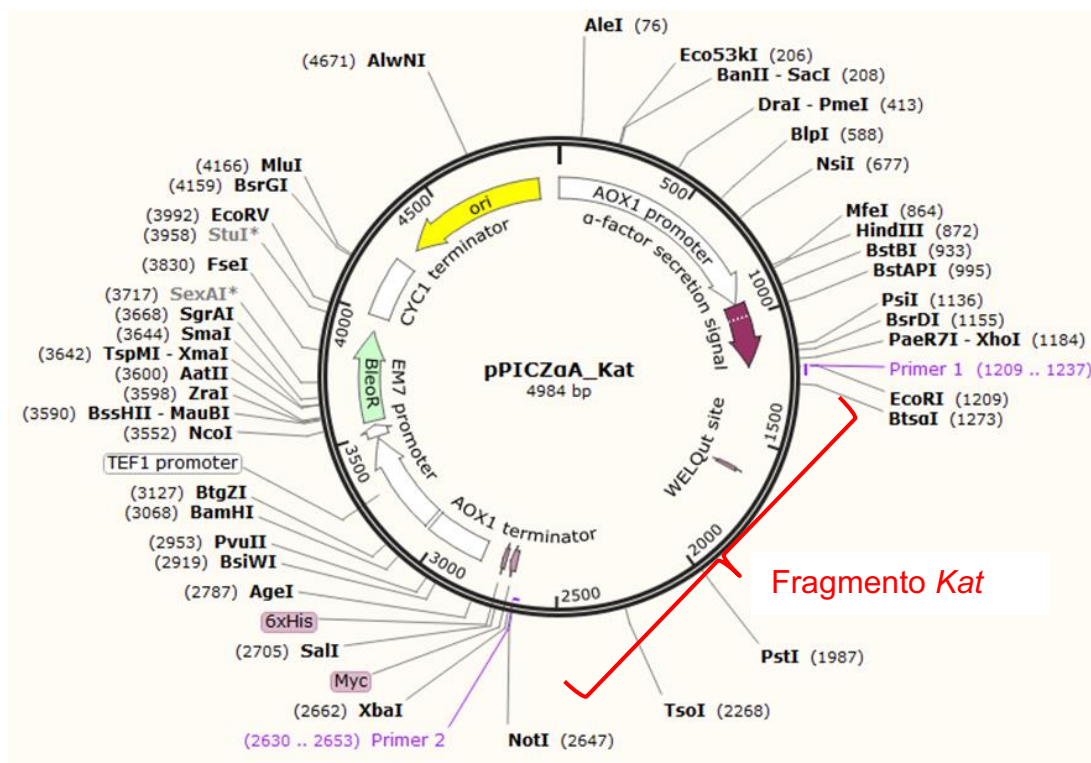
Para a montagem do vetor de expressão contendo o fragmento *kat* (pPICZ α A_ *Kat*), o plasmídeo recombinante pGEM-T_ *kat* foi digerido com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Not*I (Fermentas™) para a liberação do fragmento *Kat*. A reação de clivagem foi constituída dos seguintes componentes: 15 μ L do pGEM-T_ *Kat* (300 ng); 1 μ L *Eco*RI (10 unidades); 1 μ L *Not*I (10 unidades); 5 μ L tampão da reação (1X) e 28 μ L de água destilada totalizando um volume de 50 μ L. O vetor pPICZ α A (Invitrogen) também foi previamente digerido com as mesmas enzimas e sob as mesmas condições, com o objetivo de gerar extremidades coesivas facilitando a ligação vetor-inserto. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). O fragmento correspondente (*Kat*) e o vetor pPICZ α A foram purificados com o kit de purificação mencionado em tópicos anteriores.

Por outro lado, o sistema de ligação foi montado adicionando 10 μL do inserto (300 ng); 5 μL do vetor (120 ng); 1 μL da enzima T4 DNA ligase (1U) (*Thermo Fisher Scientific*), 2 μL do tampão da reação (1X) e 2 μL de água destilada totalizando um volume de 20 μL . A reação foi incubada por um período de 16 horas a 4°C. Esse sistema de ligação foi utilizado na transformação de células competentes de *E. coli* DH5- α de acordo com SAMBROOK et al. (1989). As colônias transformantes foram selecionadas em meio “LB low salt” (20 mL) (Acumedia®) com adição de 5 μL (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de Zeocina™ (Invitrogen).

Para a análise das colônias transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZ α A_*Kat*, 10 clones recombinantes foram selecionados e submetidos à PCR de colônia (as condições foram as mesmas descritas no tópico 4.2 utilizando como molde as colônias transformantes da construção pPICZ α A_*Kat* que foram as possíveis colônias positivas). As colônias que apresentaram um resultado positivo na PCR foram inoculadas em 5 mL de meio “LB low salt” contendo 1,25 μL (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de Zeocina™ (Invitrogen™). O inóculo foi utilizado para a extração do vetor recombinante (pPICZ α A_*Kat*) (Figura 10A). Por último, o perfil de digestão do plasmídeo com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

Figura 10A- Representação esquemática da construção molecular pPICZ α _Kat (4984pb). B. Em destaque os sítios de inserção do fragmento Kat.

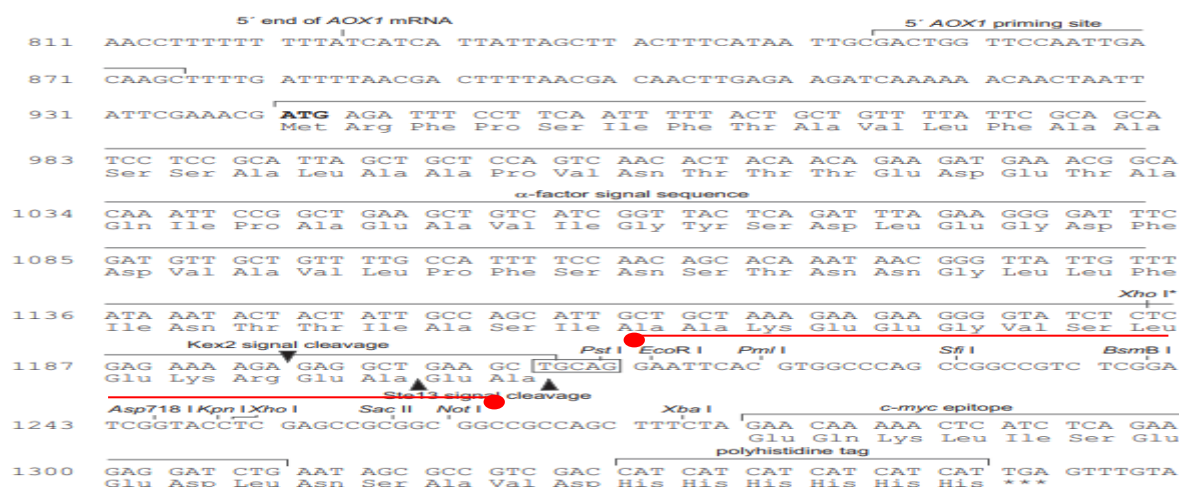
A.



Fonte: SnapGene®.

Representação esquemática da construção molecular pPICZ α _Kat utilizada para a expressão da catalase. AOX1: promotor AOX1 induzível por metanol; α -factor: fator α de secreção; (Zeocin): gene de resistência ao antibiótico zeocina; (6XHis) tag: etiqueta de poli-histidina. Em destaque a região de múltipla clonagem do vetor pPICZ α e o local de inserção do fragmento Kat nos sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *Not I*

B.



Fonte: Invitrogen™.

4.5 EXPRESSÃO DA CATALASE NO SISTEMA *Pichia pastoris*

A expressão da catalase em células de *P. pastoris* foi realizada de acordo ao manual “*Pichia EasySelect* “ (Invitrogen) e o protocolo do Cregg et al., 2007 com algumas modificações. Para a transformação da construção pPICZ α A_*Kat* em células de *P.pastoris* são requeridas algumas etapas prévias fundamentais tais como a linearização, e precipitação do vetor de expressão e preparação de células competentes de *P. pastoris*. Essas etapas foram descritas nos itens a seguir.

4.5.1 Linearização e precipitação do vetor de expressão pPICZ α A_*Kat*

O vetor de expressão pPICZ α A_*Kat* foi linearizado com a enzima de restrição *SacI* (Invitrogen™). Os componentes da reação foram os seguintes: 25 μ L do pPICZ α A_*Kat* (120 ng/ μ L); 1 μ L de *SacI* (10U); 5 μ L do tampão da reação (1X) e 19 μ L de água autoclavada, totalizando 50 μ L da reação. O sistema foi incubado a 37°C durante 16 horas. A linearização foi confirmada mediante a análise de eletroforese em gel de agarose 1%(p/v), colocando como controle 1 μ L do pPICZ α A_*Kat* no linearizado.

O vetor pPICZ α A_*Kat* linearizado foi precipitado com acetato de sódio 3M pH 5,2 1/10 do volume total (49 μ L de material genético + 4,9 μ L de acetato de sódio). Posteriormente foi adicionado etanol absoluto gelado 2,5 vezes o volume total (134,75 μ L). O sistema foi incubado durante 20 minutos no freezer (-80°C), logo, foi centrifugado a 13000 rpm durante 20 minutos, seguido de uma lavagem com 500 μ L de etanol 70%; após, o sistema foi centrifugado a 13000 rpm durante 3 minutos, o etanol foi descartado e o sistema foi secado a temperatura ambiente. Por ultimo, o plasmídeo foi ressuscitado em 10 μ L de H₂O nuclease free.

4.5.2 Preparação de células competentes de *P. pastoris* KM71H e X-33

As células de *P. pastoris* KM71H e X-33 foram plaqueadas em meio YPD ágar a 30°C durante 24 horas, para recuperação. Após esse período, uma colônia isolada de cada placa foi pré-inoculada em 5 mL de meio YPD líquido em erlenmeyer de 125 mL e incubadas a 30°C durante 8 horas sob agitação de 250 rpm. Após este período, 20 μ L do pré-inóculo foram adicionados a 50 mL de meio

YPD e incubados a 30°C sob agitação de 250 rpm em overnight até atingir uma D.O₆₀₀ entre 1,2 - 1,5. O inóculo foi colocado no gelo durante 10 minutos, após, foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em uma solução contendo 10 mL de YPD líquido e 2 mL de HEPES 1M, pH 7. Depois, foram adicionados 250 µL de DTT 1M e incubado por 15 minutos, sem agitação, a 30 °C. Foi acrescentada água destilada gelada até totalizar um volume de 50 mL, posteriormente, a amostra foi centrifugada sob as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado; o pellet foi ressuscitado em 25 mL de água gelada e depois, centrifugado e descartado o sobrenadante. Posteriormente, o pellet foi ressuscitado em 2 mL de sorbitol 1M gelado, centrifugado, e o sobrenadante descartado e, após, ressuscitado em 100 µL de sorbitol 1M gelado (CREGG, 2007). As células competentes foram utilizadas imediatamente na transformação.

4.5.3 Transformação da construção pPICZαA_Kat em células de *P. pastoris*

A transformação da construção pPICZαA_Kat em células de *P.pastoris* foi realizada por eletroporação. A transformação foi realizada com as células de *P.pastoris* KM71H e X-33. O plasmídeo de expressão pPICZαA_Kat previamente linearizado e precipitado foi transferido a 40 µL de células de *P. pastoris* competentes em uma cubeta de eletroporação (BioRad). Seguindo-se uma incubação em gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram submetidas à eletroporação a 1,5 kV, 25 µF, 200Ω. Posteriormente foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado na cubeta para a ressuspensão das células, e esse volume foi transferido para um tubo falcon de 15 mL e foi incubado a 30° C por 2 horas sob agitação de 200 rpm.

4.5.4 Seleção de clones positivos para a transformação da construção pPICZαA_Kat em células de *P.pastoris*

Para a seleção de clones positivos foram plaqueados 100 µL, 150 µL e 200 µL de células de *P. pastoris* transformadas respectivamente em placas com meio YPDS (YPD contendo sorbitol) (extrato de levedura - 2g; peptona - 4g; sorbitol -

36,44 g; ágar - 4g; 180 mL de água destilada; 4g de dextrose em 20 mL de água destilada) e diferentes concentrações de Zeocina (100, 250 e 500 µg/µL).

4.5.5 Ensaio de expressão em pequena escala da catalase recombinante em células de *P.pastoris*

Para a expressão em pequena escala foi selecionada a placa que continha maior número de colônias recombinantes. As colônias foram inoculadas em uma placa com 24 poços contendo em cada poço 3 mL de meio BMGY (63 mL de base composta de extrato de levedura 1% e peptona 2%; 9 mL de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, 1 M; 9 mL de YNB 13,4%; 9 mL de glicerol 10%; 180 µL de biotina 0,02%) e 100 µg/mL de Zeocina™. A placa foi incubada no agitador (Incubador Shaker Series – New Brunswick Scientific) durante 48 horas, 30°C sob agitação de 250 rpm. O meio BMGY foi utilizado para induzir o crescimento celular.

Após esse período, a placa foi centrifugada a 1500 g por 10 min e o sobrenadante de cada poço foi descartado. Logo, cada poço foi acrescentado com 2 mL de meio BMMY (48 mL de base composta de extrato de levedura 1 % e peptona 2%; 6 mL de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, 1,0 M; 6 mL de YNB 13,4%; 300 µL de metanol absoluto filtrado; 120 µL de biotina 0,02%) e 15 µL de Zeocina™ (100 mg/mL). O meio BMMY é utilizado para induzir a expressão de proteína, devido a presença de metanol (agente indutor da expressão). Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 200 µL da amostra (amostra nomeada como não induzida). Logo, acrescentou-se 13,5 µL de metanol absoluto, para dar início à indução. A placa de 24 poços foi colocada no agitador a 250 rpm, 30°C. Cada 24 horas totalizando um período de 144 horas de indução, foram retiradas alíquotas de 200 µL do sobrenadante, e foi acrescentado metanol absoluto, numa concentração final de 0,75% para *P.pastoris* KM71H e 1% para *P.pastoris* X-33.

4.5.6 Análise de expressão da proteína recombinante em *P. pastoris*

As alíquotas retiradas cada 24 horas foram analisadas em SDS-PAGE, baseado no método descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados géis de 15% em tampão Tris-HCl 2 M pH 8,8 contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (p/v). Os géis com 1 mm de espessura foram montados em cuba vertical de eletroforese

modelo Mini-Protean (Bio-Rad). Como marcador de peso molecular foi utilizado o Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (10-250 kDa) (Bio-Rad). A separação foi conduzida sob voltagem constante (140 V) por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Os géis foram corados com Comassie Blue R-250 e descorados com solução descorante (8% de etanol, 8% de ácido acético e água).

4.6 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-28a_*Kat*

Para a construção do vetor pET-28a_*Kat*, o plasmídeo recombinante pGEMT_*kat* foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (Fermentas™) para a liberação do fragmento *Kat*. A reação de clivagem foi constituída dos seguintes componentes: 15 µL do pGEM-T_*Kat* (300 ng); 1µL *EcoRI* (10 unidades); 1µL *NotI* (10 unidades); 5 µL tampão da reação (1X) e 28µL de água destilada totalizando um volume de 50 µL. O vetor pET-28a (Novagen) também foi previamente digerido com as mesmas enzimas e sob as mesmas condições, com o objetivo de gerar extremidades coesivas facilitando a ligação vetor-inserto. Os componentes da reação de digestão foram os seguintes: 25 µL de pET-28a (80ng); 1µL *EcoRI* (10U); 1µL *NotI* (10U); 5 µL tampão da reação (1X) e 18 µL água destilada totalizando um volume de 50 µL. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). O fragmento correspondente (*Kat*) e o vetor pET-28a foram purificados com o kit de purificação mencionado em tópicos anteriores.

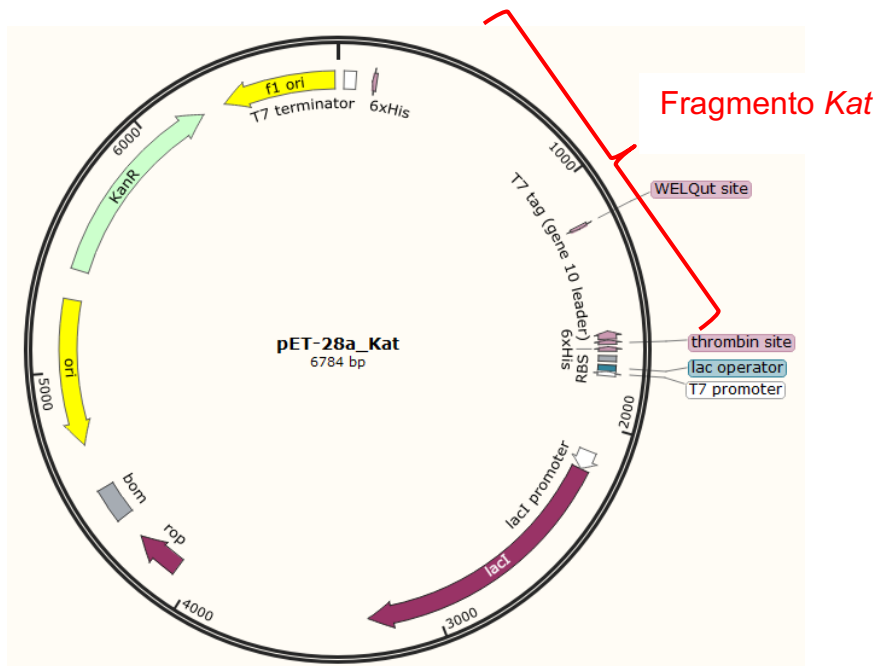
A reação de ligação foi montado adicionando 1 µL do inserto (150 ng); 2µL do vetor (40 ng); 1 µL da enzima T4 DNA ligase (1U) (*Thermo Fisher Scientific*), 1 µL do tampão da reação (1X) e 5 µL de água destilada totalizando um volume de 10 µL. A reação foi incubada por um período de 16 horas a 4°C. Esse sistema de ligação foi utilizado na transformação de células competentes de *E. coli* DH5-α de acordo com SAMBROOK et al. (1989). As colônias transformantes foram selecionadas em meio LB ágar (20 mL) com adição de 20 µL de Canamicina (25 µg/mL).

Para a análise das colônias transformadas com o plasmídeo recombinante pET-28a_*Kat*, 10 clones recombinantes foram selecionados e submetidos à PCR de colônia (as condições foram as mesmas descritas no tópico 4.2 utilizando como molde as colônias transformantes eram as possíveis colônias positivas). Dentre as colônias que apresentaram um resultado positivo na PCR, uma colônia foi inoculada

em 5 mL de meio LB líquido contendo 5 µL de Canamicina (25 mg/mL). O inoculo foi utilizado para a extração de DNA plasmidial do vetor recombinante (pET-28a_Kat) (Figura 11A). Por último, foi confirmado a presença do inserto no vetor fazendo uma análise de restrição do plasmídeo com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*, como visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

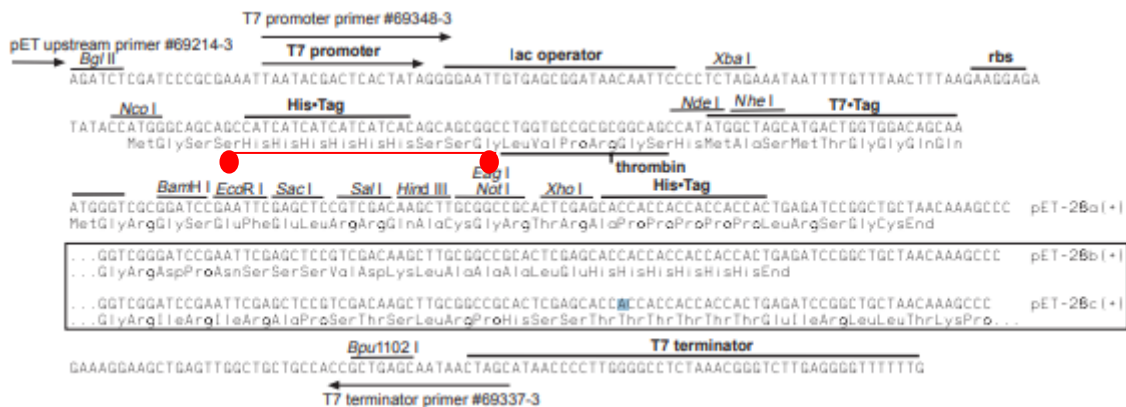
Figura 11 A. Representação esquemática da construção molecular pET-28a_Kat (6784pb). B. Em destaque os sítios de inserção do fragmento Kat.

A.



Fonte: SnapGene®.

B.



Fonte: Novagen.

Em destaque a região de múltipla clonagem do vetor pET-28a e o local de inserção do fragmento Kat nos sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *NotI*.

4.7 ENSAIO DA EXPRESSÃO DA CATALASE NO SISTEMA *E. coli*

O plasmídeo recombinante pET-28a_*Kat* construído previamente foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3) pelo método de transformação quimicompetente por choque térmico. A preparação das células competentes de *E. coli* (Rosetta) foi feita pela inoculação de uma colônia das células *E. coli* Rosetta (DE3) em um pré-inóculo de 5 mL de meio LB líquido. Esse pré-inóculo foi transferido para 30 mL de meio LB líquido contendo 30 µL de cloranfenicol (25mg/mL).

A cultura foi incubada a 37 °C, sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 2 horas até atingir a D.O₅₄₀₋₆₀₀ entre 0,4-0,6; posteriormente, a cultura foi colocada no gelo e, logo, centrifugada a 4000 rpm, durante 7 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado cuidadosamente em 10,5 mL de CaCl₂ 0,1M. A cultura foi deixada no gelo durante 20 minutos e logo centrifugada a 3500 rpm, durante 7 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado cuidadosamente em 2,4 mL de CaCl₂ 0,1M e 600 µL de glicerol 50%.

A transformação de células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3) foi feita da seguinte maneira: 1µL da construção pET-28a_*Kat* foi adicionado em 200 µL de células competentes. O sistema contendo as células mais o plasmídeo recombinante foi submetido a uma temperatura de 42 °C durante 1 minuto e 30 segundos e, imediatamente após, foi colocado no gelo. As células transformadas foram plaqueadas em 20 mL de meio LB ágar, contendo 20 µL de canamicina (25 mg/mL) e 20 µL cloranfenicol (25 mg/mL) . A placa foi incubada a 37°C, overnight.

A partir das colônias transformadas com a construção pET-28a_*Kat* feito um pré-inóculo com uma colônia em 7,5 mL de meio LB, contendo os antibióticos 7,5 µL de canamicina e 7,5 µL de cloranfenicol (ambos na concentração de 25 mg/mL). O pré-inóculo foi incubado a 37 °C, durante o período de 16 horas aproximadamente.

Posteriormente, o pré-inóculo foi diluído em uma proporção 1:100 (5 mL de pré-inóculo foram adicionados em 500 mL de meio LB líquido). A cultura foi incubada em um incubador (*Incubador Shaker Series – New Brunswick Scientific*), sob agitação de 200 rpm a 37 °C, durante 1 hora 40 minutos aproximadamente até atingir a D.O₆₀₀ entre 0,4-0,6. Foi retirada uma alíquota da cultura (denominada amostra sem indução). Posteriormente, foi acrescentado à cultura 1 mL de IPTG

(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) para ficar numa concentração final de 0,4 mM. A cultura posteriormente foi incubada em shaker sob agitação de 200 rpm a 37 °C.

A indução da proteína catalase em células de *E.coli* foi realizada a 37°C, sob 200 rpm de agitação no shaker. Para conhecer o perfil de expressão foram retiradas alíquotas de 1mL em intervalos consecutivos de 1, 2, 3, 4, 5 e 16 horas de indução.

As alíquotas previamente retiradas foram centrifugadas a 10000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, os pellets de cada uma das alíquotas coletadas foram ressuspensos em aproximadamente 60 μ L de água autoclavada e acrescentou-se 40 μ L do tampão Laemmli. As amostras foram fervidas durante 15 minutos e analisadas em SDS-PAGE 12% e coradas com Comassie Blue R-250 (LAEMMLI, 1970). De acordo com esse análise a proteína foi expressa a partir da primeira hora de indução com IPTG.

Com base nesse primeiro ensaio de expressão foi feita uma nova indução com volume de 1 L de cultura a 37°C, sob 200 rpm de agitação, durante o período de três horas durante 3 horas. Após 3 horas de indução a cultura foi centrifugada a 7000 rpm durante 10 minutos, a 4°C; logo, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 50 mL de tampão de lise contendo 50 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM Tris HCl e 100 mM de NaCl, pH 8,0. Esse material, depois de ressuspendido foi submetido ao teste de solubilidade.

4.7.1 Ensaio de solubilidade e purificação da catalase expressa em *E.coli*

A cultura ressuspendida previamente em 50 mL de tampão de lise, foi sonicada no Sonic Dismembrator 500 (Fisher Scientific) em ciclos de 6 minutos (pulsos de 60 segundos com intervalos de pausa de 30 segundos) com o fim de romper a células de *E.coli*. Após, a cultura foi centrifugada a 7000 rpm durante 30 minutos, a 4 °C. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado num sistema a vácuo contendo uma membrana de PVDF de 0,44 μ m para posterior purificação.

A purificação da proteína foi feita utilizando o sobrenadante do lisado celular de *E.coli* previamente filtrado. Esta foi realizada por cromatografia de afinidade em uma coluna contendo íons de níquel ligados à resina de agarose – Ni-NTA (Qiagen). A coluna de níquel foi montada com um volume de 3 ml da resina agarose – Ni-NTA. Para iniciar a purificação a coluna de níquel foi lavada com 3 ml de tampão de lise

(NaH_2PO_4 50 mM, Tris HCl, 10 mM e NaCl 100 mM). Foram realizadas três lavagens com esse tampão para equilibrar a coluna. Em seguida o sobrenadante foi passado na coluna para que as proteínas da *E.coli* possam sair e a proteína catalase se ligue a resina de níquel. Posteriormente foi realizada uma nova lavagem com a passagem de duas frações de tampão de lise para que todas as outras proteínas das células possam sair no eluato. Após as lavagens foi iniciada a fase de eluição da proteína recombinante com a passagem de 3 ml de tampão de lise contendo imidazol em concentrações crescentes (10 mM; 25 mM; 50 mM; 75 mM; 100 mM; 250 mM; 500 mM; 750 mM) (duas soluções de cada concentração) e três frações de tampão de lise contendo 1 M de imidazol.

Para a análise da purificação da proteína foram coletadas aliquotas de cada fração da proteína eluída. Assim foram coletados de 40 μL de cada amostra e foram adicionados 20 μL de tampão Laemmli, enquanto para a análise da solubilidade, uma quantidade mínima de precipitado produto da lise celular foi ressuspensa em 60 μL de água e, posteriormente, adicionou-se 40 μL de tampão Laemmli, imediatamente 20 μL do sobrenadante foi aliqotado em um tubo de 1,5 mL e adicionou-se 10 μL de tampão Laemmli. Todas as amostras foram fervidas por 15 minutos e foram analisadas em SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970).

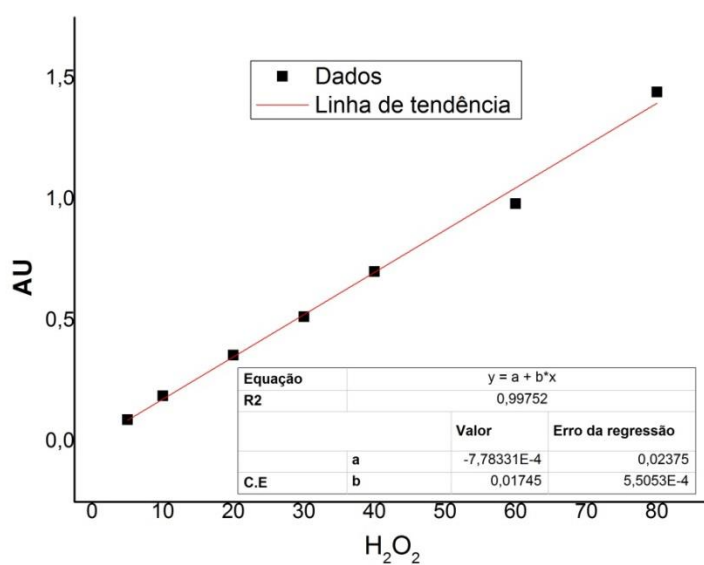
Após a purificação a proteína foi dialisada em tampão PBS 1X (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 1,8 mM; pH 7,4) para retirar o excesso de imidazol, em seguida foi quantificada como o Pierce BCA Protein Assay kit-ThermoFisher e com o nanoDropTM 2000 Spectrophotometers.

4.8 ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da catalase foi avaliada por espectrofotometria a uma absorbância de 240 nm de acordo com a metodologia do BEERS E SIZER, (1952); com modificações. As leituras das absorbâncias foram feitas num SpectraMax[®] Paradigm[®] Microplate Detection Platform. Para os ensaios realizados neste estudo, primeiro, foi depositado 1nM de enzima em três poços de uma microplaca de Elisa, seguido pela adição rápida de tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM (pH 7; contendo 30 mM H_2O_2), em cada poço. A diminuição da absorbância em 240 nm foi monitorada a cada 5 s durante um período de 60 s.

Para calcular o coeficiente de extinção do peróxido de hidrogênio (ϵ) foram feitas leituras das absorbâncias a 240 nm de diferentes concentrações do peróxido de hidrogênio (5 mM a 80 mM) e logo foi feita uma curva de calibração ($R^2=0,997$) (Figura 12).

Figura 12-Curva de calibração do peróxido de hidrogênio



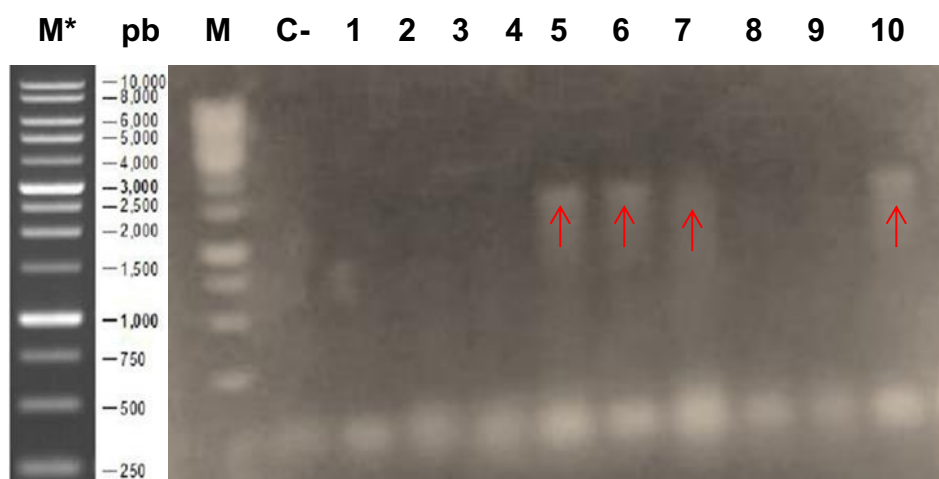
Fonte: autoria própria

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pPICZ α A_Kat

Das colônias de *E. coli* DH5 α selecionadas com Zeocina, 10 foram submetidas à PCR para confirmação dos clones recombinantes e obteve-se ao todo quatro clones recombinantes com amplificação positiva. Desses 4 clones foram selecionados 2 clones (5 e 10) para a extração do DNA plasmidial que foi utilizado para posteriores etapas. Na Figura a seguir, pode ser visto o resultado da reação de amplificação das colônias. Pode-se observar 4 colônias com amplificação positiva, com presença da banda de tamanho esperado de 1451 pb. (Figura 13).

Figura 13- PCR de colônias resultantes da transformação de células de *E. coli* DH5- α com a construção pPICZ α A_Kat

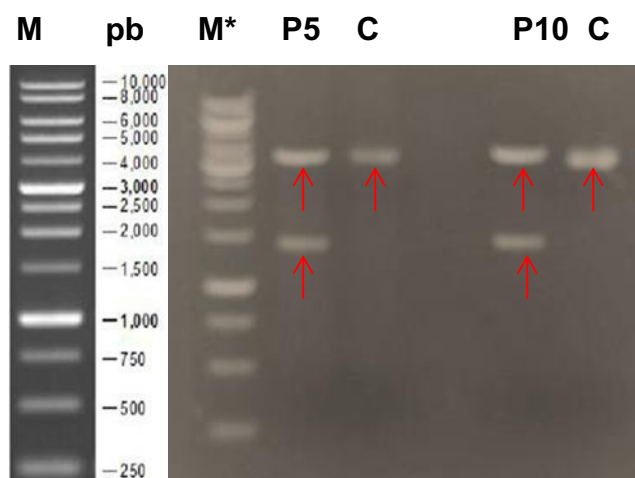


M* e **M**: marcador de peso molecular (1kb). **pb**: pares de bases; **C-**: controle negativo (reação sem DNA template); **1,2,3,4,8,9** colônias negativas; **5,6,7** e **10** colônias positivas para pPICZ α A_Kat de acordo com as bandas de amplificação no tamanho de aproximadamente 1451 pb. Em destaque as bandas correspondentes ao fragmento *Kat*.

Fonte: autoria própria

Para mais uma confirmação da construção do vetor recombinante pPICZ α A_Kat, o resultado da extração plasmidial dos clones 5 e 10 foi submetida a uma reação de clivagem com as enzimas *EcoRI* e *NotI* (Figura 14).

Figura 14- Digestão do DNA plasmidial pPICZ α A_Kat dos clones 5 e 10 com as enzimas *Eco*RI e *Not*I



M* e **M**: marcador de peso molecular (1kb). **pb**: pares de bases; **P5** e **P10**: plasmídeo dos clones 5 e 10 digerido com as enzimas *Eco*RI e *Not*I; **C**: controle (pPICZ α A sem digerir). Em destaque as bandas correspondentes ao vetor pPICZ α A (3593 bp), o fragmento *Kat* (1451 pb).

Fonte: autoria própria

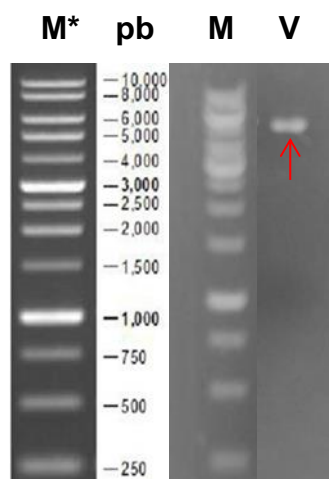
5.1.2 Transformação em células de *P. pastoris*

O vetor de expressão pPICZ α A_Kat linearizado e precipitado previamente como descrito em itens anteriores, foi utilizado para transformar células competentes de *P.pastoris* KM71H e *P. pastoris* X-33. Na Figura a seguir pode ser visto a confirmação da clivagem do vetor de expressão com a enzima de restrição *Sac*I. Observa-se uma banda correspondente ao tamanho esperado de aproximadamente 5044 pb. (Figura 15).

P. pastoris tem a propensão de realizar recombinação homóloga entre DNAs introduzidos artificialmente (vetores) e genômicos, assim, as células de *P. pastoris* foram transformadas via integração cromossômica (CEREGHINO & CREGG, 2000; CREGG et al., 2000).

Para a estabilidade genética ideal, a clivagem de um vetor de *P. pastoris* dentro de uma sequência compartilhada pelo genoma do hospedeiro estimula eventos de recombinação homóloga que dirigem a integração do vetor num locus genômico específico, deste modo o vetor pPICZ α A_Kat foi clivado no gene AOX1 o que levou ao direcionamento do plasmídeo para o locus cromossômico AOX1 (CEREGHINO & CREGG, 2000; CREGG et al., 2000; GONÇALVES et al., 2013).

Figura 15- Linearização do vetor de expressão pPICZ α A_Kat com a enzima de restrição SacI



M* e **M**: marcador de peso molecular (1kb). **pb**: pares de bases; **V**: vetor pPICZ α A_Kat clivado com as enzimas SacI. Em destaque as bandas do vetor pPICZ α A_kat clivado (5044 pb). Em destaque a banda correspondente ao vetor de expressão pPICZ α A_Kat linearizado.

Fonte: autoria própria

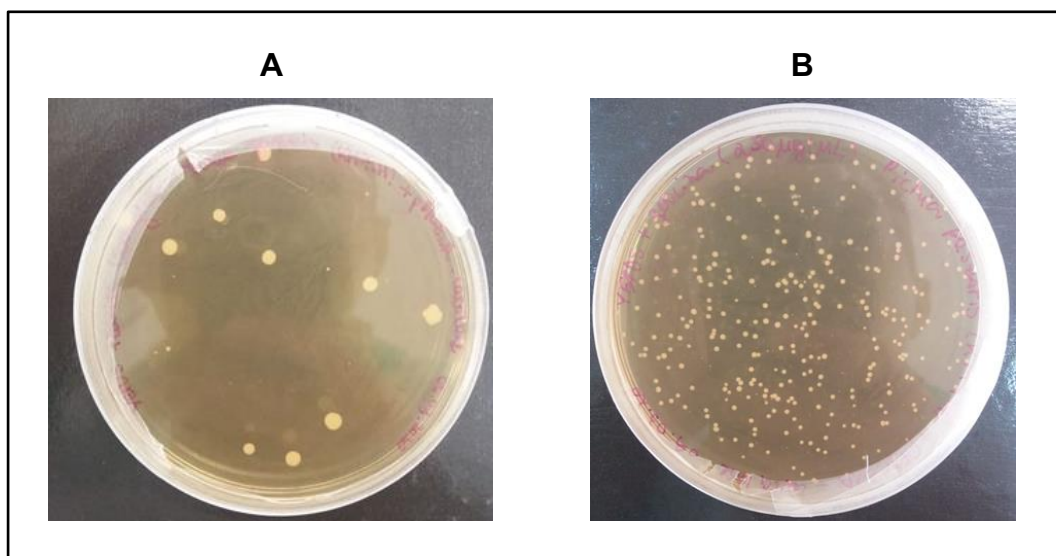
5.1.3 Seleção de clones positivos de *Pichia pastoris* KM71H e X-33 em placas com YPDS contendo Zeocina

Para a seleção dos clones positivos, as células transformadas de *P. pastoris* KM71H e X-33 foram plaqueadas em três placas com YPDS contendo Zeocina em diferentes concentrações (100, 250 e 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), assim, as placa com maior número de colônias positivas foram utilizadas para selecionar 100 clones, a fim de induzir a expressão heteróloga da catalase com metanol. Na fotografia 16 e 17 podem-se observar as placas contendo clones positivos tanto de *P. pastoris* KM71H como de *P. pastoris* X-33 selecionados com zeocina.

A estratégia mais aplicada para rastrear transformantes de *P. pastoris* de alto rendimento concentra-se na triagem de clones com integrações multicópia do cassete de expressão (AHMAD et al., 2014). Portanto, o marcador de antibiótico, como o gene de resistência à zeocina possibilita a triagem de clones com múltiplos eventos de integração após a transformação em placas contendo concentrações crescentes de antibióticos (por exemplo, 100 a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Zeocina). Deste

modo, é selecionada a placa que tem maior concentração de antibiótico (ZHU et al., 2019).

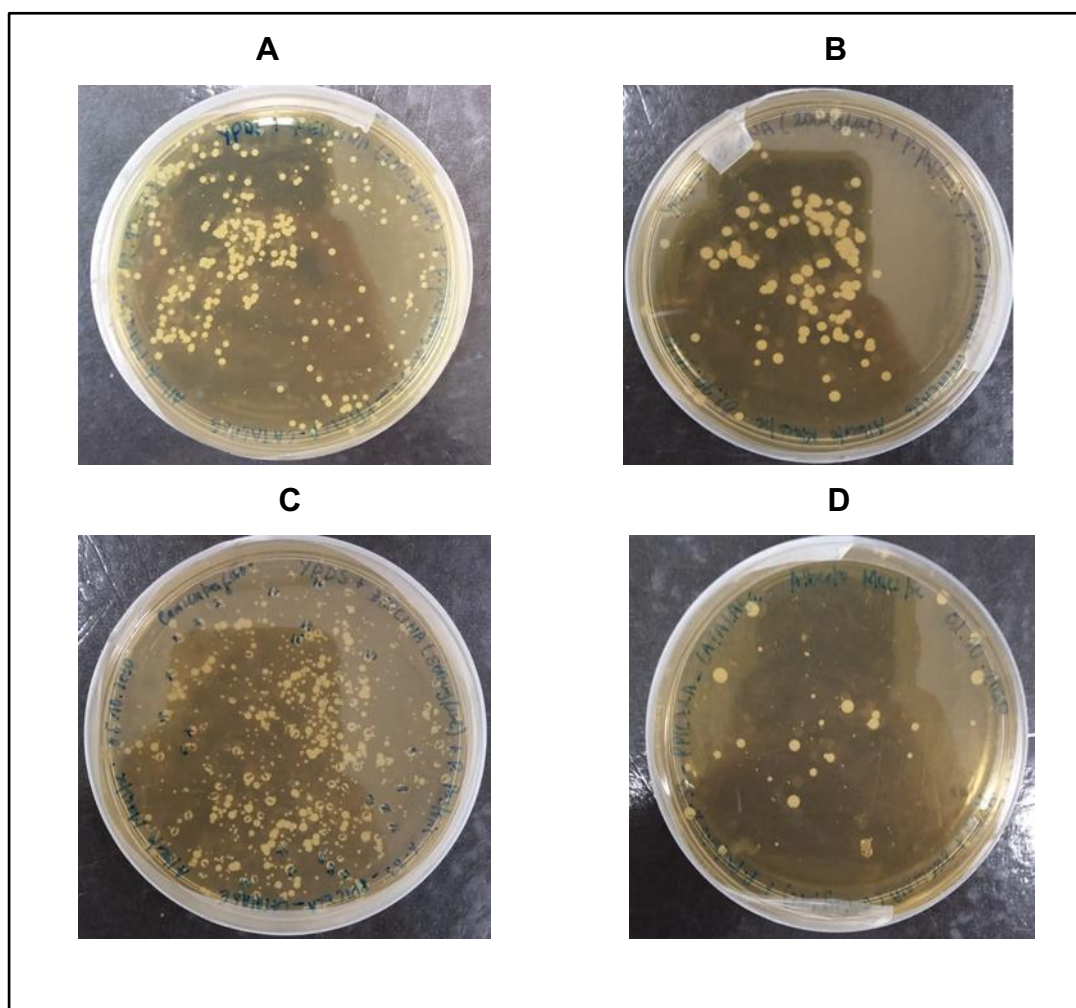
Figura 16-Seleção de clones positivos de *P. pastoris* KM71H em placas com YPDS contendo Zeocina



Placas de YPDS com Zeocina. Placa **A** (20 mL de YPDS + 500 µg/mL de zeocina + 200 uL de células de *P. pastoris* KM71 transformadas), placa **B** (20 mL de YPDS + 250 µg/mL de zeocina + 150 µL de células de *P. pastoris* KM71 transformadas). Ambas placas foram incubadas a 30 °C durante 72 horas. Para a indução da expressão com o metanol foram selecionados 100 clones transformantes da placa que teve maior número de clones (placa **B**).

Fonte: autoria própria

Figura 17- Seleção de clones positivos de *P. pastoris* X-33 em placas com YPDS contendo Zeocina



Placas de YPDS com Zeocina. Placa **A** (20 mL de YPDS + 100 µg/µL de zeocina + 100 µL de células de *P. pastoris* X-33 transformadas), placa **B** (20 mL de YPDS + 250 µg/µL de zeocina + 150 µL de células de *P. pastoris* X-33 transformadas), placa **C** (20 mL de YPDS + 500 µg/µL de zeocina + 200 µL de células de *P. pastoris* X-33 transformadas), placa **D** (20 mL de YPDS + 500 µg/µL de zeocina + 200 µL de células de *P. pastoris* X-33 transformadas concentradas). Todos os clones foram preservados a 4°C em placas contendo 20 mL de YPD+100 µg/µL de zeocina.

Fonte: autoria própria

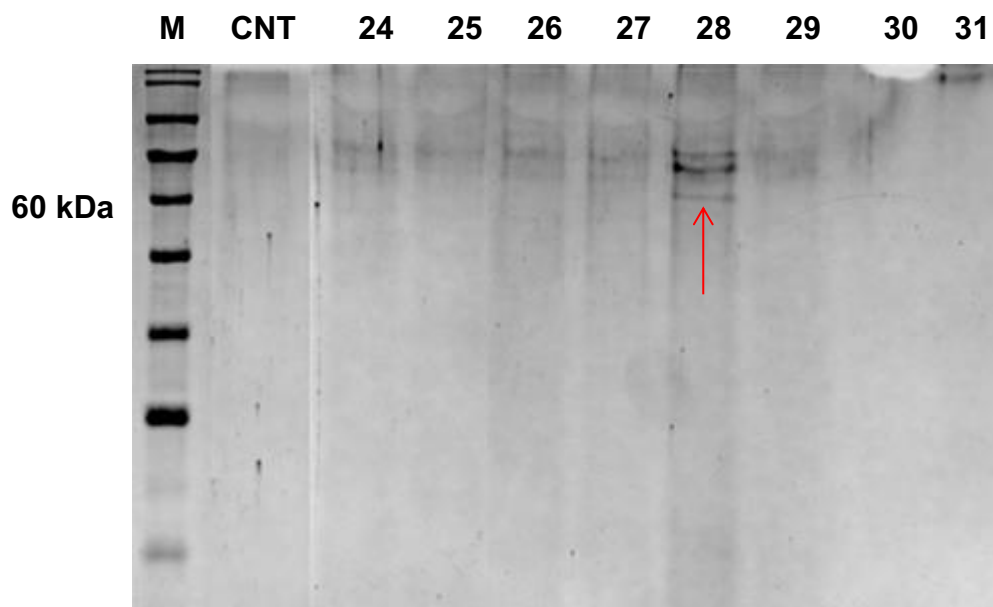
5.1.4 Análise da expressão da catalase em células de *P. pastoris* em pequena escala

Dos 200 clones positivos (100 de *P. pastoris* KM71H e 100 de *P. pastoris* X-33), ao todo foram induzidos 161 clones com metanol em meio BMMY em pequena escala. O vetor de expressão pPICZαA possui uma região correspondente ao peptídeo sinal fator α que promove a secreção da proteína heteróloga para o meio

externo (RESINA et al., 2004; LU et al., 2013; RANJAN & SATYANARAYANA, 2016; ADIVITIYA et al., 2019; KATLA et al., 2019). Assim, foram retiradas alíquotas (200 μ L) do sobrenadante (meio BMMY) para a análise da expressão da catalase em SDS-PAGE 12%. As amostras analisadas foram retiradas em intervalos subsequentes de 24 horas de indução (24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas).

Dos clones positivos de *P. pastoris* KM71H, um dos clones analisados (clone 28) mostrou uma expressão evidente em 72 horas de indução com metanol 0,75% (Figura 18). Igualmente um dos clones positivos analisados de *P. pastoris* X-33; o clone 42 mostrou uma expressão evidente em 72 e 96 horas de indução com metanol 1% (Figura 19 e 20). Isso foi possível verificá-lo no gel SDS-PAGE 12% de acordo com (LAEMMLI, 1970), bandas correspondentes a aproximadamente 58 kDa como esperado para essa proteína; isso foi coincidente com as análises feitas previamente por Jia et al., (2017) onde essa mesma catalase purificada foi analisada por SDS-PAGE e mostrou uma banda na altura evidenciada neste trabalho.

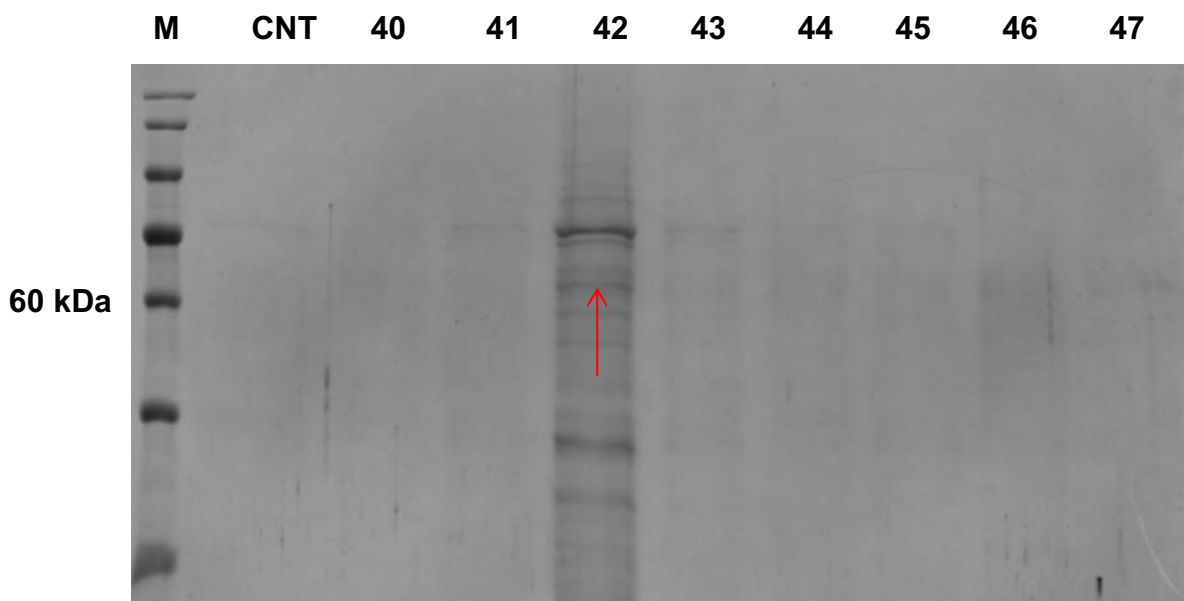
Figura 18- Análise expressão da catalase em pequena escala em *P.pastoris* KM71H (72 horas de indução com metanol)



Gel de poliácridamida SDS-PAGE 12%. **M:** Marcador de peso molecular (10-180 kDa), **CNT:** clone não transformado **24,25,26,27,28,29,30,31:** clones induzidos com metanol 0,75% durante 72 horas. O clone **28** apresentou uma banda correspondente á catalase alcalina (~58 kDa). Banda em destaque com a seta.

Fonte: autoria própria

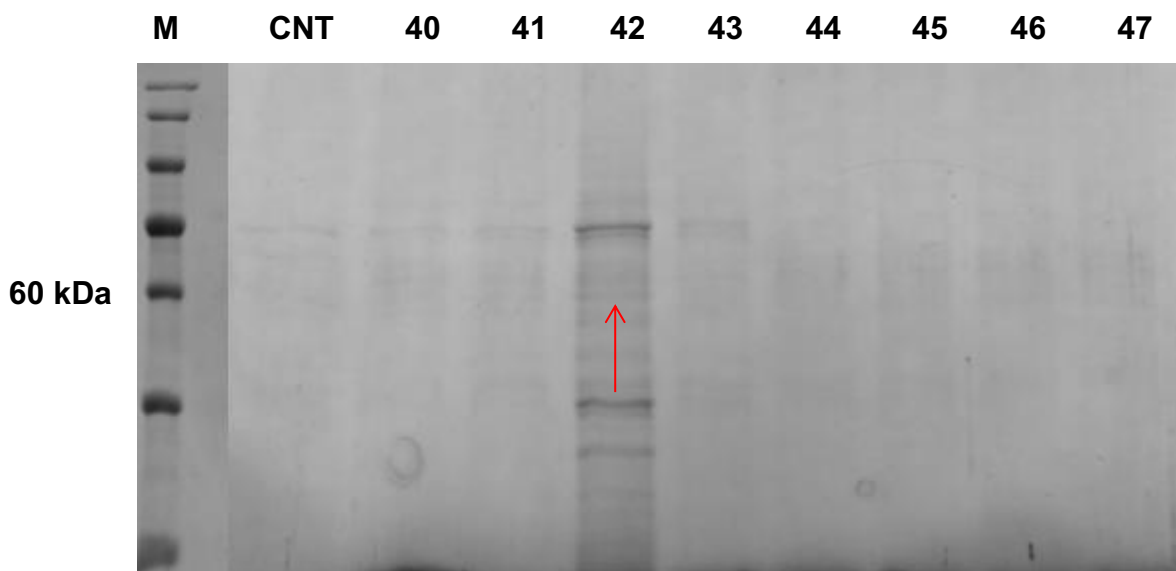
Figura 19- Análise expressão da catalase em pequena escala em *P.pastoris* X-33 (72 horas de indução com metanol)



Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. **M:** Marcador de peso molecular (10-180 kDa), **CNT:** clone não transformado **40,41,42,43,44,45,46 e 47:** clones induzidos com metanol 1% durante 72 horas. O clone **42** apresentou uma banda correspondente á catalase (~58 kDa). Banda em destaque com a seta.

Fonte: autoria própria

Figura 20- Análise expressão da catalase em pequena escala em *P.pastoris* X-33 (96 horas de indução com metanol)



Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. **M:** Marcador de peso molecular (10-180 kDa), **CNT:** clone não transformado **40,41,42,43,44,45,46 e 47:** clones induzidos com metanol 1% durante 96 horas. O clone **42** apresentou uma banda correspondente á catalase alcalina (~58 kDa). Banda em destaque com a seta.

Fonte: autoria própria

A catalase alcalina da linhagem bacteriana *S. marcescens* FZSF01 foi previamente produzida por processos fermentativos e expressa em *E. coli* por Jia et al., 2017, porém foi majoritariamente expressa como corpo de inclusão, isso sugere que mais pesquisas seriam necessárias para otimizar a expressão nesse sistema ou determinar um melhor sistema de expressão para essa proteína, no entanto, os resultados obtidos com a *P. pastoris* em pequena escala mostraram que este pode ser um sistema promissor para expressar a catalase.

A ausência de expressão em maior escala pode estar relacionada com eventos de contaminação de alguns clones e com a alteração do metabolismo do microrganismo devido a mudanças nas condições de crescimento. Desse modo, as condições de crescimento devem ser monitoradas com maior cuidado futuramente quando a escala do processo for aumentada.

Estudos atuais têm relatado a expressão bem sucedida de enzimas de interesse industrial utilizando *P. pastoris* como sistema hospedeiro de expressão. Por exemplo, RANJAN & SATYANARAYANA no ano 2016 expressaram uma fitase fúngica extracelularmente em altos títulos (480 ± 23 U/mL), da mesma forma, YADAV et al., 2018 expressaram extracelularmente uma lacase bacteriana em altos títulos (500 ± 10 U/L). Por outro lado, Özçelik et al., 2019 expressaram pro-transglutaminase microbiana (pro-MTGase) atingindo altos títulos quando foi produzida a larga escala (37640 U/L), igualmente ZHANG et al., 2020 expressaram a peroxidase de manganês (MnP) fúngica com uma atividade de 154,5 U/L, essa enzima foi promissora na descoloração de uma grande variedade de corantes e teve a capacidade de degradar efetivamente o fluoreno e o fenantreno. Esses resultados demonstraram que a enzima recombinante tinha potencial promissor na indústria têxtil e na biorremediação de hidrocarboneto aromático policíclico (HAPs). Todas estas pesquisas revelam a eficiência e versatilidade de *P. pastoris* como sistema expressão de enzimas de interesse industrial provenientes de distintas fontes.

Existem vantagens muito interessantes de *P. pastoris* sobre outros sistemas de expressão, uma das mais significativas é a secreção de proteína no meio, pois direcionar uma proteína heteróloga para o meio simplifica significativamente o processo de purificação (YANG & ZHANG, 2018).

Existem muitos vetores de expressão de *P. pastoris* que codificam para um peptídeo sinal de secreção, como por exemplo, o peptídeo “pré-pró” do fator α de *S.*

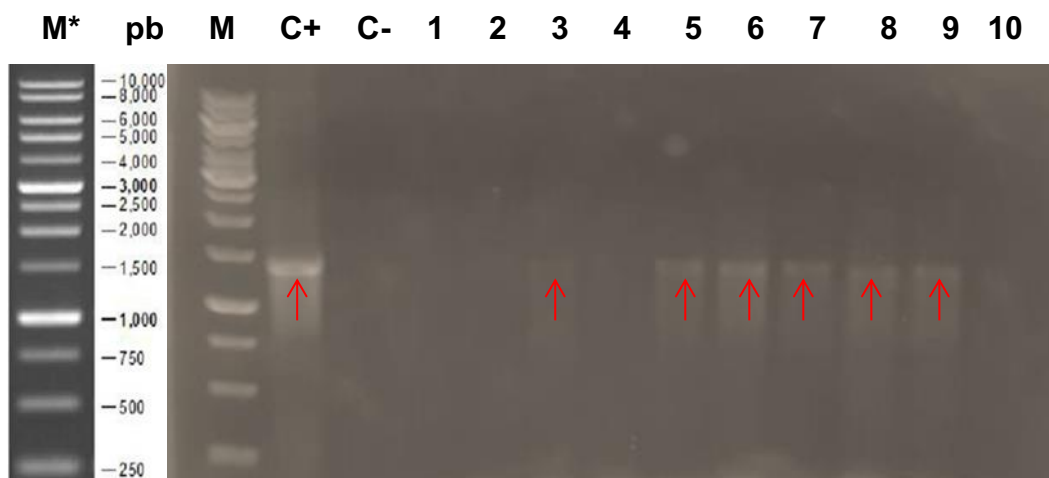
cerevisiae, o sinal de fosfatase ácida de *P. pastoris* (PHO1), entre outros; sendo o peptídeo do fator α de *S. cerevisiae* um dos mais amplamente usados com sucesso (YANG & ZHANG, 2018). Nesta pesquisa foi utilizado o vetor de expressão pPICZ α A que contém o peptídeo “pré-pró” do fator α de *S. cerevisiae*.

A sequência do fator α é processada principalmente pelas proteinases codificadas pelos genes KEX2 e STE13, assim, a região pré é removida pela peptidase sinalizadora no retículo endoplasmático, logo a endopeptidase KEX2 cliva entre Arg-Lys da sequência líder pró e finalmente a enzima STE13 cliva as repetições Glu-Ala (CEREGHINO & CREGG, 2000).

5.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-28a_*Kat*

Das colônias de *E. coli* DH5 α selecionadas com Canamicina, 10 foram submetidas à PCR para confirmação dos clones recombinantes e obteve-se ao todo seis clones recombinantes com amplificação positiva. Desses 6 clones, 2 clones foram selecionados (clones 5 e 6) para a extração do DNA plasmidial que foi utilizado para posteriores etapas. Na fotografia a seguir, pode ser visto o resultado da reação de amplificação das colônias. Pode-se observar 6 colônias com amplificação positiva, com presença da banda de tamanho esperado de 1451 pb (Figura 21).

Figura 21- PCR de colônias resultantes da transformação de células de *E. coli* DH5- α com a construção pET-28a_Kat

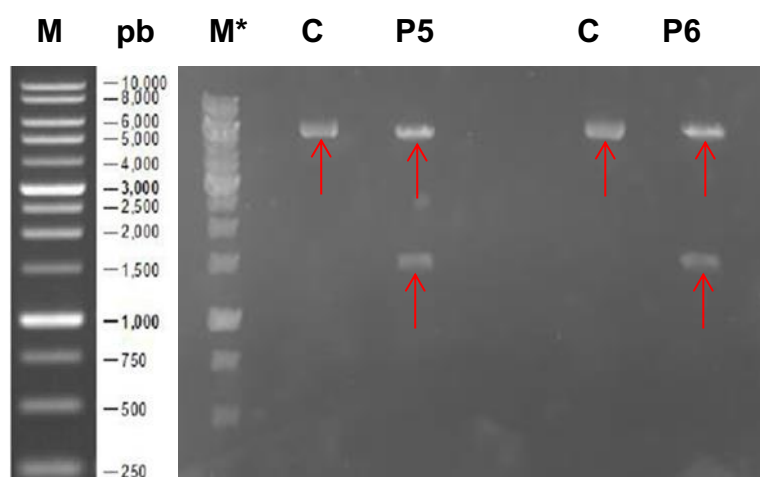


M* e **M**: marcador de peso molecular (1kb). **pb**: pares de bases; **C+**: controle positivo (fragmento *Kat* amplificado a partir de pPIC9K_Kat); **C-**: controle negativo (reação sem DNA template); **1,2,4 e 10** colônias negativas; **3,5,6,7,8 e 9** colônias positivas para pET-28a_Kat de acordo com as bandas de amplificação no tamanho de aproximadamente 1451 pb. Em destaque as bandas correspondentes ao fragmento *Kat*.

Fonte: autoria própria

Para mais uma confirmação da construção do vetor recombinante pET-28a_Kat, o resultado da extração plasmidial dos clones 5 e 6 foram submetidos a uma reação de clivagem com as enzimas *EcoRI* e *NotI* (Figura 22).

Figura 22- Digestão do DNA plasmidial pET-28a_Kat dos clones 5 e 6 com as enzimas *EcoRI* e *NotI*



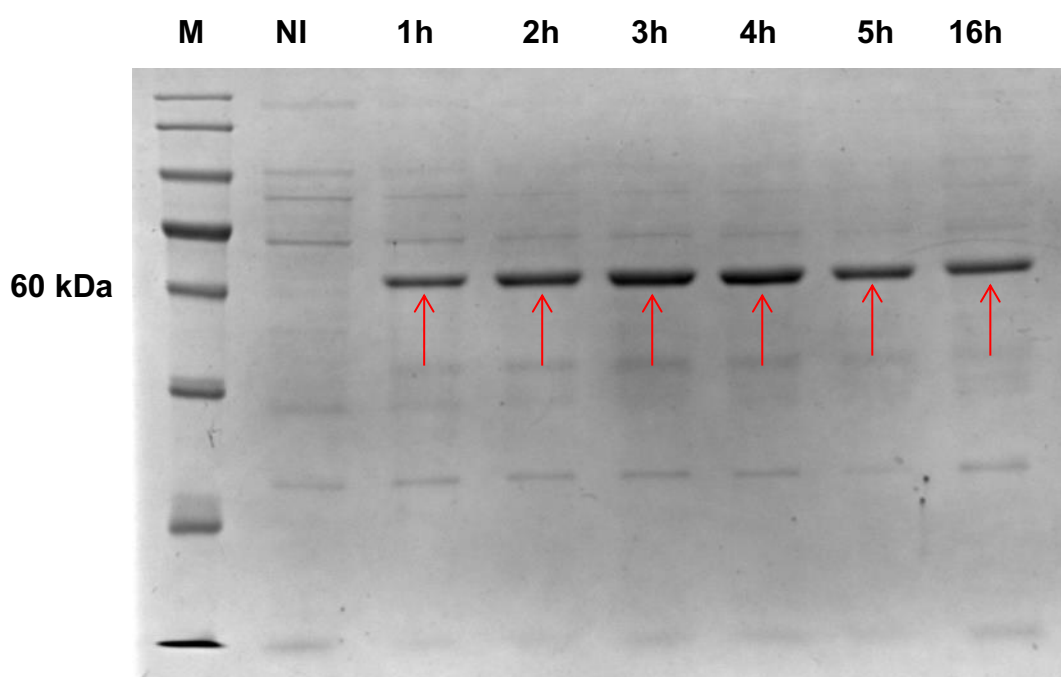
M* e **M**: marcador de peso molecular (1kb). **pb**: pares de bases; **C**: controle (vetor pET-28a sem digerir); **P5 e P6**: plasmídeo dos clones 5 e 6 digerido com as enzimas *EcoRI* e *NotI*. Em destaque as bandas correspondentes ao vetor pET-28a (5369 bp), o fragmento *Kat* (1451 pb).

Fonte: autoria própria

5.2.1 Expressão da catalase em células de *E. coli*

Foi realizada uma análise em SDS-PAGE 12% das cinco primeiras horas de indução e da amostra depois de 16 horas (final da indução). (Figura 23). A partir da primeira hora de indução observou-se bandas de expressão de tamanho esperado de aproximadamente 58 kDa, sendo o tempo ideal de indução de expressão de 3 horas.

Figura 23- Análise expressão da catalase em *E. coli* (Rosetta) a 37°C



Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Análise da expressão da catalase em *E. coli* (Rosetta) a 37 °C. **M:** marcador de peso molecular; **NI:** amostra não induzida; **1h:** amostra a 1 hora de indução; **2h:** amostra a 2 horas de indução; **3h:** amostra a 3 horas de indução; **4h:** amostra a 4 horas de indução; **5h:** amostra a 5 horas de indução; **16h:** amostra a 16 horas de indução. Podem-se observar bandas correspondentes á catalase (~58 kDa). Bandas em destaque com a seta.

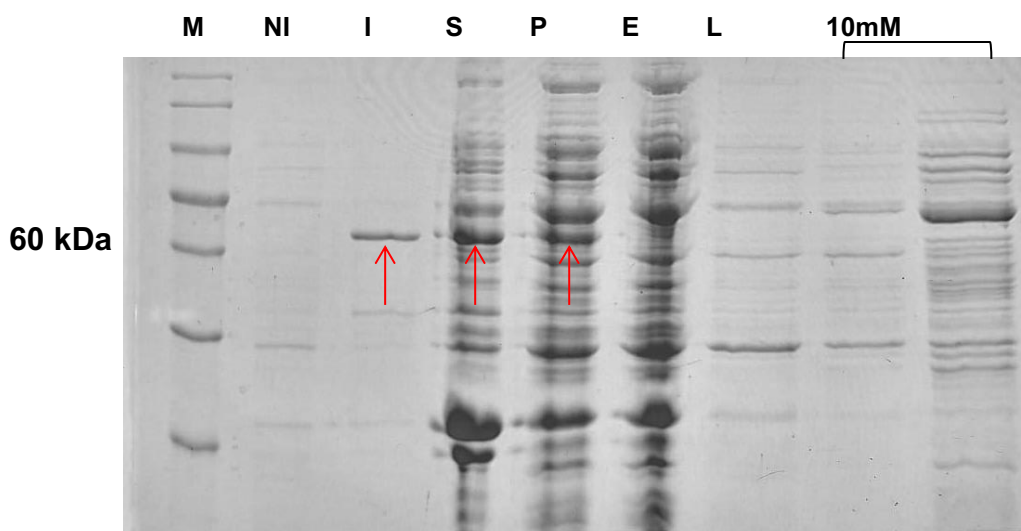
Fonte: autoria própria

5.2.2 Solubilidade e purificação da catalase expressa em *E. coli*

A análise em SDS-PAGE da catalase recombinante revelou que a proteína era parcialmente solúvel (Figura 24A), caso contrário ao trabalho de JIA et al., 2017 onde essa mesma catalase foi majormente insolúvel quando foi produzida em *E. coli* BL21 (DE3) utilizando o vetor de expressão pEASY-E2. Cabe ressaltar que em

alguns casos a linhagem BL21(DE3) de *E. coli* é limitada pela incapacidade de expressar proteínas de membrana, proteínas com muitas ligações de dissulfeto, proteínas com códons raros, entre outras (BANEYX & MUJACIC, 2004; KAUR et al., 2018).

Figura 24A- Análise da purificação e solubilidade da catalase expressa em *E. coli*

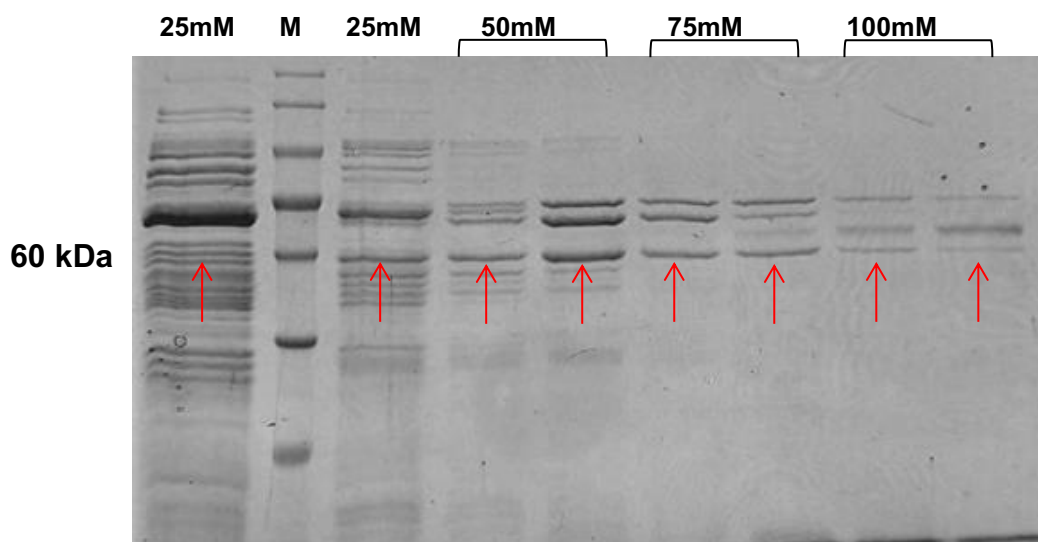


Análise da purificação e teste de solubilidade da catalase em SDS-PAGE 12%. **M:** marcador de peso molecular; **NI:** amostra não induzida; **I:** amostra induzida; **P:** precipitado do lisado total (*pellet*); **S:** sobrenadante do lisado total; **E:** fração correspondente ao sobrenadante do lisado celular que é recolhido (eluato); **L:** fração contendo tampão de lise (lavagem); **10 mM:** eluições da proteína com tampão de lise contendo 10 mM de imidazol. Em destaque com a seta a banda correspondente a catalase (~58kDa).

Fonte: autoria própria

Por outro lado, a análise em SDS-PAGE da purificação da fração solúvel (sobrenadante) mostrou a presença de bandas espessas, com o tamanho esperado de ~58 kDa (Figura 24B e 24C). Dessa forma, foi possível obter a proteína catalase pura num único passo de purificação.

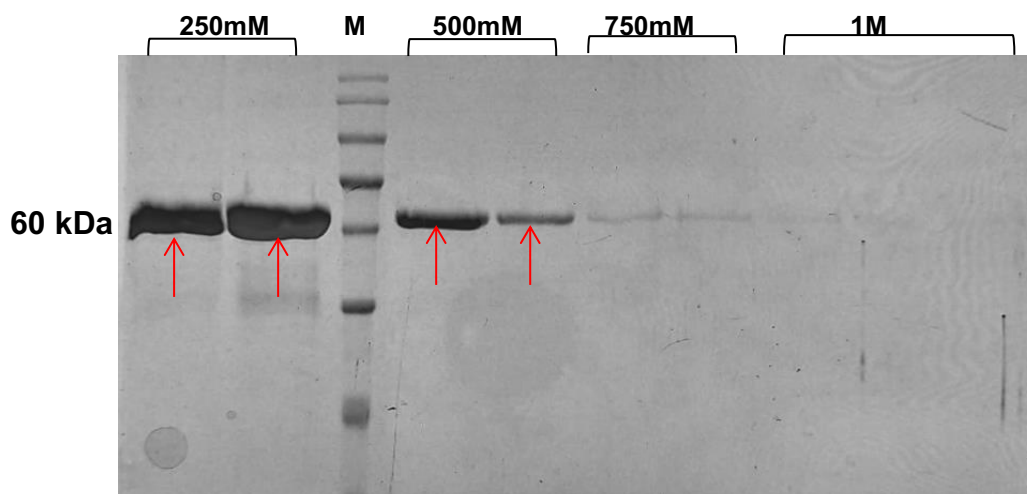
Figura 24B- Análise da purificação da catalase expressa em *E. coli*



Análise da purificação da catalase em SDS-PAGE 12%. **M**: marcador de peso molecular; **25 mM**: eluições da proteína com tampão de lise contendo 25 mM de imidazol; **50 mM**: eluições da proteína com tampão de lise contendo 50 mM de imidazol; **75 mM**: eluições da proteína com tampão de lise contendo 75 mM de imidazol; **100 mM**: eluições da proteína com tampão de lise contendo 100 mM de imidazol. Em destaque com a seta a banda correspondente a catalase (~58kDa)

Fonte: autoria própria

Figura 24C- Análise da purificação da catalase expressa em *E. coli*



Análise da purificação da catalase em SDS-PAGE 12%. **M**: marcador de peso molecular; **250 mM**: eluições da proteína com tampão de lise contendo 250 mM de imidazol; **500 mM**: eluições da proteína com tampão de lise contendo 500 mM de imidazol; **750 mM**: eluições da proteína com tampão de lise contendo 750 mM de imidazol, **1M**: eluições da proteína com tampão de lise contendo 1M de imidazol. É possível visualizar uma banda de ~58kDa, como esperado, correspondente á catalase. Bandas em destaque com a seta.

Fonte: autoria própria

A quantificação da proteína pura indicou um rendimento de 0,51 mg por litro de cultura, considerando-se um rendimento interessante para possíveis aplicações em diferentes setores biotecnológicos e industriais.

Existem muitos fatores pelos quais uma proteína pode formar corpos de inclusão quando é expressa em *E. coli*, como por exemplo, o uso de sistema de promotores fortemente induzidos, a utilização de alta concentração de indutor uma vez que o mecanismo de dobramento é sobrecarregado produto da sobreprodução de proteínas; outro fator importante é a indução em altas temperaturas o que favorece a reação de agregação proteica (BANEYX & MUJACIC, 2004; FATHIROUDSARI et al., 2016; KAUR et al., 2018).

Na pesquisa de JIA et al., 2017 a indução foi feita com uma concentração final 1mM de IPTG, enquanto no nosso trabalho a indução foi feita numa concentração final de 0,4 mM de IPTG, isto pode ser um fator importante que esteja relacionado com a diferencia de solubilidade da proteína recombinante.

Além de alterar a concentração do agente indutor neste trabalho, também foi alterada a linhagem hospedeira e o vetor de expressão; utilizando-se a linhagem *E. coli* Rosetta (DE3) e o vetor de expressão pET-28a. Hoje sabe-se que a linhagem Rosetta (DE3) de *E. coli* é derivada da linhagem BL21 e foi projetada para melhorar a expressão de proteínas heterólogas, além de favorecer a expressão de proteínas que contem códons raros (NOVAGEN). Com respeito ao vetor pET-28a sabe-se que tem um promotor muito forte com alta eficiência de transcrição (promotor T7) que favorece a expressão aumentada de proteínas heterólogas (KIM et al., 2016; KAUR et al., 2018).

Atualmente a linhagem *E. coli* Rosetta (DE3) tem sido amplamente utilizada para expressar uma grande variedade de proteínas de interesse industrial e biotecnológico. Alguns trabalhos recentes tem produzido luciferase solúvel (XUAN et al., 2018), γ -lactamase, a qual é um biocatalisador prometedor para aplicações industriais de produtos químicos farmacêuticos quirais altamente valiosos (GAO et al., 2016), também tem se produzido interferon-tau ovino solúvel (YU et al., 2021), galactose oxidase, amplamente reconhecida pelas suas aplicações na síntese enzimática de aldeídos e carboidratos (FARIA et al., 2019), entre outros.

Evidentemente o sistema *E. coli* Rosetta (DE3) constitui uma alternativa importante para a produção de enzimas de interesse, neste trabalho conseguiu-se

produzir uma catalase bacteriana ativa, o que representa um fator valioso para diferentes setores industriais (SOOCH et al., 2014).

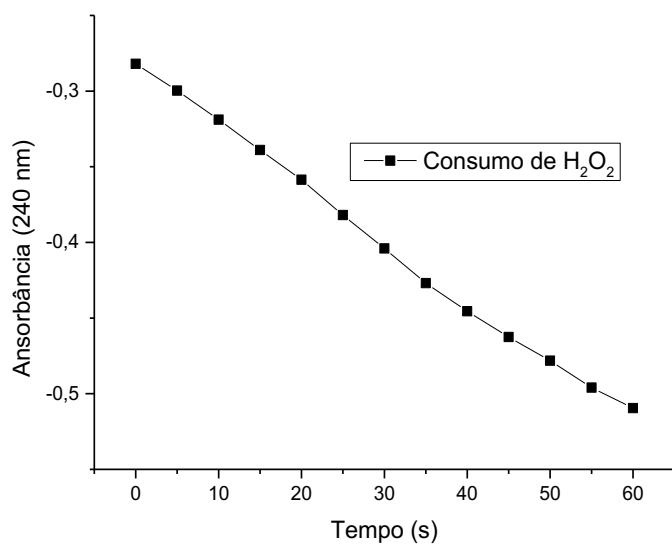
Na literatura estão documentadas varias aplicações da catalase em diferentes setores industriais e biotecnológicos; por exemplo, na industria textil é utilizada como agente para remover o peróxido de hidrogênio de efluentes, reduzindo a carga de poluição; no setor alimentício é utilizada para a remoção de traços de peróxido de hidrogênio usado durante a pasteurização do leite; tem aplicação na area biomedica, biofarmaceutica, no setor odontológico na remoção dos radicais livres pós-clareamento dental, também é utilizada na produção de biosensores para a detecção de peróxido de hidrogênio, fluor e cianeto, entre outras aplicações (VATSYAYAN et al., 2010; SOOCH et al., 2014; CZYZEWSKA e TRUSEK, 2018; KAUSHAL et al., 2018; SEPASI et al., 2018).

5.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os ensaios da atividade enzimática mostraram que a catalase estava ativa. Na Figura 25, a linha de tendência demonstrou que o peróxido de hidrogenio foi degradado pela catalase ao longo de 1 minuto de reação; isso é confirmado na Figura 26 onde observa-se claramente a formação de bolhas produto da decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Os ensaios enzimáticos também revelaram que a catalase tinha um comportamento Michaeliano (Figura 27), como o observado também por JIA et al., (2017); ZENG et al., (2011). Estes ultimos expressaram e caracterizaram uma catalase da linhagem *Serratia marcescens* SYBC08. Também, PHILIBERT et al., (2016) expressaram e caracterizaram uma heme-catalase de *Bacillus pumulis* com comportamento Michaeliano.

Existem algumas catalases derivadas de bactérias que apresentam comportamento de Michaeliano em concentração moderada de H₂O₂; neste trabalho não conseguiu-se observar saturação da enzima quando foram utilizadas concentrações de H₂O₂ superiores a 80 mM, isso pode ser devido à devido à inibição oxidativa causada por uma alta concentração de substrato (PHILBERT et al., 2016; TEHRANI et al., 2018).

Figura 25- Curva de degradação do peróxido de hidrogênio pela catalase em 1 min de reação



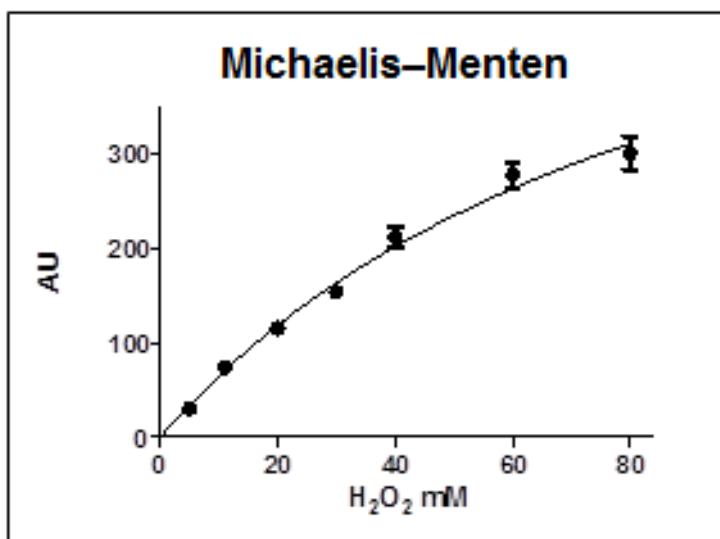
Fonte: autoria própria

Figura 26-Representação gráfica da degradação do peróxido de hidrogênio pela catalase



Fonte: autoria própria

Figura 27- Comportamento Michaeliano da catalase



Fonte: autoria própria

6 CONCLUSÕES

O fragmento *Kat* que codifica para a catalase em questão, foi subclonado com sucesso tanto no vetor de expressão em *P. pastoris* (pPICZαA) como no vetor de expressão em *E. coli* (pET-28a).

A catalase foi expressa em todos os sistemas utilizados nesta pesquisa. A expressão em *P. pastoris* KM71H e X-33 evidenciou-se no ensaio realizado em pequena escala, mostrando uma banda de tamanho esperado de ~58 kDa.

A expressão da catalase em células *E. coli* Rosetta (DE3) observou-se, significativamente nas primeiras 3 horas de indução na concentração de IPTG 0,4 mM. A análise da expressão em SDS-PAGE 12 % mostrou uma expressão proteica notável, com banda de tamanho esperado de ~58 kDa.

A proteína foi expressa parcialmente solúvel, dado que se apresentou tanto na fração insolúvel (precipitado celular), quanto na fração solúvel.

Foi possível realizar a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em resina de níquel em um único passo de purificação com rendimento de 0,51 mg por litro de cultura, o que significa um rendimento interessante para futuras aplicações.

Os ensaios enzimáticos demonstraram que a catalase estava ativa e que apresentava um comportamento Michaeliano, o qual é característico neste tipo de catalase.

Evidentemente o sistema de expressão *E. coli* Rosetta (DE3) representa um sistema de expressão promissor para a produção da catalase em questão.

Para futuras pesquisas sugere-se continuar com os estudos cinéticos, caracterização e a aplicação no setor odontológico como agente neutralizante de radicais livres residuais pós-branqueamento dental. Também se sugere explorar outras possíveis aplicações desta enzima em outras áreas.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.

ANG, R. P. et al. Comparing the expression of human DNA topoisomerase I in KM71H and X33 strains of *Pichia pastoris*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 9–17, 2016.

AVELAR, M. et al. Recombinant expression of a laccase from *Corioloropsis gallica* in *Pichia pastoris* using a modified α -factor preproleader. **Protein Expression and Purification**, v. 136, p. 14–19, 2017.

AZARI, M.; ASAD, S.; MEHRNIA, M. R. Heterologous production of porcine derived antimicrobial peptide PR-39 in *Escherichia coli* using SUMO and intein fusion systems. **Protein Expression and Purification**, v. 169, p. 105568, 2020.

BAGHBAN, R. et al. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 365–384, 2019.

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399–1407, 2004.

BERGQUIST, P. et al. Expression of xylanase enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. **Extremophiles**, v. 6, n. 3, p. 177–184, 2002.

BORGES, P. T. et al. Structure of the monofunctional heme catalase DR1998 from *Deinococcus radiodurans*. **The FEBS journal**, v. 281, n. 18, p. 4138–4150, 2014.

CAYETANO-CRUZ, M. et al. High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in a bioreactor with methanol as the sole carbon source: Purification and biochemical characterization of the enzyme. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 161–169, 2016.

ÇELİK, E.; ÇALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1108–1118, 2012.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 2000.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 2, p. 192–208, 2004.

COCESKA, E. et al. Enamel alteration following tooth bleaching and remineralization. **Journal of Microscopy**, v. 262, n. 3, p. 232–244, 2016.

CORAL MEDINA, J. D. et al. Energetic and economic analysis of ethanol, xylitol and lignin production using oil palm empty fruit bunches from a Brazilian factory. **Journal of Cleaner Production**, v. 195, p. 44–55, 2018.

CREGG, J. M. et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23–52, 2000.

CREGG, J.M. *Pichia* protocols. Totowa, NJ: **Humana Press**; 2007.

CZYZEWSKA, K.; TRUSEK, A. Encapsulated catalase from *Serratia* genus for H₂O₂ decomposition in food applications. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 20, n. 4, p. 39–43, 2018.

DARBY, R. A. et al. Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris*. **Methods in Molecular Biology**, v. 866, p. 11–23, 2012.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009.

DEWI, K. S. et al. Expression of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli* using various induction methods. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 439, n. 1, 2020.

DOOZANDEH-JUIBARI, A. et al. Cloning, Expression, Purification and Evaluation of the Biological Properties of the Recombinant Human Growth Hormone (hGH) in *Escherichia coli*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 487–495, 2020.

FANG, Z. et al. Protein engineering to enhance keratinolytic protease activity and excretion in *Escherichia coli* and its scale-up fermentation for high extracellular yield. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 121, p. 37–44, 2019.

FARIA, C. B. et al. Production of Galactose Oxidase Inside the *Fusarium fujikuroi* Species Complex and Recombinant Expression and Characterization of the Galactose Oxidase GaoA Protein from *Fusarium subglutinans*. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 9, p. 633–649, 2019.

FATHI-ROUDSARI, M.; AKHAVIAN-TEHRANI, A.; MAGHSOUDI, N. Comparison of three *Escherichia coli* strains in recombinant production of reteplase. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 16–22, 2016.

FELIPE AKABANE, S. T. et al. Evaluation of the aesthetic effect, enamel microhardness and trans-amelodentinal cytotoxicity of a new bleaching agent for professional use containing trimetaphosphate and fluoride. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 114, n. September 2020, 2021.

GAO, S. et al. Identification and characterization of a novel (+)- γ -lactamase from *Microbacterium hydrocarbonoxydans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9543–9553, 2016.

GONÇALVES, A. M. et al. *Pichia pastoris*: A recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.

23, n. 5, p. 587–601, 2013.

GOVENDER, K. et al. A novel and more efficient biosynthesis approach for human insulin production in *Escherichia coli*. **AMB Express**, v. 10, n. 1, 2020.

GRAUMANN, K.; PREMSTALLER, A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2, p. 164–186, 2006.

JIA, X. et al. Cloning, Expression, and Characterization of a Novel Thermophilic Monofunctional catalase from *Geobacillus* sp CHB1. **BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL**, 2016.

JIA, X. et al. Enhanced alkaline catalase production by *Serratia marcescens* FZSF01: Enzyme purification, characterization, and recombinant expression. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 110–117, 2017.

JUREMA, A. L. B. et al. Effect of pH on whitening efficacy of 35% hydrogen peroxide and enamel microhardness. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 30, n. 2, p. E39–E44, 2018.

JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. **ChemBioChem**, v. 19, n. 1, p. 7–21, 2018.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, 2018.

KAUSHAL, J. et al. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. October, p. 192–199, 2018.

KIM, J. et al. Strategies for increasing heterologous expression of a thermostable esterase from *Archaeoglobus fulgidus* in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 127, p. 98–104, 2016.

KULKARNI, P. S. et al. Immunogenicity of a new, low-cost recombinant hepatitis B vaccine derived from *Hansenula polymorpha* in adults. **Vaccine**, v. 24, n. 17, p. 3457–3460, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n.5259, p.680-685, 1970.

LÁZARO, B. et al. Heterologous expression of a thermophilic diacylglycerol acyltransferase triggers triglyceride accumulation in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–25, 2017.

LIMA, A. F. et al. Transdermal protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 109, n. 4, p. e70–e76, 2010.

LIU, L. et al. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: Strategies and perspectives. **Bioengineered**, v. 4, n. 4, p. 212–223, 2013.

LU, L. et al. Cloning and expression of thermo-alkali-stable laccase of *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* and its characterization. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 81–86, 2013.

MADZAK, C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 11, p. 4559–4577, 2015.

MCADAMS, H. H.; ARKIN, A. Stochastic mechanisms in gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 3, p. 814–819, 1997.

MCALEER, W. J. et al. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. **Nature**, v. 307, n. 5947, p. 178-180, 1984.

MULLIS, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. 1986 [classical article]. **Biotechnology**, v. 24, p. 17-27, 1992.

NURUL FURQAN, B. R.; AKHMALOKA. Heterologous expression and characterization of thermostable lipase (Lk1) in *Pichia pastoris* GS115. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, n. November 2019, p. 101448, 2020.

PHILIBERT, T. et al. Heterologous expression and characterization of a new heme-catalase in *Bacillus subtilis* 168. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 729-740, 2016.

RANJAN, B.; SATYANARAYANA, T. Recombinant HAP Phytase of the Thermophilic Mold *Sporotrichum thermophile*: Expression of the Codon-Optimized Phytase Gene in *Pichia pastoris* and Applications. **Molecular Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 137–147, 2016.

RESINA, D. et al. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 109, n. 1, p. 103–113, 2004.

RIGOLDI, F. et al. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioengineering**, v. 2, n. 1, p. 011501, 2018.

ROCHA, S. N. et al. Heterologous expression of a thermophilic esterase in *Kluyveromyces* yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 375–385, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMUEL, P. et al. Effect of molecular chaperones on the expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. **Microbiological Research**, v. 168, n. 10, p. 615–620, 2013.

SANCHEZ-GARCIA, L. et al. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2016.

SASAKI, Y. et al. Secretory overexpression of the endoglucanase by *Saccharomyces cerevisiae* via CRISPR- δ -integration and multiple promoter shuffling. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 121, p. 17–22, 2019.

SEPASI TEHRANI, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. Catalase and its mysteries. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 140, p. 5-12, 2018.

SHAEER, A.; ASLAM, M.; RASHID, N. A highly stable manganese catalase from *Geobacillus thermopakistaniensis*: molecular cloning and characterization. **Extremophiles**, v. 23, n. 6, p. 707-718, 2019.

SHARMA, D. S. et al. Effect of Catalase and Sodium Fluoride on Human Enamel bleached with 35% Carbamide Peroxide. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 12–17, 2015.

SIBIRNY, A. A. Biotechnology of yeasts and filamentous fungi. **Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi**, p. 1–412, 2017.

SOARES, D. G. et al. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 8, p. 1901–1909, 2013.

SOARES, D. G. et al. Increased whitening efficacy and reduced cytotoxicity are achieved by the chemical activation of a highly concentrated hydrogen peroxide bleaching gel. **Journal of Applied Oral Science**, v. 27, p. 1–10, 2019.

SOOCH, B. S.; KAULDHAR, B. S.; PURI, M. Recent insights into microbial catalases: Isolation, production and purification. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1429–1447, 2014.

SPOHNER, S. C. et al. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology.

Journal of Biotechnology, v. 222, p. 104–116, 2016.

SUMMPUNN, P. et al. Characterization, gene cloning, and heterologous expression of β -mannanase from a thermophilic *Bacillus subtilis*. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 86–93, 2011.

THAKUR, R. et al. Catalase and sodium fluoride mediated rehabilitation of enamel bleached with 37% hydrogen peroxide. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 33, n. 4, p. 324–330, 2015.

THAPA, S. et al. Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 8, p. 579–601, 2019.

TIAN, Y.-S. et al. Heterologous Extracellular Expression and Initial Characterization of the Peroxisomal Catalase from the Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha* in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 507–513, set. 2013.

TRINDADE, F. Z. et al. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 6, p. 516–524, 2009.

TRUNG, N. T. et al. An auto-inducible phosphate-controlled expression system of *Bacillus licheniformis*. **BMC biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.

TÜRKANOĞLU ÖZÇELİK, A.; ERSÖZ, F.; İNAN, M. Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 159, p. 83–90, 2019.

VATSYAYAN, P.; BORDOLOI, S.; GOSWAMI, P. Large catalase based bioelectrode for biosensor application. **Biophysical Chemistry**, v. 153, n. 1, p. 36–42, 2010.

WAGNER, J. M.; ALPER, H. S. Synthetic biology and molecular genetics in non-

conventional yeasts: Current tools and future advances. **Fungal Genetics and Biology**, v. 89, p. 126–136, 2016.

WANG, J. et al. Large-scale manufacture of VP2 VLP vaccine against porcine parvovirus in *Escherichia coli* with high-density fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 9, p. 3847–3857, 2020.

WHITTAKER, M. M. et al. Outer sphere mutagenesis of *Lactobacillus plantarum* manganese catalase disrupts the cluster core: Mechanistic implications. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 6, p. 1102–1116, 2003.

XUAN, G. et al. Expression of genes encoding the luciferase from *Photobacterium leiognathi* in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) and its application in NADH detection. **Luminescence**, v. 33, n. 6, p. 1010–1018, 2018.

YADAV, D. et al. Secretory expression of recombinant small laccase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Pichia pastoris*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 642–649, 2018.

YANG, Z.; ZHANG, Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 182–195, 2018.

YIN, J. et al. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 335–347, 2007.

YU, H. et al. Expression, purification, and bioactivity of a soluble recombinant ovine interferon-tau in *Escherichia coli*. **Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 1, p. 101, 2021

ZAHA, A & PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**: 5. ed. Porto Alegre : Artmed, 2014.

ZAMOCKY, M.; FURTMÜLLER, P. G.; OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, n. 9, p. 1527–1547, 2008.

ZENG, H.-W. et al. Production, characterization, cloning and sequence analysis of a monofunctional catalase from *Serratia marcescens* SYBC08. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 205–214, 2011.

ZERVA, A. et al. A novel thermophilic laccase-like multicopper oxidase from *Thermothelomyces thermophila* and its application in the oxidative cyclization of 2',3,4-trihydroxychalcone. **New Biotechnology**, v. 49, p. 10–18, 2019.

ZHANG, H.; ZHANG, X.; GENG, A. Expression of a novel manganese peroxidase from *Cerrena unicolor* BBP6 in *Pichia pastoris* and its application in dye decolorization and PAH degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 153, p. 107402, 2020.

ZHANG, M. et al. A unique xylose reductase from *Thermomyces lanuginosus*: Effect of lignocellulosic substrates and inhibitors and applicability in lignocellulosic bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 281, p. 374–381, 2019a.

ZHANG, W.; INAN, M.; MEAGHER, M. M. Rational Design and Optimization of Fed-Batch and Continuous Fermentations. **Pichia protocols**. Humana Press, 2007. p. 43-63.

ZHANG, Y. et al. Characterization and Exploration of Recombinant Wheat Catalase for Improvement of Wheat-Flour-Processing Quality. **Journal of Agricultural AND Food Chemistry**, v. 67, n. 9, p. 2660–2669, 2019b.

ZHU, T. et al. *Pichia pastoris* as a Versatile Cell Factory for the Production of Industrial Enzymes and Chemicals: Current Status and Future Perspectives. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 6, p. 1–13, 2019.