

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE *LACTOCOCCUS LACTIS*  
PRODUTORAS DA QUIMOSINA BOVINA: DESENVOLVIMENTO  
TECNOLÓGICO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DA PROTEÍNA  
RECOMBINANTE E SUAS IMPLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

ORIENTADO: **Tessália Diniz Luerce Saraiva**

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Anderson Miyoshi**

CO-ORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Azevedo**

BELO HORIZONTE

Dezembro – 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**TESSÁLIA DINIZ LUERCE SARAIVA**

**CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE *LACTOCOCCUS LACTIS*  
PRODUTORAS DA QUIMOSINA BOVINA: DESENVOLVIMENTO  
TECNOLÓGICO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DA PROTEÍNA  
RECOMBINANTE E SUAS IMPLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**



Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Azevedo**

**BELO HORIZONTE**

**Dezembro – 2009**

*“Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus,  
daqueles que são chamados segundo o seu propósito”*

*Rm 8.28*

***Dedico...***

*Àquele que tem o nome que esta acima de todo o nome,  
àquele que tem o nome sobremaneira maravilhoso: Jesus Cristo!*

## AGRADECIMENTOS

*Deus (o Pai), te agradeço por teus planos para mim! Por teres me trazido a Belo Horizonte, por teres planejado este mestrado para mim! Teus pensamentos e teus caminhos são mais altos! Obrigada por me guiar por eles! Te amo!*

*Jesus (o Cristo), obrigada pelo teu amor, obrigada por me regenerar, por me dar esta vida em abundância!*

*Obrigada por teres aberto mão da tua glória, para vires como homem, nos mostrar o Pai e nos mostrar o caminho de volta para Ele! Tu és o motivo e a razão desta dissertação! Te amo!*

*Espírito Santo (o Companheiro), tu és o refrigerio, a fonte de águas vivas em meio ao deserto, obrigada por estares sempre comigo, nas madrugadas de estudos, nos trabalhos, nos experimentos e em todos os momentos! Te amo!*

*À Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.*

*Ao Professor Anderson Miyoshi pela oportunidade, orientação, conhecimento, confiança, apoio sem os quais não seria possível o desenvolvimento deste trabalho. Muito Obrigada!*

*Ao Professor Vasco Azevedo pela orientação, motivação, confiança e oportunidades! Pela receptividade e incentivo desde que meu esposo e eu chegamos a Belo Horizonte! Muito Obrigada!*

*Ao Prof. Sergio Echeverrigaray e a Prof<sup>a</sup>. Ana Paula Delamare do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Caxias do Sul – UCS pela colaboração. Ao Mestre Jucimar Zacaria pelo auxílio nos experimentos.*

*Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite!*

*Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.*

*À coordenação, professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Genética do ICB-UFMG.*

*Aos colegas do LGCM pela amizade, respeito, auxílio e ambiente agradável de trabalho:*

*Aldeydes Nascimento, Anne Pinto, Anderson Santos, Camila Prósperi, Clarissa Rocha, Caroline Domingueti, Daniel Bückner, Dayana Ribeiro, Fernanda Dorella, Fernanda Lima, Fernanda Magalhães, Flávia Souza, Jonh McCulloch, Luís Pacheco, Marcela Santiago, Marina Coimbra, Pablo Matias, Sarah Vigüetti, Sintia Almeida, Siomar Soares, Thiago Castro, Vanessa Bastos, Vanessa Pfeiffer, Vivian D'Afonseca, Wanderson Marques e especialmente a Marcília Costa e Pamela Mancha.*

*Á minha colega e amiga Núbia Seyffert pelo incentivo a fazer o mestrado na UFMG.*

*Á minha "IC" Aracèle Souza pela participação na parte final e mais tensa deste trabalho.*

*Á Kátia Morais pela disponibilidade e grande ajuda prestada.*

*Ao meu marido Maicon, pelo amor e companheirismo em todos os momentos que passamos juntos, por lutar junto comigo pelos meus sonhos! Tu és um presente que Deus me deu! Te amo!*

*Aos meus pais Ruth e Jorge pelo amor e carinho!*

*Minhas irmãs, Melissa e Inessa, pelo amor e amizade!*

*As minhas amigas Silvana e Marcela do STC, vocês são muito preciosas para mim, são bênçãos de Deus em minha vida!*

*E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho!*

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações</b> .....	<b>V</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VII</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. As Bactérias lácticas</b> .....	<b>2</b>
I.1.1. Definição.....	2
I.1.2. Utilização e importância industrial das bactérias lácticas .....	2
I.1.3. Utilização das bactérias lácticas na saúde e nutrição .....	3
I.1.4. Novas e futuras utilizações das bactérias lácticas.....	4
I.1.4.1. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS EM FERMENTADORES.....	4
I.1.4.2. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DENTRO DOS ALIMENTOS .....	5
I.1.4.3. CONSTRUÇÃO DE VACINAS VIVAS.....	5
<b>I.2. Lactococcus lactis, o modelo das bactérias lácticas</b> .....	<b>6</b>
I.2.1. Características gerais.....	6
I.2.2. A genética de <i>L. lactis</i> .....	7
I.2.3. Os plasmídeos de <i>L. lactis</i> .....	7
I.2.4. O genoma de <i>L. lactis</i> .....	7
I.2.5. O controle da expressão gênica de <i>L. lactis</i> .....	8
I.2.5.1. A TRANSCRIÇÃO .....	8
I.2.5.2. A TRADUÇÃO .....	9
I.2.6. Ferramentas genéticas para a produção de proteínas heterólogas em <i>L. lactis</i> .....	9
I.2.6.1. VETORES DE CLONAGEM .....	10
I.2.6.2. SISTEMAS DE EXPRESSÃO E ENDEREÇAMENTO CELULAR DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS .....	10
<b>I.3. Quimosina</b> .....	<b>16</b>
I.3.1. Introdução.....	16
I.3.2. Origem.....	17

I.3.3. Isoenzimas de Quimosina .....	18
I.3.4. Características bioquímicas .....	19
I.3.5. Mecanismo de atuação Quimosina na coagulação do leite.....	20
I.3.6. Obtenção da Quimosina para uso comercial .....	22
I.3.6.1. COAGULANTES ALTERNATIVOS .....	23
I.3.6.2. QUIMOSINA RECOMBINANTE .....	24
<b>II. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>III. ESTRATÉGIA 1 .....</b>	<b>32</b>
<b>Construção de Linhagens de <i>L. lactis</i> Produtoras da Forma Citoplasmática e Secretada da Pró-quimosina bovina B .....</b>	<b>32</b>
<b>III.1. Objetivos .....</b>	<b>33</b>
III.1.1. Objetivo Geral .....	33
III.1.2. Objetivos Específicos .....	33
<b>III.2. Material e Métodos .....</b>	<b>34</b>
III.2.1. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo .....	34
III.2.2. Manipulação do DNA .....	34
III.2.3. Construção da ORF sintética da Pró-quimosina bovina B com códons preferenciais de <i>L. lactis</i> .....	37
III.2.4. Preparação do DNA plasmidiano pBSIISK:pró-quimosina B.....	38
III.2.4.1. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA .....	38
III.2.4.1.1. Confeção de <i>E. coli</i> eletrocompetente.....	38
III.2.4.1.2. Transformação de <i>E. coli</i> TOP10 com o plasmídeo pBSIISK:pró-quimosina B .....	39
III.2.4.1.3. Extração do plasmídeo pBSIISK:pró-quimosina B de <i>E. coli</i> .....	39
III.2.4.1.4. Resolução eletroforética .....	40
III.2.4.1.5. Quantificação do pBSIISK:pró-quimosina B.....	40
III.2.5. Clonagem da ORF pró-quimosina B no sistema TOPO .....	40
III.2.5.1. AMPLIFICAÇÃO DA ORF PRÓ-QUIMOSINA B.....	40
III.2.5.2. CLONAGEM DA ORF CODIFICADORA DA PRÓ-QUIMOSINA BOVINA B NO VETOR PCRII-TOPO (BLUNT) .....	43
III.2.5.3. CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA E TAMANHO DA ORF CODIFICADORA DA PRÓ-QUIMOSINA BOVINA B NO VETOR PCRII-TOPO (BLUNT).....	43
III.2.6. Subclonagem da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B nos vetores XIES.....	43
III.2.6.1. DIGESTÃO ENZIMÁTICA DOS VETORES PXYLT:CYT:NUC E PXYLT:SEC:NUC .....	44

III.2.6.2. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA PXYLT:CYT E PXYLT:SEC .....	44
III.2.6.3. DIGESTÃO ENZIMÁTICA DOS PLASMÍDEOS PCRII-TOPO:PRÓ-QUIMOSINA B:CYT E PCRII-TOPO:PRÓ-QUIMOSINA B:SEC .....	44
III.2.6.4. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO A SEQÜÊNCIA CODIFICADORA DA PRÓ-QUIMOSINA BOVINA B.....	45
III.2.6.5. LIGAÇÃO DA ORF CODIFICADORA DA PRÓ-QUIMOSINA BOVINA B NOS VETORES PXYLT:CYT E PXYLT:SEC.....	45
III.2.6.6. TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i> TOP10 COM OS PLASMÍDEOS PXYLT:CYT:PRÓ-QUIMOSINA B E PXYLT:SEC:PRÓ-QUIMOSINA B .....	45
III.2.6.7. CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA E TAMANHO DO INSERTO PRÓ-QUIMOSINA B NOS VETORES PXYLT:CYT E PXYLT:SEC.....	46
III.2.6.7.1. Reação de seqüenciamento e análise <i>in silico</i> .....	46
III.2.7. Transformação de <i>L. lactis</i> NCDO2118 com os plasmídeos pXylT:CYT:pró-quimosina B e pXylT:SEC:pró-quimosina B.....	47
III.2.7.1. CONFECÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES DE <i>L. LACTIS</i> NCDO2118.....	47
III.2.7.2. TRANSFORMAÇÃO DE <i>L. LACTIS</i> NCDO2118 COM OS PLASMÍDEOS PXYLT:CYT:PRÓ-QUIMOSINA B E PXYLT:SEC:PRÓ-QUIMOSINA B.....	47
III.2.7.3. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIANO DE <i>L. LACTIS</i> EM PEQUENA ESCALA.....	48
III.2.7.4. CONFIRMAÇÃO DOS CLONES DE <i>L. LACTIS</i> PORTADORES DOS PLASMÍDEOS PXYLT:CYT: PRÓ-QUIMOSINA B E PXYLT:SEC: PRÓ-QUIMOSINA B.....	48
III.2.8. Confirmação da produção da Pró-quimosina bovina B pelas linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> .....	48
III.2.8.1. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA ORF DE INTERESSE EM <i>L. LACTIS</i> .....	49
III.2.8.2. EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS DOS CLONES RECOMBINANTES DE <i>L. LACTIS</i> NCDO2118	49
III.2.8.2.1. Fração celular (Total) e Secretada .....	49
III.2.8.2.2. Fração citoplasmática.....	49
III.2.8.2.3. Protoplasto.....	50
III.2.8.3. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA .....	50
III.2.8.4. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-QUIMOSINA BOVINA.....	50
III.2.8.4.1. Preparação dos animais.....	51
III.2.8.4.2. Doses administradas .....	51
III.2.8.4.3. Coleta do Sangue e obtenção do Soro .....	51
III.2.8.5. WESTERN BLOTTING .....	52
III.2.9. Detecção da atividade proteolítica da Quimosina bovina B produzida pelas linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> .....	52
III.2.9.1. TESTE DE COAGULAÇÃO EM PLACA .....	52
III.2.9.2. ENSAIO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA QUIMOSINA BOVINA B PRODUZIDA PELAS LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>L. LACTIS</i> (DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA) .....	53

III.2.9.2.1. Análise Estatística .....	54
III.2.9.3. ZIMOGRAMA (DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA QUIMOSINA B) .....	54
<b>III.3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>55</b>
<i>III.3.1. Construção das linhagens recombinantes de L. lactis produtoras da Pró-quimosina bovina B</i>	<b>55</b>
III.3.1.1. CONFECÇÃO DA ORF SINTÉTICA .....	55
III.3.1.2. AMPLIFICAÇÃO DA ORF CODIFICADORA DA PRÓ-QUIMOSINA BOVINA B COM CÓDONS PREFERENCIAIS DE <i>L. LACTIS</i> .....	56
III.3.1.3. CLONAGEM DA ORF CODIFICADORA DA PRÓ-QUIMOSINA BOVINA B NO SISTEMA TOPO .....	59
<i>III.3.2. Clonagem da ORF pró-quimosina B no sistema de expressão XIES .....</i>	<b>60</b>
III.3.2.1. SEQÜENCIAMENTO DOS VETORES CONSTRUÍDOS .....	62
<i>III.3.3. Análise da produção da Pró-quimosina bovina B pelas linhagens recombinantes de L. lactis NCDO2118 .....</i>	<b>62</b>
III.3.3.1. AVALIAÇÃO DO ENDEREÇAMENTO DA PRÓ-QUIMOSINA BOVINA B SECRETADA .....	65
<i>III.3.4. Detecção da atividade proteolítica da proteína recombinante produzida por L. lactis .....</i>	<b>66</b>
III.3.4.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COAGULAÇÃO E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA QUIMOSINA BOVINA B (ENSAIO EM PLACA) .....	67
III.3.4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AZOCASEINOLÍTICA (QUANTITATIVA) E ZIMOGRAMA (SEMI- QUANTITATIVA) .....	67
<b>III.4. Conclusão .....</b>	<b>72</b>
<b>IV. ESTRATÉGIA 2 .....</b>	<b>74</b>
<b>Construção de Linhagens de L. Lactis Produtoras da Forma Secretada da Quimosina bovina A e B .....</b>	<b>74</b>
<b>IV.1. Objetivos .....</b>	<b>75</b>
IV.1.1. Objetivo Geral .....	75
IV.1.2. Objetivos Específicos .....	75
<b>IV.2. Material e Métodos .....</b>	<b>76</b>
IV.2.1. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo .....	76
IV.2.2. Manipulação do DNA .....	76
IV.2.3. Confecção dos oligonucleotídeos iniciadores e mutação sítio-dirigida .....	79
IV.2.3.1. RESOLUÇÃO ELETROFORÉTICA .....	85
IV.2.4. Clonagem no Sistema TOPO .....	85

IV.2.4.1. CLONAGEM DAS ORFS CODIFICADORAS DA QUIMOSINA BOVINA A E QUIMOSINA B NO VETOR PCRII-TOPO (BLUNT) .....	85
IV.2.4.2. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA ( <i>E. COLI</i> ).....	85
IV.2.4.3. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIANO DE <i>E. COLI</i> EM PEQUENA ESCALA .....	86
IV.2.4.4. CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA E TAMANHO DAS ORFS CODIFICADORAS DA QUIMOSINA BOVINA A E QUIMOSINA B NO VETOR PCRII-TOPO (BLUNT) .....	86
IV.2.4.4.1. PCR.....	86
IV.2.4.4.2. Digestão enzimática.....	86
IV.2.5. Identificação dos clones recombinantes mutados.....	<b>87</b>
IV.2.6. Subclonagem no sistema XIES .....	<b>87</b>
IV.2.6.1. DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO VETOR PXYLT:SEC:NUC.....	87
IV.2.6.2. PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE DNA PXYLT:SEC.....	87
IV.2.6.3. DIGESTÃO ENZIMÁTICA DOS PLASMÍDEOS PCRII-TOPO:QUIMOSINA A E PCRII-TOPO:QUIMOSINA B.....	88
IV.2.6.4. PURIFICAÇÃO DSO FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO AS SEQÜÊNCIAS CODIFICADORAS DA QUIMOSINA A E QUIMOSINA B .....	88
IV.2.6.5. LIGAÇÃO DAS ORFS CODIFICADORAS DA QUIMOSINA A E QUIMOSINA B NO VETOR PXYLT:SEC E TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i> TOP10.....	89
IV.2.6.6 CONFIRMAÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES .....	89
IV.2.7. Transformação de <i>L. lactis</i> NCDO2118 com os plasmídeos pXylT:SEC:quimosina A e pXylT:SEC:quimosina B.....	<b>89</b>
IV.2.7.1. CONFECÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES DE <i>L. LACTIS</i> NCDO2118 E TRANSFORMAÇÃO COM OS PLASMÍDEOS PXYLT:SEC:QUIMOSINA A E PXYLT:SEC:QUIMOSINA B.....	89
IV.2.7.2. CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>L. LACTIS</i> .....	89
IV.2.8. Confirmação da produção da Quimosina A e Quimosina B pelas linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> .....	<b>90</b>
IV.2.8.1. INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM <i>L. LACTIS</i> E EXTRAÇÃO PROTEÍCA....	90
IV.2.8.2 .ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA E WESTERN BLOTTING .....	90
<b>IV.3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>91</b>
IV.3.1. Mutação sítio dirigida .....	<b>91</b>
IV.3.2. Clonagem do produto da mutação sítio-dirigida no sistema Topo e confirmação dos clones recombinantes.....	<b>94</b>
IV.3.3. Diferenciação dos clones recombinantes.....	<b>96</b>
IV.3.3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS CLONES QUE CONTÉM O INSERTO CODIFICADOR DA QUIMOSINA A OU B... 100	
IV.3.4. Subclonagem no sistema XIES .....	<b>101</b>
IV.3.5. Obtenção das linhagens de <i>L. lactis</i> recombinantes.....	<b>104</b>

<i>IV.3.6. Detecção da produção da Quimosina A e B pelas linhagens recombinantes de L. lactis .....</i>	<b>105</b>
IV.3.3.1. AVALIAÇÃO DO ENDEREÇAMENTO DA RQUIMOSINA BOVINA A E RQUIMOSINA B.....	107
<b>IV.4. Conclusão.....</b>	<b>109</b>
<b>V. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>110</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática da síntese, <i>in vivo</i> , da Quimosina bovina. .18	18
<b>Figura 2</b> – Modelo computacional da estrutura terciária da Quimosina bovina de <i>Bos taurus</i> . .....20	20
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática da organização das micelas de caseína ...21	21
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática do vetor pBSIIISK: <i>pró-quimosina B</i> .....56	56
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática do vetor de expressão do sistema XIES para endereçamento citoplasmático (pXyIT:CYT: <i>nuc</i> ) de proteínas. ....57	57
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática do vetor de expressão do sistema XIES para endereçamento extracelular (pXyIT:SEC: <i>nuc</i> ) de proteínas. ....57	57
<b>Figura 7</b> – Análise do produto da amplificação por PCR da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B .....58	58
<b>Figura 8</b> – Amplificação por PCR da ORF <i>pró-quimosina bovina B</i> a partir do DNA plasmidiano extraído de células de <i>E. coli</i> transformadas com os plasmídeos pCR II-TOPO: <i>pró-quimosina B:CYT</i> e pCR II-TOPO: <i>pró-quimosina B:SEC</i> .....59	59
<b>Figura 9</b> – Digestão enzimática dos plasmídeos pCR II-TOPO: <i>pró-quimosina B:CYT</i> e pCR II-TOPO: <i>pró-quimosina B:SEC</i> .....61	61
<b>Figura 10</b> – Amplificação por PCR da ORF <i>pró-quimosina B</i> a partir do DNA plasmidiano extraído de células de <i>L. lactis</i> transformadas com os plasmídeos pXyIT:CYT: <i>pró-quimosina B</i> e pXyIT:SEC: <i>pró-quimosina B</i> .....61	61
<b>Figura 11</b> – Representação dos vetores de expressão pXyIT:CYT: <i>pró-quimosina B</i> e pXyIT:SEC: <i>pró-quimosina B</i> .....62	62
<b>Figura 12</b> – Imunodeteção da rPró-quimosina bovina B a partir das proteínas extraídas da fração celular dos clones de <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXyIT:CYT: <i>pró-quimosina B</i> ) .....63	63
<b>Figura 13</b> – Imunodeteção da rPró-quimosina bovina B a partir das proteínas extraídas da fração celular dos clones de <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXyIT:SEC: <i>pró-quimosina B</i> ) .....65	65

<b>Figura 14</b> – Imunodeteccção para avaliação do endereçamento da rPró-quimosina bovina B produzido pela linhagem <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B) .....	66
<b>Figura 15</b> – Zimograma sobre a atividade proteolítica das proteínas extraídas das frações secretada, celular e protoplasto das linhagens de <i>L. lactis</i> (pXyIT:CYT:pró-quimosina B e pXyIT:SEC:pró-quimosina B) sobre a caseína .....	70
<b>Figura 16</b> – Representação do anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para realizar mutação sítio-dirigida para converter a ORF codificadora da Quimosina bovina B com códons preferências para <i>L. lactis</i> em Quimosina A....	80
<b>Figura 17</b> – Representação esquemática da primeira etapa da mutação sítio-dirigida para conversão da seqüência codificadora da Quimosina bovina B com códons preferências para <i>L. lactis</i> em Quimosina A: amplificação dos fragmentos 5' e 3' ....	83
<b>Figura 18</b> – Representação esquemática da segunda etapa da mutação sítio-dirigida para conversão da seqüência codificadora da Quimosina B com códons preferenciais de <i>L. lactis</i> em Quimosina A: reação de PCR com os fragmentos 5' e 3' e sem oligonucleotídeos iniciadores.....	84
<b>Figura 19</b> – Representação esquemática da terceira etapa da mutação sítio-dirigida para conversão da seqüência codificadora da Quimosina B com códons preferenciais de <i>L. lactis</i> em Quimosina A: reação de PCR para a amplificação da seqüência codificadora da Quimosina A .....	84
<b>Figura 20</b> – Produtos da amplificação da seqüência codificadora da Quimosina B utilizando os iniciadores contendo a mutação para obtenção da Quimosina A.....	92
<b>Figura 21</b> – Produto da <i>PCR-overlapping</i> .....	93
<b>Figura 22</b> – Produto da amplicação da ORF mutada. A: Resolução eletroforética do produto de amplificação da seqüência mutada codificadora da Quimosina A. ....	94
<b>Figura 23</b> – Amplificação por PCR de um fragmento de aproximadamente 972 pb a partir do DNA plasmidiano extraído de células de <i>E. coli</i> transformadas com o produto da ligação do vetor pCR - II-TOPO com o produto da mutação sítio-dirigida .....	95
<b>Figura 24</b> – Digestão enzimática dos plasmídeos gerados pela ligação do produto da mutação sítio-dirigida no vetor pCR - II-TOPO com a enzima <i>EcoRI</i> .....	96

<b>Figura 25</b> – Representação esquemática dos sítios de restrição reconhecidos pela enzima <i>HphI</i> presentes nas seqüências da <i>quimosina A</i> e <i>quimosina B</i> com códons preferências de <i>L. lactis</i> .....	97
<b>Figura 26</b> – Esquematisação das possíveis orientações dos insertos dentro dos vetores pCRII-TOPO: <i>quimosina A</i> e pCRII-TOPO: <i>quimosina B</i> , o número de sítios de restrição para a enzima <i>HphI</i> e o provável peso molecular dos fragmentos gerados .....	98
<b>Figura 27</b> – Análise <i>in silico</i> da digestão enzimática dos vetores pCRII-TOPO: <i>quimosina A</i> e pCRII-TOPO: <i>quimosina B</i> com a enzima de restrição <i>HphI</i> ...	99
<b>Figura 28</b> – Digestão enzimática dos plasmídeos, oriundos da ligação do vetor pCRII-TOPO com o produto da mutação sítio-dirigida, com enzima <i>HphI</i> .....	101
<b>Figura 29</b> – Digestão enzimática dos plasmídeos pXyIT:SEC: <i>nuc</i> , pCRII-TOPO: <i>quimosina A</i> e pCRII-TOPO: <i>quimosina B</i> com as enzimas de restrição <i>NsiI</i> e <i>EcoRI</i> .....	102
<b>Figura 30</b> – Digestão enzimática dos plasmídeos pXyIT:SEC: <i>quimosina A</i> e pXyIT:SEC: <i>quimosina B</i> com as enzimas <i>NsiI</i> e <i>EcoRI</i> .....	103
<b>Figura 31</b> – Representação esquemática dos vetores de expressão pXyIT:SEC: <i>quimosina A</i> e pXyIT:SEC: <i>quimosina B</i> .....	103
<b>Figura 32</b> – Produto da extração dos plasmídeos pXyIT:SEC: <i>quimosina A</i> e pXyIT:SEC: <i>quimosina B</i> obtidos a partir dos clones selecionados de <i>L. lactis</i> NCDO2118.....	104
<b>Figura 33</b> – Digestão enzimática dos plasmídeos pXyIT:SEC: <i>quimosina A</i> e pXyIT:SEC: <i>quimosina B</i> (extraídos a partir de clones de <i>L. lactis</i> ) com as enzimas <i>NsiI</i> e <i>EcoRI</i> .....	105
<b>Figura 34</b> – Imunodeteccção da rQuimosina bovina A e rQuimosina bovina B a partir de culturas dos clones de <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXyIT:SEC: <i>quimosina A</i> ) e <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXyIT:SEC: <i>quimosina A</i> ), respectivamente.....	106
<b>Figura 35</b> – Imunodeteccção para avaliação do endereçamento da rQuimosina A e rQuimosina B produzidas pelas linhagens de <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXyIT:SEC: <i>quimosina A</i> ) clone 1 e <i>L. lactis</i> NCDO 2118 (pXyIT:SEC: <i>quimosina B</i> ) clone 1.....	108

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Linhagens bacterianas utilizadas para realizar a clonagem e expressão da Pró-quimosina B em <i>L. lactis</i> .....	35
<b>Tabela 2:</b> Plasmídeos utilizados para realizar a clonagem e expressão da pró-quimosina B em <i>L. lactis</i> na forma secretada e citoplasmática. ....	36
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros da reação de PCR utilizada para a amplificação da seqüência codificadora da Pró-quimosina B.....	42
<b>Tabela 4:</b> Valores obtidos pela leitura da $A_{420}$ das amostras após 90 e 180 minutos de reação com azocaseína em pH 6,5.....	69
<b>Tabela 5:</b> Linhagens bacterianas utilizadas para realizar a clonagem e expressão da Quimosina A e Quimosina B em <i>L. lactis</i> .....	77
<b>Tabela 6:</b> Plasmídeos utilizados para realizar a clonagem e expressão da Quimosina A e Quimosina B em <i>L. lactis</i> na forma secretada.....	78
<b>Tabela 7:</b> Parâmetros da PCR utilizada para a amplificação da seqüência codificadora da Pró-quimosina B.....	81

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

°C – Graus Celsius

μFD – Microfaraday ( $10^{-6}$  faradays)

μg – Micrograma ( $10^{-6}$  gramas)

μL – Microlitro ( $10^{-6}$  litros)

μm – micrômetro ( $10^{-6}$  metros)

Ω – OHM

CFA – Adjuvante Completo de Freud

cm – Centímetro ( $10^{-2}$  metros)

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DTT – Ditioneitol

dNTP – 2' - Deoxinucleosídeo 5' – Trifosfatos

$A_{420}$  – Absorbância a 420 nanômetros

$DO_{600nm}$  – Densidade Ótica medida utilizando o comprimento de onda de 600 nanômetros

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (teste imunoenzimático)

IFA – Adjuvante Incompleto de Freud

kDa – Quilodalton ( $10^3$  daltons)

kg – Quilograma ( $10^3$  gramas)

kV – Quilovolt ( $10^3$  Volts)

L – Litros

LPS – Lipopolissacarídeo

M – Molar

$MgCl_2$  – Cloreto de Magnésio

min. – Minuto

mL – Mililitro ( $10^{-3}$  litros)

mm - Milímetros ( $10^{-3}$  metros)

mM – Milimolar ( $10^{-3}$  molar)

NaCl – Cloreto de Sódio

ng – Nanograma ( $10^{-9}$  gramas)

nm – Nanômetro ( $10^{-9}$  metros)

ORF – *Open Reading Frame* (fase aberta de leitura)

pb – Pares de Bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PEG – Polietileno Glicol  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
PMSF – Fenil-Metil Sulfonil Fluoreto  
rpm – Rotações por Minuto  
seg. – Segundos  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
TCA – Ácido Tricloroacético  
UFC – Unidade Formadora de Colônia  
X – Vezes

## RESUMO

A Quimosina é uma enzima proteolítica produzida no abomaso de bezerros lactentes, sintetizada *in vivo* como uma pró-enzima, a Pró-quimosina. Quando encontra um pH ácido, sofre auto-clivagem convertendo-se em Quimosina, sua forma ativa. A Quimosina possui a capacidade de converter o leite em uma substância semi-sólida, aumentando o tempo de permanência do “leite” no estômago desses animais permitindo sua digestão. Devido a essa alta capacidade de coagulação do leite, a Quimosina tem sido amplamente utilizada na indústria queijeira. Porém devido a diminuição de animais para o abate, e o crescente aumento do uso deste coagulante pela indústria queijeira, iniciou-se a busca por coagulantes alternativos. Neste contexto, microrganismos geneticamente modificados produtores de Quimosina bovina tem sido construídos. *Lactococcus lactis* representa uma boa e segura alternativa para a produção de proteínas recombinantes de interesse biotecnológico, devido ao seu status "GRAS" (Generally Regarded As Safe). Além disso, essa bactéria láctica (BL) é amplamente utilizada como cultura iniciadora no preparo de produtos lácteos fermentados, sendo adicionada ao leite, assim como a Quimosina, durante o processo de fabricação de alguns tipos de queijo. Assim, a construção de linhagens de *L. lactis* produtoras de quimosina mostram-se como alternativas interessantes para simplificar o processo *downstream* e produção em larga escala. Aqui, é descrita a construção de linhagens recombinantes de *L. lactis* produzindo a Pró-quimosina B de *Bos taurus* na forma citoplasmática e secretada, utilizando um sistema de expressão induzido por xilose. A ORF da *pró-quimosina B* utilizada neste trabalho foi modificada para códons preferencias de *L. lactis*. Esta seqüência foi primeiramente clonada no pCRII-TOPO (Blunt) e posteriormente subclonado nos vetores de expressão pXy/T:CYT e pXy/T:SEC, para endereçamento citoplasmático e secretado, respectivamente; e transferidos para *L. lactis*. A capacidade produção da proteína heteróloga foi avaliada por imunodeteccção. A Pró-quimosina B com endereçamento secretado foi eficientemente produzida por *L. lactis*, embora tenha sido observado que a mesma esteja ficando retida no envelope celular; em consequência disso nenhuma atividade de coagulação ou proteolítica foi observada. No entanto, a clonagem da forma ativa da Pró-quimosina B, a Quimosina B, assim como a Quimosina A, uma isoenzima

mais ativa, representam uma estratégia interessante, pois devido ao seu menor peso molecular e diferente conformação, podem ter facilitada sua exportação para o meio extracelular. Para investigar esta hipótese, outras linhagens recombinantes de *L. lactis* foram construídas. Estas linhagens construídas para secretar a Quimosina A e Quimosina B estão em fase de estudo para determinar se estas linhagens possuem potencial para se tornarem um fermento lácteo produtor de Quimosina.

## ABSTRACT

Chymosin, a proteolytic enzyme produced in the abomasum of suckling calves, is synthesized *in vivo* as a proenzyme, the prochymosin. Then, under acidic pH, it is cleaved to the active form, chymosin. Chymosin efficiently converts liquid milk to a semisolid, allowing it to be retained for longer periods in the stomachal environment to be digested. Thus, due to its high capacity of clotting milk, it has been widely used on cheese industry. However due to the decrease of animals for slaughter and the increasing use of this clotting for the elaboration of cheese, the search for an alternative clotting began. In this context, genetically engineered microorganisms producing chymosin have been constructed. *Lactococcus lactis* is a good and safe alternative for the production of recombinant proteins of biotechnological interest due to being classified as “GRAS” (Generally Regarded As Safe). Moreover, this lactic acid bacterium is widely used in the preparation of fermented foods as starter culture, being added to the milk, as well as the chymosin, during the production process of some cheese types. So the construction of bovine chymosin-producing *L. lactis* strain may represent an interesting alternative to simplify the downstream process and large-scale production. Here, we describe the construction of a recombinant *L. lactis* strain expressing the cytoplasmatic or secreted forms of the Prochymosin B from *Bos taurus* based in a xylose-inducible expression system. The ORF of the Prochymosin B was synthesized, based on the codon usage of *L. lactis*. First, the Prochymosin B coding sequence was cloned in the pCRII-TOPO (Blunt) vector and then subcloned in the expression vectors pXy/T:CYT and pXy/T:SEC, for cytoplasmatic or secreted addressing respectively, being afterwards transferred to *L. lactis*. The production capacity of such *L. lactis* strains was determined by immunoblot assays. The secreted form of Prochymosin B was efficiently produced in *L. lactis*, although it has been observed that the recombinant protein remained stacked in the cell envelope; in consequence, no clotting or proteolytic activity was observed. Therefore, cloning of the Prochymosin B, in its active form, chymosin B, as the chymosin A, a more active isoenzyme, may be a more interesting strategy for the attainment of this enzyme, since its lower molecular weight and folding could facilitate its targeting to the extracellular medium. In order to investigate this hypothesis, we constructed other *L.*

*lactis* strains. These strains, secreting the chymosin A or chymosin B are now being studied to determine their potential as milk leaven and chymosin producers.

# I

# INTRODUÇÃO

# I. INTRODUÇÃO

## I.1. As Bactérias lácticas

### I.1.1. Definição

As bactérias lácticas constituem um grupo bastante heterogêneo de microrganismos ubíquos ocupando nichos ecológicos que vão desde a superfície das plantas até o trato gastrointestinal dos animais. Embora diverso, os integrantes deste grupo compartilham características comuns como: (i) serem Gram-positivo; (ii) anaeróbios facultativos; (iii) não produtores de catalase; (iv) não formadores de esporos; (v) imóveis; e principalmente (vi) converterem açúcares em ácido láctico, característica esta que rendeu ao grupo o nome de “Bactérias Lácticas” (BL). Atualmente, onze gêneros bacterianos entre cocos e bastonetes que possuem uma porcentagem G+C no genoma inferior à 54%, compõem o grupo das BL: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. (Stiles and Holzapfel 1997).

### I.1.2. Utilização e importância industrial das bactérias lácticas

As BL, com poucas exceções, obtêm sua energia através da conversão de açúcares, principalmente da glicose, em ácido láctico (via homofermentativa ou homoláctica) e/ou ácido láctico e outros produtos (via heterofermentativa ou mixta) (Carr *et al.*, 2002). Desta forma, as BL estão, de um modo geral, associadas ao preparo de alimentos fermentados como iogurtes, queijos, leites acidófilos, pães, manteiga, vinhos, carnes, embutidos, picles e silagem. Este processo, conhecido como “fermentação láctica de alimentos”, remonta à cerca de 8.000 anos a.C. e constitui uma das mais antigas formas de conservação dos alimentos e utilização das BL pelo homem (Tailliez 2001). A conservação dos alimentos não só se deve à

acidificação do meio (pH 4.5 à 3.5) mas também à produção de numerosos agentes antibacterianos como bacteriocinas e compostos orgânicos (Van de Guchte *et al.*, 2001). Estes dois fatores inibem o crescimento de uma microbiota indesejável e/ou desenvolvem propriedades organolépticas como textura, aroma e sabor do produto final.

### **I.1.3. Utilização das bactérias lácticas na saúde e nutrição**

Embora poucas espécies do grupo das BL, como por exemplo *Streptococcus pneumoniae* (agente causador da pneumonia), sejam patogênicas, a maioria das espécies são consideradas seguras ou “GRAS” (Generally Recognized As Safe). Das diversas propriedades atribuídas às BL, talvez a mais antiga e controversa seja a capacidade de promover um efeito benéfico, ou “probiótico”, à saúde humana e animal (Fuller and Gibson 1997).

Dentre as várias espécies de BL conhecidas como probióticas, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri* se destacam pelas suas aplicações terapêuticas no tratamento e prevenção de diversos distúrbios (Ouwehand *et al.*, 2002).

A primeira aplicação está relacionada à digestibilidade da lactose. Esse açúcar, presente em abundância nos produtos lácteos, pode induzir fenômenos de intolerância nos consumidores com deficiência congênita de lactase. O quadro clínico pode ser traduzido por diarreias, cólicas abdominais e flatulência. Curiosamente, esses sintomas aparecem com a ingestão do leite, mas são praticamente ausentes com a ingestão do iogurte nas mesmas proporções. Existem duas explicações para o fenômeno: (i) as bactérias vivas presentes no iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) suplementariam a deficiência do hospedeiro em lactase e/ou (ii) estimulariam a produção endógena desta enzima pela mucosa intestinal do hospedeiro (Roberfroid 2000).

Uma segunda aplicação das BL probióticas seria a de proteção contra patógenos microbianos. Neste caso, as BL funcionariam como uma barreira impedindo a colonização do trato gastrointestinal por bactérias patogênicas. Os resultados mais significativos foram obtidos com certos tipos de lactobacilos e

bifidobactérias que se mostraram particularmente eficazes no tratamento de diarreias em neonatos (Ouwehand *et al.*, 2002).

Outra aplicação bem estabelecida é a estimulação do sistema imune do hospedeiro. Entre os lactobacilos, a espécie *L. casei* mostrou-se capaz de estimular a resposta imunitária de crianças vacinadas por via oral contra o rotavírus, vírus responsável pela diarreia aguda infantil nos países em desenvolvimento (Ouwehand *et al.*, 2002).

Ainda que algumas destas aplicações terapêuticas sejam contestadas, a crescente preocupação com a saúde e o bem estar da população, associados ao uso de substâncias naturais fez com que os produtos probióticos ganhassem considerável atenção nos últimos anos pelas indústrias de laticínios. Atualmente, uma série de produtos lácteos contendo probióticos estão disponíveis no mercado, sendo os leites fermentados os produtos mais difundidos.

De forma conclusiva, existem evidências de que as BL ingeridas vivas são capazes de exercer efeitos probióticos no hospedeiro. No entanto, seu envolvimento e uso potencial no tratamento e prevenção de doenças requer um maior conhecimento do modo e mecanismo de ação.

#### **I.1.4. Novas e futuras utilizações das bactérias lácticas**

Pelo menos três tipos de utilização “extra-alimentares” são vislumbradas para as BL: (i) a produção, em fermentadores, de proteínas de interesse econômico, (ii) a produção, diretamente dentro dos alimentos, de proteínas de interesse biotecnológico e (iii) a construção de vacinas vivas.

##### ***I.1.4.1. Produção de proteínas em fermentadores***

Uma aplicação clássica consistirá na utilização das BL para a produção, em fermentadores, de moléculas de interesse econômico. Neste sentido, a secreção destas moléculas apresentaria certas vantagens em relação à produção intracelular como: (i) a facilidade de purificação do produto final, (ii) uma cultura celular contínua e (iii) evitaria a formação de agregados protéicos intracelulares (Langella and Le Loir 1999).

#### ***1.1.4.2. Produção de proteínas dentro dos alimentos***

Uma outra aplicação das BL seria na produção de, por exemplo, enzimas dentro dos alimentos a fim de: (i) modificar as propriedades organolépticas dos produtos, (ii) prevenir o aparecimento de espécies bacterianas indesejáveis, (iii) acelerar a maturação de queijos, (iv) otimizar o processo de ensilagem e (v) suprir deficiências de enzimas digestivas do indivíduo como, por exemplo, lipases. Neste último caso, a suplementação da dieta com lipases bacterianas poderia ser uma alternativa promissora. A eficácia destas enzimas já foi demonstrada no tratamento de cães (Suzuki *et al.*, 1997) e porcos (Drouault *et al.*, 2002) com esteatorréia experimental. Neste último, linhagens recombinantes de *L. lactis* expressando o gene *lip* (lipase) de *Staphylococcus aureus* (Drouault *et al.*, 2000) foram administradas em porcos com insuficiência pancreática e os mesmos demonstraram um aumento de 15% na capacidade de absorção dos lípides presentes na dieta quando comparados aos animais controle.

#### ***1.1.4.3. Construção de vacinas vivas***

O uso de microrganismos vivos como veículos celulares para a produção e a apresentação de antígenos tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de novas vacinas.

Atualmente, maioria dos veículos utilizados são derivados de microrganismos patogênicos como: *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus anthracis*; dos quais linhagens atenuadas foram construídas ou isoladas (Medina and Guzmán 2001). Contudo, mesmo assim, estas linhagens apresentam um certo risco de reversão. Este problema poderia ser superado através da utilização de bactérias não patogênicas como as BL. Além de serem consideradas seguras (“GRAS”), certas BL possuem a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal ou a mucosa genital de certos animais e do homem, tornando-as excelentes candidatas à vacinas orais. As vacinas orais apresentam, dentre outras vantagens, a capacidade de induzir uma imunidade através da superfície de mucosas. Estas superfícies

constituem uma das principais vias de entrada e a primeira linha de defesa do organismo contra o ataque de agentes patogênicos (Mercenier 1999).

Até o momento alguns trabalhos utilizando *L. lactis*, *Streptococcus gordonii* e *Lactobacillus* sp. como vacinas vivas foram realizados (Medaglini *et al.*, 1997; Chatel *et al.*, 2001; Reveneau *et al.*, 2002). Nestes trabalhos, as BL funcionaram como vetores para a expressão e apresentação de antígenos modelos na superfície das mucosas. Em todos os casos as três espécies de BL foram capazes de estimular, em camundongos imunizados intranasal e oralmente, uma resposta imune de mucosas antígeno – específica.

Outros experimentos, visando utilizar as BL não só como apresentadoras de antígeno, mas também como adjuvantes de mucosa, foram realizados. Nestes, linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras tanto de antígenos modelos quanto de interleucina 2 e 6 (IL2 e IL6) foram capazes de potencializar em cerca de 10 à 15 vezes a resposta imune sistêmica antígeno – específica (Steidler *et al.*, 1998).

Enfim, para que estas “novas utilizações” das BL se tornem uma realidade, vários estudos vem sendo realizados, utilizando *Lactococcus lactis* como microrganismo modelo.

## ***L. lactis*, o modelo das bactérias lácticas**

### **I.2.1. Características gerais**

*L. lactis* é uma bactéria heterofermentativa facultativa e mesofílica (temperatura ideal de crescimento em torno de 30°C) cuja participação na indústria de laticínios é das mais relevantes. Hoje, *L. lactis* é a mais bem caracterizada integrante do grupo das BL e figura como o microrganismo modelo no estudo das mesmas, não só por sua importância econômica, mas também devido ao fato de: (i) ser um microrganismo de fácil manipulação, (ii) ser “GRAS”, (iii) ter o seu genoma completamente sequenciado (Bolotin *et al.*, 1999) e (iv) possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (de Vos 1999).

### **I.2.2. A genética de *L. lactis***

Os estudos genéticos já realizados com *L. lactis* se concentram basicamente em duas linhagens: *L. lactis* MG1363 (*L. lactis* subsp. *cremoris*) e *L. lactis* IL1403 (*L. lactis* subsp. *lactis*).

### **I.2.3. Os plasmídeos de *L. lactis***

Assim como os outros integrantes do grupo das BL, *L. lactis* possui um estilo de vida variado. A sua capacidade de crescer em ambientes como o leite em muito se deve à genes, presentes em plasmídeos, que codificam desde enzimas, essenciais para o metabolismo de açúcares e proteínas, até bacteriocinas e proteínas de reparo do DNA (Duwat *et al.*, 2000). A presença destes genes em um DNA extra cromossomal sugere que esta habilidade possa ter sido adquirida através da transferência horizontal entre espécies filogeneticamente próximas como *S. thermophilus* (Guedon *et al.*, 1995). Esta hipótese é em parte confirmada pela presença do gene *cluA* em *L. lactis* MG1363. A proteína codificada por este gene possui 1243 aminoácidos e apresenta homologia à proteínas de agregação já descritas em outras bactérias Gram-positiva como *Enterococcus* sp. e *Streptococcus* sp. (Godon *et al.*, 1994). As proteínas de agregação são responsáveis pelo processo de iniciação da conjugação bacteriana, onde ocorre o contato entre a célula doadora e a receptora.

### **I.2.4. O genoma de *L. lactis***

A análise da organização e a comparação de sequências genômicas das duas subespécies de *L. lactis* demonstraram que elas possuem cerca de 80% de identidade e que seus genomas apresentam grandes inversões (Le Bourgeois *et al.*, 1995). Estes estudos também demonstraram que o genoma de *L. lactis* MG1363 apresenta, ao contrário de *L. lactis* IL1403, genes de mobilização o que corrobora

com o fato desta espécie apresentar plasmídeos que permitem o crescimento em ambientes variados.

Recentemente sequenciado (Bolotin *et al.*, 2001), o genoma de *L. lactis* IL1403 possui 2,36 mega bases e 35,4% de bases G+C. Foram identificados 2310 genes dos quais 86% codificam proteínas, 1,4% codificam RNA e 12,6% são sequências não codificadoras. Foram ainda identificados 293 genes pertencentes à 6 profagos e 43 sequências de inserção (IS). O genoma de *L. lactis* possui ainda 4 operons contendo genes de competência; o que indica que esta bactéria, assim como *Bacillus subtilis* e *Streptococcus pyogenes*, é capaz de sofrer transformação natural de DNA.

Sendo assim, as novas informações geradas através do sequenciamento do genoma de *L. lactis* já estão auxiliando no desenvolvimento de novas linhagens bacterianas, na construção de sistemas de expressão para a produção de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico e poderão, em um futuro próximo, melhorar as atuais técnicas de uso como, por exemplo, a maturação de queijos.

## **I.2.5. O controle da expressão gênica de *L. lactis***

### ***I.2.5.1. A transcrição***

O início da transcrição gênica ocorre quando a subunidade sigma ( $\sigma$ ) da RNA polimerase reconhece uma região específica localizada sobre o DNA. Esta região, chamada “promotora” se localiza em uma região anterior à um gene ou operon e é caracterizada pela presença de 2 sequências de hexanucleotídeos localizadas à -35 (TTGACA) e -10 (TATAAT) pares de base do sítio de iniciação da transcrição. Após o reconhecimento dos hexanucleotídeos dá-se então o início da transcrição.

Em *L. lactis* uma série de promotores já foram descritos seja pela pesquisa sistemática (Kuipers *et al.*, 1997) ou pela análise de genes já identificados. Eles apresentam sequências -35 (TTGACA) e -10 (TATAAT) similares às encontradas em *Escherichia coli* e *B. subtilis* e um motivo TG (timina-guanina) localizado à 1 par de base anterior à sequência -10. O principal fator sigma de *L. lactis*,  $\sigma^{39}$ , é codificado pelo gene *rpoD* (Araya-Kojima *et al.*, 1995; Bolotin *et al.*, 2001) e

apresenta homologia aos fatores  $\sigma^{70}$  de *E. coli* e  $\sigma^A$  de *B. subtilis*. Com o sequenciamento do genoma de *L. lactis* IL1403, um segundo fator sigma foi identificado, contudo a descrição da sequência reconhecida e os prováveis genes que poderiam ser regulados pelo mesmo ainda não foram identificados (Bolotin *et al.*, 2001).

A transcrição termina na porção 3' dos genes e operons, onde uma sequência palindrômica de nucleotídeos rica em guanina e citosina (GC) e timina (T), chamada de “terminadores transcricionais”, sinaliza o fim do processo. A maioria dos genes e operons de *L. lactis* apresentam tais sequências.

### ***I.2.5.2. A tradução***

Em bactérias, uma vez começada a transcrição, dá-se também início ao processo de tradução. Em *L. lactis* os sinais do início da tradução são semelhantes aos já descritos em *E. coli* e *B. subtilis*. O sítio de fixação do ribossomo ou “RBS” está localizado na porção 5' do RNA mensageiro a ser traduzido e é complementar à sequência 3' do rRNA 16S (3' CUUCCUCC 5') de *L. lactis* (Chiaruttini and Millet 1993). Embora a maior parte dos códons de iniciação sejam AUG, outros códons como GUG foram observados (Van de Guchte *et al.*, 1992).

### ***I.2.6. Ferramentas genéticas para a produção de proteínas heterólogas em L. lactis***

Como mencionado anteriormente, a utilização de *L. lactis* como um “bioreator” para a produção de proteínas de interesse biotecnológico foi devido ao acúmulo, nos últimos 20 anos, de conhecimentos microbiológicos, fisiológicos e principalmente genéticos. Hoje, numerosas ferramentas genéticas foram desenvolvidas e algumas destas já vem sendo adaptadas para o uso em outras espécies de BL.

### ***1.2.6.1. Vetores de clonagem***

Os estudos baseados na identificação e isolamento de plasmídeos selvagens de *L. lactis* e outras BL possibilitaram o desenvolvimento de vários vetores de clonagem. Através de técnicas de biologia molecular estes plasmídeos foram manipulados de tal forma que hoje constituem importantes ferramentas para a clonagem e estudo de genes de interesse, tanto procariontes quanto eucariontes; e são constituídos basicamente de: (i) origem de replicação, (ii) marcador (gene) de resistência a antibiótico e (iii) sítio de clonagem múltipla.

Entre os vetores disponíveis, basicamente dois deles tem sido intensivamente utilizados: pAM $\beta$ 1 e pWV01 (Janni re *et al.*, 1993). O pAM $\beta$ 1 é um plasmídeo originário de *Enterococcus faecalis* cuja forma de replic o   em “teta” ( $\theta$ ). Atualmente, versões de alto e baixo número de cópias estão disponíveis como, por exemplo, os vetores pIL252 e pIL253, respectivamente (Simon and Chopin 1988). Já o pWV01 é um plasmídeo cuja replic o   do tipo “círculo rolante” originário de *L. lactis* subsp. *cremoris*. Ao contrário do pAM $\beta$ 1, o pWV01 apresenta um amplo espectro de hospedeiros que vão desde as BL até microrganismos Gram-negativo como *E. coli*. Ele possui também versões em alto e baixo número de cópias como os vetores pGK1 e pGK12, respectivamente (Kok *et al.*, 1984).

### ***1.2.6.2. Sistemas de expressão e enderecamento celular de proteínas heterólogas***

A expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis* foi induzida tanto pelo desenvolvimento do conhecimento genético quanto pelo desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Através deste dueto e a fim de obter níveis elevados destas proteínas e controlar a sua produc o, vários vetores contendo promotores constitutivos ou indutivos foram desenvolvidos e hoje constituem a base de todos os sistemas de expressão em *L. lactis* e outras BL.

Um dos primeiros sistema de expressão gênica para uso em *L. lactis* foi baseado no promotor ( $P_{lac}$ ) e no gene regulador (*lacR*) do operon *lac*. Este operon funciona de modo que o promotor  $P_{lac}$  é induzido (5 – 10 vezes) em presença de

lactose e a transcrição do gene regulador (*lacR*) é reprimida nas mesmas proporções (Van Rooijen *et al.*, 1992). Contudo, um maior nível de indução era necessário para que este sistema pudesse ser aplicado para a produção de proteínas de interesse. Assim um novo sistema, composto por três vetores, que combinava os elementos do operon *lac* mais elementos do bacteriófago T7 (fago T7) de *E. coli* foi desenvolvido (Wells *et al.*, 1993b). Neste novo sistema, o gene que codifica a RNA polimerase do fago T7 (T7 RNA pol) foi colocado sobre o controle do promotor  $P_{lac}$  no vetor pILPol e em um segundo vetor, uma proteína de interesse sob controle do promotor T7. Desta forma, esse sistema funcionava de tal forma que quando lactose era adicionada ao meio de cultura, o  $P_{lac}$  induzia a expressão da T7 RNA pol, a qual acionava a expressão do gene de interesse controlado pelo promotor T7. Contudo, para que a célula fosse capaz de metabolizar a lactose presente no meio, um terceiro vetor contendo o operon *lac*, era necessário. Este sistema foi primeiramente testado com o fragmento C da toxina tetânica (TTFC) e demonstrou-se capaz de produzir 22% do total de proteínas celulares. Camundongos imunizados com linhagens *L. lactis* produzindo a TTFC, através deste sistema, se mostram protegidos contra doses letais da toxina tetânica. Apesar de permitir o controle da expressão gênica e níveis elevados de produção, este sistema de expressão se tornou inviável devido ao fato de ser constituído de três vetores diferentes e três marcadores de resistência à antibióticos; inviabilizando também sua aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica.

Estudos sobre a regulação da expressão gênica de fagos comuns a *Lactococcus* sp. foram a base para o desenvolvimento de sistemas de expressão mais simples como o “sistema repressor-operador” do fago r1t de *L. lactis* (Nauta *et al.*, 1996). Neste sistema e em um mesmo vetor, um gene da proteína de interesse é colocado sob o controle do promotor fágico  $P_{orf5}$ , o qual é reprimido pela proteína fágica Rro. Quando adicionado ao meio o agente mutagênico mitomicina C, ocorre a quebra proteolítica da proteína repressora, Rro, e a conseqüente liberação do promotor  $P_{orf5}$ . Livre da repressão, o promotor induz a expressão do gene sob seu controle. Este sistema foi testado utilizando o gene repórter *lacZ* de *E. coli* e subseqüentemente utilizando o gene *acmA* (autolisina) de *Lactococcus* sp.. Contudo, o uso de mitomicina C como indutor impede o uso deste sistema para a produção de proteínas tanto em fermentadores quanto em produtos alimentícios.

Em um outro sistema, os elementos genéticos do fago  $\phi 31$  foram utilizados para desenvolver um sistema de expressão que combina o promotor  $P_{15A10}$  e a origem de replicação (*ori31*) (O'Sullivan *et al.*, 1996). Aqui, assim como nos demais sistemas, o gene de interesse, clonado sob o controle do  $P_{15A10}$ , e a *ori31*, estão em um mesmo vetor. Após o início da infecção pelo fago  $\phi 31$ , a *ori31* é alvo da maquinaria de replicação fágica e a quantidade de cópias do vetor dentro da célula é aumentada. Devido à esse aumento e devido à força do promotor  $P_{15A10}$ , o nível de expressão gênica também é aumentado. Após a lise celular causada pela replicação do fago, as moléculas da proteína em questão são liberadas no meio. A maior desvantagem desse sistema é necessidade da infecção celular para se obter a indução; o que leva à destruição da cultura celular, inviabilizando assim sua utilização industrial.

Um dos mais promissores e poderosos sistemas de expressão já desenvolvidos para o uso em BL é baseado em genes envolvidos na biossíntese e regulação do peptídeo antimicrobiano nisina.

A nisina é um pequeno peptídeo produzido e secretado por várias linhagens de *L. lactis* que devido à sua capacidade antimicrobiana, é amplamente utilizada como um conservante alimentício natural. Onze genes (*nisABTCIPRKFEF*) são responsáveis pela produção, modificação e secreção deste peptídeo. O gene *nisA* codifica o peptídeo precursor de 57 resíduos de aminoácidos, nisina A; *nisBC* estão envolvidos com modificações pós-traducionais; *nisT* é necessário para o transporte através da membrana citoplasmática, enquanto *nisP* está relacionado na quebra do precursor da nisina. O gene *nisI*, juntamente com os genes *nisFEF*, codificam uma lipoproteína que dá à linhagem produtora imunidade contra a própria nisina. Finalmente, *nisR* e *nisK* codificam os membros de um sistema regulador de dois componentes (NisRK) o qual controla a expressão dos 11 genes através da transdução de sinal. NisK funciona como um sensor de membrana que sente a presença extracelular da nisina. O sinal é subsequentemente transferido para NisR através de um processo de fosforilação que a torna ativa. NisR então é capaz de acionar a transcrição dos genes controlados pelos promotores  $P_{nisA}$  e  $P_{nisF}$  (Kuipers *et al.*, 1993).

Baseados nestas informações, vários sistemas de expressão gênica induzidos por nisina foram desenvolvidos. Uma variedade de vetores de expressão, contendo o promotor  $P_{nisA}$  seguido de sítios de clonagem múltipla (MCS) para a

inserção de genes de interesse estão disponíveis. Os sistemas podem ser explorados em linhagens contendo apenas os genes *nisR* e *nisK* no cromossomo e a concentração de nisina necessária para a indução de expressão gênica é mínima (0,01 – 10 ng/ml). Alternativamente, pode-se utilizar a linhagem NZ9700 de *L. lactis*, produtora de nisina, quando se deseja expressar, de forma constitutiva, uma determinada proteína de interesse (de Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers *et al.*, 1998).

Demonstrando toda a sua versatilidade, o sistema “NICE” foi testado em outras BL como *Leuconostoc lactis* e *Lactobacillus helveticus*. Como estas bactérias não possuem os genes *nisRK* em seu genoma, um sistema composto de dois vetores foi desenvolvido (Kleerebezem *et al.*, 1997); aonde, em um primeiro vetor, o promotor  $P_{nisA}$  está fusionado ao gene de interesse e em um segundo vetor, estão os genes *nisRK*. Posteriormente, este sistema foi ainda utilizado em outras bactérias como *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp. (Eichenbaum *et al.*, 1998) e *Lactobacillus plantarum* (Pavan *et al.*, 2000). Até então várias proteínas heterólogas já foram expressas utilizando-se este sistema que dentre todos já desenvolvidos é o de mais fácil, forte e segura utilização laboratorial.

Para que as BL servissem como “usinas celulares” para a produção de proteínas de interesse, uma série de estudos para desenvolver novas linhagens e eficientes sistemas de expressão foram realizados (Djordjevic and Klaenhammer 1998). Contudo, para que algumas das proteínas produzidas (enzimas e antígenos) por estas bactérias tivessem a atividade biológica desejada era preciso que após sua síntese, estas moléculas fossem corretamente endereçadas ao seu destino final: (i) citoplasma, (ii) membrana ou (iii) meio extracelular.

Em bactérias, o endereçamento das proteínas é realizado através de sequências ou motivos protéicos. Dentre estes, o peptídeo sinal (SP; *signal peptide*) é um motivo hidrofóbico, pouco conservado, carregado negativamente e localizado na porção amino-terminal (N-terminal) das proteínas naturalmente secretadas pela célula. Ele é reconhecido e clivado pela maquinaria de secreção que permite com que a proteína seja translocada através da membrana e liberada no meio extracelular. Outra sequência é o sinal de ancoramento (CWA; Cell Wall Anchor) que é composto por 30 aminoácidos e é localizado na porção carboxi-terminal (C-terminal) da proteína. O CWA apresenta um motivo conservado (LPXTG) que é reconhecido pela maquinaria de ancoramento. A proteína, translocada para fora da célula, fica covalentemente presa pelo motivo LPXTG ao peptídeoglicano. Embora

estes motivos e os mecanismos de secreção e ancoramento tenham sido primeiramente caracterizados em *B. subtilis* (Simonen and Palva 1993) e *Staphylococcus aureus* (Ton-That *et al.*, 1999), sistemas homólogos estão presentes em outras bactérias Gram-positiva como as BL (Fischetti *et al.*, 1990).

Sendo assim, alguns estudos visando um maior conhecimento e uma melhor caracterização dos fatores que participam e influenciam a secreção de proteínas homólogas e heterólogas nas BL foram realizados. Sabe-se hoje que em *L. lactis* poucas proteínas são secretadas e dentre estas encontra-se a Usp45. Esta proteína, cuja função é desconhecida, é a única proteína secretada em quantidades suficientes para ser detectada em géis de proteína corados com coomassie (Van Asseldonk *et al.*, 1990). Também é sabido que *L. lactis* é capaz de reconhecer motivos de secreção (SP) e ancoramento (CWA) de bactérias como *S. aureus* e *S. pyogenes* (Le Loir *et al.*, 1994; Piard *et al.*, 1997). Baseados nestes conhecimentos e nos sistemas de expressão já existentes vários “sistemas de endereçamento celular de proteínas heterólogas” foram construídos.

Um dos primeiros sistemas de expressão e endereçamento de proteínas heterólogas, construído em *L. lactis*, foi baseado no sistema T7 RNA pol. Neste sistema, o promotor T7 foi fusionado ao fragmento de DNA que codifica o peptídeo sinal da proteína Usp45 ( $SP_{Usp45}$ ) e em seguida o gene da TTFC. Após a indução do sistema, a fusão transcricional ( $sp_{Usp45}:TTFC$ ) foi eficientemente traduzida e a proteína TTFC foi secretada para o meio extracelular em quantidades significativas (2,9 mg/L) (Wells *et al.*, 1993a).

Um segundo sistema de expressão e endereçamento de proteínas mais simples e eficiente foi desenvolvido (Dieye *et al.*, 2001), utilizando elementos como o promotor constitutivo  $P_{59}$  (*Streptococcus cremoris*; Van der Vossen *et al.*, 1987), o  $SP_{Usp45}$  e o motivo de ancoramento CWA da proteína M6 de *S. pyogenes*. Este sistema permitiu que a proteína modelo Nuc (nuclease de *S. aureus*; Shortle 1983) fosse direcionada para o citoplasma, membrana e meio extracelular. Para a produção citoplasmática, a porção 5' do gene *nuc* foi apenas fusionado ao promotor  $P_{59}$ . Para ancorar Nuc à membrana, a porção 5' e 3' de *nuc* foram respectivamente fusionadas ao  $sp_{Usp45}$  e  $cwa_{M6}$ , e finalmente para que Nuc pudesse ser exportado para o meio extracelular, apenas uma fusão transcricional do  $sp_{Usp45}$  e *nuc* foi necessária. Embora este sistema tenha possibilitado o endereçamento de Nuc para três compartimentos celulares diferentes e tenha sido testado com sucesso em

linhagens de *L. lactis* subespécie *cremoris* e *Lactobacillus plantarum*, os níveis de produção protéica foram baixos (2,5 - 3 mg/L) devido tanto ao baixo número de cópias dos vetores, quanto à ação da protease extracelular, HtrA (Poquet *et al.*, 2000).

Por fim, um terceiro sistema objetivando não só o endereçamento de proteínas heterólogas para o exterior da célula, mas também o controle e um maior nível de expressão gênica das mesmas, foi construído (Le Loir *et al.*, 2001). Em um estudo anterior (Le Loir *et al.*, 1998), foi demonstrado que a eficiência de secreção da proteína Nuc, por *L. lactis*, era baixa (3 mg/L) provavelmente devido às cargas positivas (+3) de seu próprio peptídeo sinal. Com objetivo de se modificar essa carga, construiu-se então um propeptídeo sintético, o LEISSTCDA, cuja carga era negativa (-2). Quando fusionado à porção N-terminal de Nuc, esse propeptídeo foi capaz de aumentar em 5 vezes a eficiência de secreção de Nuc (15 mg/L). Em um segundo estágio, para se aumentar os níveis de expressão gênica, a sequência codificadora do peptídeo sinal da Usp45 (*sp*<sub>Usp45</sub>) juntamente como o gene *nuc* foram clonados em vetores de alto número de cópias, sob o controle do promotor  $P_{nisA}$ . Em seguida, para que Nuc fosse eficientemente reconhecido pela maquinaria de secreção da célula, a sequência codificadora do propeptídeo sintético, LEISSTCDA, foi clonada entre o *sp*<sub>Usp45</sub> e a porção 5' de *nuc* ( $P_{nisA}::sp_{Usp45}::LEISSTCDA::nuc$ ); o que resultou em elevados níveis de Nuc no meio extracelular (25 mg/L). Atualmente, este sistema vem sendo utilizado com sucesso para expressar e endereçar uma variedade de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico e figura hoje como uma das melhores ferramentas genéticas já desenvolvidas (Nouaille *et al.*, 2003; Le Loir *et al.*, 2005).

Em 2004, Miyoshi e cols. desenvolveram um novo sistema de expressão gênica e endereçamento protéico para *L. lactis*. O sistema, denominado XIES (*Xylose-Inducible Expression System*) que combina o promotor  $P_{xyIT}$ , elementos genéticos (RBS e SP) da proteína Usp45 de *L. lactis* e o gene repórter *nuc* de *S. aureus*, foi utilizado com sucesso na linhagem vegetal de *L. lactis* NCDO2118 (*L. lactis* subsp. *lactis*) demonstrando ser capaz de: (i) produzir, na presença de xilose, elevados níveis da proteína modelo Nuc de *S. aureus*, comparáveis apenas aos níveis até hoje obtidos utilizando-se o sistema NICE; (ii) corretamente endereçar o produto final para o citoplasma ou meio extracelular; e (iii) diferentemente de todos os sistemas até hoje desenvolvidos, permitir “ligar ou desligar” a expressão gênica

pela simples adição de xilose ou glicose, respectivamente. O sistema apresenta ainda certas vantagens em relação aos demais sistemas de expressão, como por exemplo, ser de mais fácil manipulação, ser menos dispendioso e principalmente, ser mais seguro, para uso humano e animal, visto que o mesmo é induzido por um açúcar.

Enfim, *L. lactis* se destaca como um microrganismo alternativo para a produção de moléculas de interesse biotecnológico, em relação ao uso de modelos como *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. Atualmente, inúmeras proteínas de origem eucariótica, bacteriana e viral já foram produzidas utilizando *L. lactis* como sistema de expressão (Nouaillel *et al.*, 2003; Le Loir *et al.*, 2005).

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa têm vislumbrado a implementação de novas estratégias de produção de proteínas heterólogas dentro de alimentos, de forma segura e econômica, mediada por *L. lactis*, como por exemplo, a produção da Quimosina bovina recombinante, uma enzima de grande importância na indústria queijeira, responsável pela coagulação do leite, que ocupa até 80% do mercado mundial de coagulantes.

## **I.3. Quimosina**

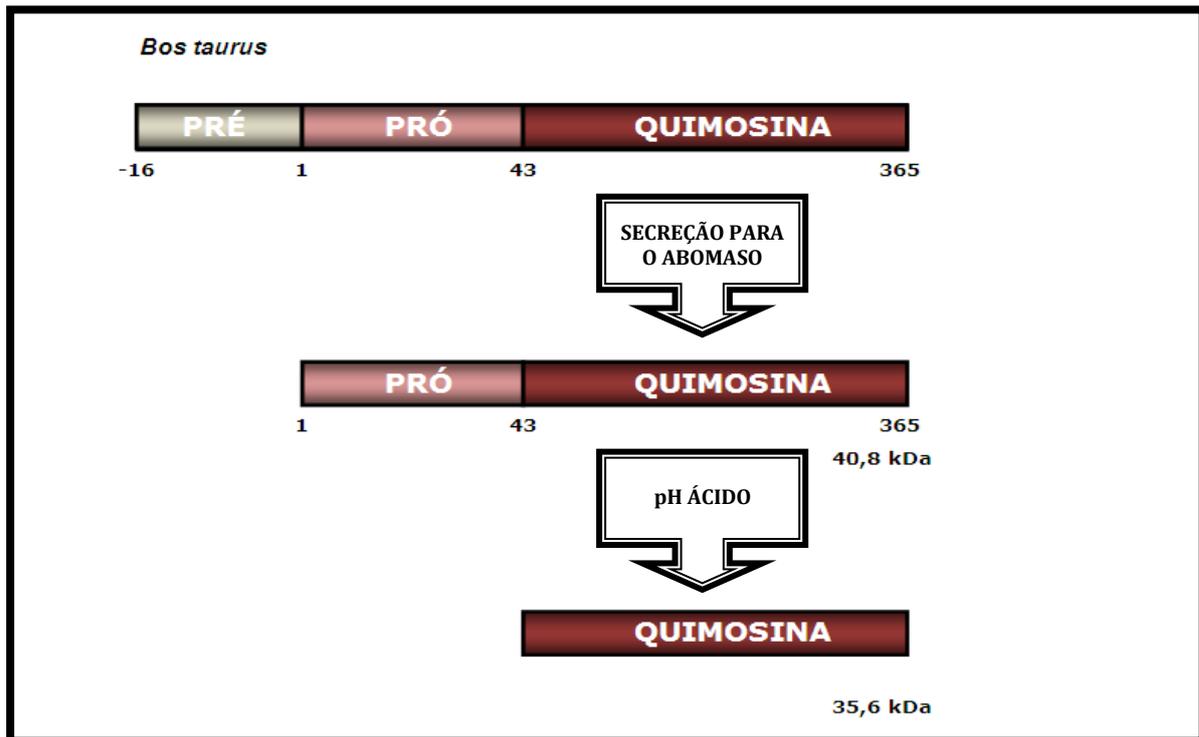
### **I.3.1. Introdução**

A Quimosina bovina é a principal enzima responsável pela coagulação do leite no estômago de bezerros recém-nascidos. Ela pertence ao grupo das aspartil proteases e vem sendo utilizada na indústria alimentícia como agente coagulador do leite no processo de fabricação do queijo (Harris *et al.*, 1982; Hidaka *et al.*, 1986; Vega-Hernández, 2004). O principal inconveniente da aplicabilidade da Quimosina bovina – no caso da fabricação de queijos – está relacionado aos processos de obtenção da molécula: (i) o isolamento da enzima diretamente do estômago de bezerros, e (ii) a purificação da mesma; o que pode ser dificultoso e oneroso.

Frente a estes inconvenientes, iniciou-se uma busca por fontes alternativas visando à substituição da Quimosina bovina por quimosinas produzidas por outros organismos.

### I.3.2. Origem

A Quimosina começa a ser produzida no estômago dos ruminantes enquanto estes ainda estão no útero durante a gestação (Fox *et al.*, 2004). A molécula é sintetizada, *in vivo*, pelas células mucosas da quarta câmara estomacal (abomaso), sendo produzida primeiramente como uma pró-enzima fusionada a um peptídeo sinal, a Pré-pró-quimosina, uma proteína de 381 resíduos de aminoácidos. A região chamada “pré” consiste em 16 aminoácidos hidrofóbicos responsáveis por direcionar a proteína para a exportação. Sendo lançada a luz do estômago em sua forma inativa, a Pró-quimosina (40,8 kDa), converte-se em Quimosina (Figura 1) devido as condições ácidas do estômago, que é responsável pela perda de 42 resíduos de aminoácidos da região N-terminal. A Quimosina apresenta 322 aminoácidos, 35,6 kDa, e é resultado da atividade autocatalítica da Pró-quimosina em pH em torno de 5. Quando o pH está próximo a 2, o produto gerado é a Pseudoquimosina (337 aminoácidos). Tanto a Quimosina quanto a Pseudoquimosina são capazes de coagular o leite (Emtage *et al.*, 1983; Foltman *et al.*, 1979; Mohanty *et al.*, 1999; Pedersen *et al.*, 1979; Vega-Hernández *et al.*, 2004).



**Figura 1** – Representação esquemática da síntese, *in vivo*, da Quimosina bovina. A enzima é produzida pelas células estomacais na forma Pré-pró-quimosina, uma pró-enzima contendo um peptídeo sinal que é clivado quando a mesma é secretada no abomaso. Na condição ácida do estômago, a Pró-quimosina perde 42 resíduos de aminoácidos da região N-terminal convertendo-se a sua forma ativa, Quimosina.

### I.3.3. Isoenzimas de Quimosina

Quatro formas da (pró-) Quimosina bovina já foram descritas na literatura: A, B, C e D.

As Quimosinas A e B são as formas mais importantes e melhores caracterizadas da Quimosina bovina. Representam variações alélicas de um único locus gênico (Donnelly *et al.*, 1986) composto por 9 éxons separados por 8 introns (Hidaka *et al.*, 1986), diferindo-se apenas por um resíduo de aminoácido na posição 244, onde a Quimosina A apresenta um Ácido Aspártico (Asp) enquanto a Quimosina B possui uma Glicina (Gly) nesta posição. Esta diferença é responsável por uma maior afinidade da Quimosina A pela Kappa-caseína ( $\kappa$ -caseína), por gerar uma estabilização eletrostática adicional do complexo Quimosina- $\kappa$ -caseína. Porém, a Quimosina B ocorre em maior abundância e apresenta-se mais estável em um pH

baixo (ou ambiente ácido) (Donnelly *et al.*, 1984; Foltmann *et al.*, 1979; Foltmann, 1992; Fox *et al.*, 2004; Rampilli *et al.*, 2005).

Estudos preliminares sobre a Quimosina C sugeriram que esta se originava da degradação autolítica da Quimosina A (Danley and Geoghegan, 1988; Foltmann, 1964; Foltmann *et al.*, 1977). No entanto, Rampilli e cols. (2005), analisando as isoenzimas da Quimosina presentes no estômago de bovinos pela técnica de HPLC (*high performance liquid chromatography*) conseguiram diferenciar a variante C do produto de degradação da Quimosina A, sugeriram que a Quimosina A e C são dois alelos distintos.

A quarta forma, a (pró-) Quimosina D (Asato and Rand, 1972, 1977), não foi totalmente caracterizada de modo que não ficou comprovado que se trata de outro alelo diferente das outras já descritas (Rampilli *et al.*, 2005).

#### **I.3.4. Características bioquímicas**

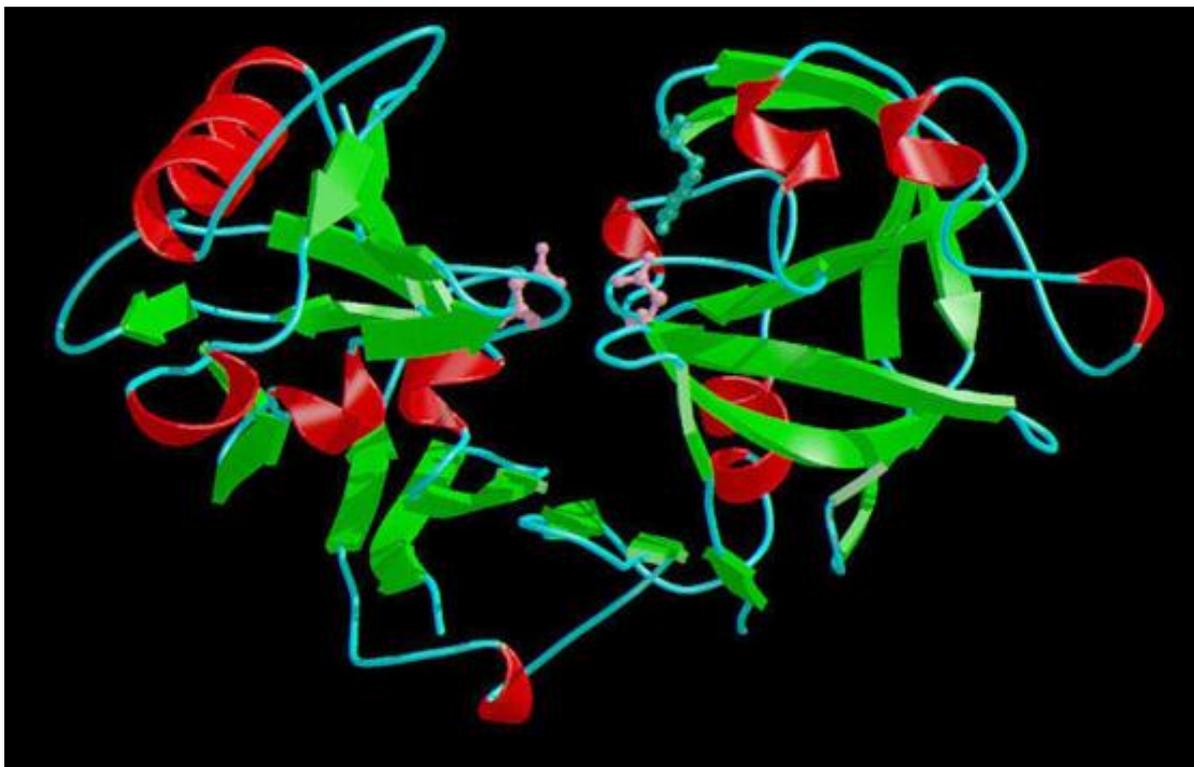
A Quimosina, também chamada renina, é classificada pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* como uma aspartil endopeptidase sob a identificação EC 3.4.23.4 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>).

A proteína possui uma cadeia peptídica única com baixo conteúdo de resíduos básicos e rico em resíduos de aminoácidos dicarboxílicos e  $\beta$ -hidroxi (Foltmann *et al.*, 1977, Foltmann *et al.*, 1979; Harris *et al.*, 1982; Moir *et al.*, 1982; Hidaka *et al.*, 1986).

A estrutura secundária da Quimosina consiste principalmente em conformações  $\beta$ -sheet e poucos segmentos  $\alpha$ -hélice (Fox *et al.*, 2004). Já sua estrutura terciária esta organizada em dois lobos (Figura 2) de dobramentos similares que estão separados por um sulco profundo (Foltmann *et al.*, 1979; Tang *et al.*, 1978). Esta estrutura bilobada mantém-se estável devido à presença de uma rede de pontes de hidrogênios presente nos aminoácidos Thr33, Ser35, Thr216, Thr218, Gly217, Gly34 e três pontes de dissulfeto (Mohanty *et al.*, 1999).

O sítio catalítico é composto principalmente por dois resíduos de ácido aspártico que se encontra entre os dois lobos onde estes apresentam sequencia Asp-Thr-Gly-Thr em posições topologicamente equivalente, de modo que cada lobo

contribui com um resíduo de ácido aspártico (Asp92 e Asp274) para a formação do sítio catalítico (Groves *et al.*, 1998; Mantafouins and Pitts, 1990).



**Figura 2** – Modelo computacional da estrutura terciária da Quimosina bovina de *Bos taurus*. As conformações  $\beta$ -sheet (representadas em verde),  $\alpha$ -hélice (em vermelho), e o sítio catalítico (Asp92 e Asp274; em rosa).

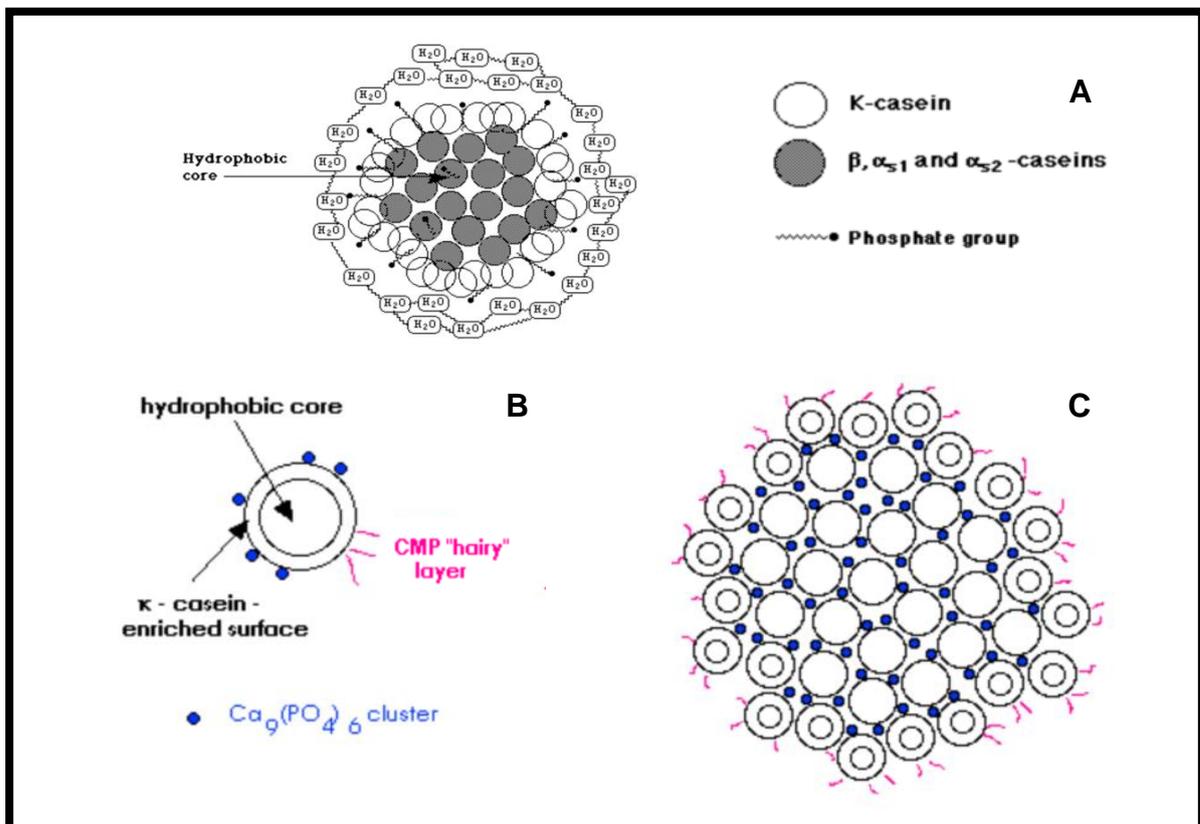
Fonte: <http://merops.sanger.ac.uk/>, sob o número de acesso A01.006.

### I.3.5. Mecanismo de atuação Quimosina na coagulação do leite

O processo de coagulação ocorre pela precipitação das fosfoproteínas do leite, também chamadas de caseínas, o que corresponde a cerca de 80% das proteínas totais do leite bovino. Destas, 46% são do tipo  $\alpha$  ( $\alpha_{s1}$  e  $\alpha_{s2}$ ), 34% do tipo  $\beta$ , 7% do tipo  $\gamma$  (peptídeos resultantes da proteólise das outras caseínas) e 13% são de caseína tipo  $\kappa$  (Alonso, 2001).

As caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  e  $\beta$  possuem alto grau de fosforilação (14, 10 e 8 grupos fosfatos, respectivamente), e as cargas negativas encontram-se distribuídas de maneira desigual pela molécula gerando diferentes graus de hidrofobicidade. A aglomeração destas cargas confere a estas caseínas a capacidade de ligar-se ao cálcio e, conseqüentemente, precipitá-la (Eck, 1987; Fiat and Jolles, 1989).

Já a  $\kappa$ -caseína, que contém apenas um grupo fosfato, não se precipita mesmo em altas concentrações de cálcio. Como esta caseína possui uma cadeia peptídica cuja estrutura primária apresenta duas regiões [(i) uma que possui um caráter básico e hidrofóbico (N-terminal); (ii) e outra ácida e hidrofílica (C-terminal)], sua região hidrofóbica uni-se às caseínas  $\alpha$  e  $\beta$ , enquanto que a região hidrofílica fica exposta à água, comportando-se como um colóide protetor, formando um complexo estável e solúvel (Eck, 1987; Mahaut *et al.*, 2000; Chitpinyol and Crabbe, 1998). Estas unidades são chamadas de submicelas que ligadas, por pontes de fosfato coloidal ( $\text{CaPO}_4$ ), às outras submicelas formam a micela de caseína (Figura 3). Sendo nesta forma, coloidal, que a maioria das caseínas (>95%) encontra-se no leite (Foltman, 1987; Fox, 1988).



**Figura 3** – Representação esquemática da organização das micelas de caseína. A: Submicela de caseína. B: Desenho que demonstra a disposição da polaridade das submicelas. C: Micela de caseína.

Quando o bezerro alimenta-se do leite, a Quimosina reconhece a  $\kappa$ -caseína, e cliva a ligação existente entre os resíduos de Fenilalanina (105) e Metionina (106) (Mathur and Dutta, 1983). Assim o domínio hidrofóbico (1-105) e o hidrofílico (106-

169) são separados gerando como produtos: a *Para-κ-caseína* (*p-κ-caseína*) e o macropeptídeo, respectivamente.

Em presença de cálcio, a *p-κ-caseína* precipita-se juntamente com as caseínas sensíveis a este íon. Formando uma solução semi-sólida no estômago desses animais, e permitindo assim, a digestão das proteínas devido a sua permanência no mesmo por um período de tempo maior (Fox and McSweeney, 1999).

No processo de coagulação do leite, para a produção de queijo, podemos entender o resultado da coagulação da seguinte forma: a gordura e a água do leite são incorporadas a esta massa formando o coagulo, enquanto que o macropeptídeo é liberado com o soro.

### **I.3.6. Obtenção da Quimosina para uso comercial**

Como a secreção da Quimosina é intensa no início da vida desses animais e, no decorrer do seu crescimento, substituída pela pepsina (Figarty and Kelly, 1990), sua obtenção foi inicialmente realizada através da extração de enzimas gástricas de bezerros.

Para isso dois métodos podem ser utilizados: o tradicional ou o moderno. O método tradicional consiste na secagem e limpeza do estômago do bezerro que é picado em pequenos pedaços, e então, submerso em uma salmora, ou soro de leite, juntamente com um pouco de vinagre ou vinho para baixar o pH da mistura. Depois de certo tempo, que pode variar de uma noite até vários dias, a mistura é filtrada e pode ser adicionada diretamente ao leite para realizar a coagulação. Já o método moderno utiliza estômagos congelados e moídos que são adicionados a uma solução de extração de enzimas. O extrato bruto é, então, ativado pela adição de ácido, neutralização e diversas filtrações, seguidas de concentração (Carroll, 2003).

O produto extraído do abomaso destes animais é chamado de “coalho” e, quando obtido de animais jovens, é composto por 85-95% de Quimosina e 5-15% de pepsina. A demanda por estômagos de bezerro para a extração de coalho é muito elevada, o que se torna um fator que dificulta a produção, devido não só ao alto custo, mas também à escassez da matéria-prima (Ustunol and Hicks, 1990).

A falta de coalho de origem bovina entre os anos de 1962 e 1972, gerada pelo aumento da demanda de carne, despertou o interesse da indústria em buscar coagulantes de fontes alternativas (Ustunol and Hicks, 1990).

### ***1.3.6.1. Coagulantes alternativos***

A pepsina de origem bovina, porcina e de frango foram avaliadas quanto sua capacidade de coagulação do leite, e embora apresentem esta capacidade, estas são menos específicas em clivar a  $\kappa$ -caseína que a Quimosina e acabam por hidrolisar excessivamente outras frações de caseína, principalmente a  $\beta$ -caseína, promovendo um acúmulo de peptídeos de baixo peso molecular com alto grau de hidrofobicidade, que são degradados durante a maturação do queijo e estão diretamente relacionados com o aparecimento do sabor amargo (Desmazeaud and Gripon, 1977; Fox, 1988; Guigoz and Solms, 1976; Lemieux and Simard, 1991; Stadhouders and Hup, 1975; Steele and Unlu, 1992), além disso foi observado a formação de um coágulo pouco consistente e de baixo rendimento (Marth and Steele, 2001; Van den Berg, 1992).

Determinadas plantas como *Galium verum*, *Urtica dioica*, e *Cynara cardunculus* possuem proteases capazes de coagular o leite, também denominadas de “coalho vegetal”. Estas têm sido utilizadas para a produção de queijos tradicionais, no entanto sua produção fica restrita a região de ocorrência (Vallejo *et al.*, 2008).

Diversos microrganismos também são capazes de sintetizar enzimas coagulantes, com destaque para os de origem fúngica (*Mucor pusillus*, *Mucor meihei*, *Endothica parasítica*, *Aspergillus oryzae* e *Irpex*), que são utilizados pela indústria queijeira. No entanto, coagulantes microbianos apresentaram algumas desvantagens, como: (i) uma taxa de proteólise maior que a desejada (embora menor que as obtidas pelas pepsinas); (ii) uma alta estabilidade térmica, aumentando sua atividade proteolítica durante o tratamento térmico do leite; o que por fim, gera a necessidade de alteração no processo de produção do queijo (Emmons and Binns, 1991).

É possível, ainda, promover a coagulação do leite sem a adição de qualquer enzima, através da coagulação ácida. Esta coagulação ocorre pela redução do pH

do leite (naturalmente em torno de 6,6) até o ponto isoelétrico das caseínas, pH 4,6. Quando íons de hidrogênio são adicionados ao leite (acidificação), eles são adsorvidos pelas moléculas de proteína. Em pH 4,6 as caseínas apresentam a mesma quantidade de cargas positivas e negativas e se aglomeram pela anulação das cargas entre as moléculas, formando uma estrutura com peso molecular maior que leva à formação do precipitado (queijo). A redução do pH pode ser obtido pela adição de bactérias lácteas ou pela aplicação direta de um ácido, como por exemplo, o ácido cítrico e o ácido acético. (Aquarone *et al.*, 2001; Veisseyre, 1998).

A coagulação ácida é utilizada na fabricação de alguns tipos de queijo como o Cottage, Requeijão e Quarg. No entanto, o coágulo resultante é frágil, pouco contrátil e de difícil desidratação, além de apresentar um menor rendimento do processo de fabricação de queijo quando comparado com a coagulação enzimática (Aquarone *et al.*, 2001; Veisseyre, 1998). Já o coágulo obtido pela coagulação enzimática possui características de grande importância para o trabalho e a evolução posterior do coágulo como flexibilidade, elasticidade, compactação, impermeabilidade e contratibilidade (Veisseyre, 1998).

Em suma, a Quimosina bovina continua sendo o coagulante mais apreciado pela indústria alimentícia para a fabricação de queijo devido a sua alta especificidade em clivar a  $\kappa$ -caseína. Sua baixa atividade frente a outras caseínas e proteínas do soro resulta em uma taxa ideal de proteólise, e gera um rendimento ótimo da coalhada para a produção de queijos de superior qualidade (Marth and Steele, 2001; Ustunol and Hicks, 1990).

### ***1.3.6.2. Quimosina recombinante***

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, vários grupos de pesquisa passaram a clonar e expressar o gene que codifica a Quimosina bovina em microrganismos (Beppu, 1991; Emtage *et al.*, 1983; Harris *et al.*, 1982; Parente *et al.*, 1990; Teuber, 1990; Vega-Hernández *et al.*, 2004; Yu, 1994).

Em 1980, Uchiyama e cols., purificaram pela primeira vez o mRNA das células do abomaso de bezerros. Posteriormente, o cDNA da *pró-quimosina* foi obtido e clonado no vetor pBR322 (Moir *et al.*, 1982). Em 1982, o cDNA da *pré-pró-quimosina* e da *quimosina* foram seqüenciados. McGuire (1986) observou que a

seqüência do cDNA publicada por seis grupos apresentavam diferença na posição de 22 nucleotídeos, resultando em variações de aminoácidos. Assim, esforços foram empregados para a clonagem e caracterização do cDNA da *pró-quimosina*. Sendo, então, clonada e expressa pela primeira vez em *E. coli* (Nishimori *et al.*, 1982).

Desde então diversas formas de Quimosina foram produzidas em *E. coli*, como Pré-pró-quimosina, met-Pró-quimosina (proteína iniciada por uma metionina não pertencente a composição original da molécula) e met-Quimosina (Mohanty *et al.*, 1999).

As diferentes versões da *quimosina* foram clonadas em plasmídeos com características distintas (promotor, RBS, ATG, fusão protéica), sendo que algumas destas construções se destacaram por aumentar a produção da proteína heteróloga. No entanto, *E. coli* produz a Pró-quimosina recombinante na forma de corpos de inclusão, agregado protéico biologicamente inativos resultantes do enovelamento incorreto das cadeias polipeptídicas recém sintetizadas. Característica que torna o processo de obtenção da proteína dispendioso, uma vez que requer a solubilização deste agregado insolúvel em uréia antes da purificação por cromatografia de troca iônica, seguida por diálise e acificação para conversão do precursor protéico na Quimosina ativa (Chisti, 1998; Nishimori *et al.*, 1982; Emtage *et al.*, 1983; Marston *et al.*, 1985).

Estudos demonstraram que nem mesmo a deleção de mais de 70% da seqüência da *pró-quimosina* alterava significativamente o acúmulo da proteína nesse tipo de agregado (McCaman, 1989).

Desde a construção da linhagem de *E. coli*, produtora de Quimosina bovina, numerosos grupos de pesquisa seguiram os mesmos passos, porém usando outros microrganismos para a obtenção da proteína recombinante.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o cDNA da *pró-quimosina* foi clonado fusionado ao peptídeo sinal da invertase, uma enzima exportada, responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose, nesta levedura, o que resultou em uma secreção de 10% da Pró-quimosina produzida. Já como *pré-pró-quimosina*, *pró-quimosina* e *quimosina* foi expressa sob o promotor constitutivo da fosfoglicerato kinase (pGK), representando aproximadamente 5% do total das proteínas da levedura (Goff *et al.*, 1984; Mellor *et al.*, 1983; Moir *et al.*, 1984).

A *pró-quimosina* foi expressa também em *Proteus mirabilis* fusionada a exotoxina pirogênica de estreptococos tipo A (Sep-A) com o promotor, RBS e

peptideo sinal da Sep-A. A Pró-quimosina bovina foi secretada para o meio extracelular, onde foi convertida em sua forma ativa pelo processo autocatalítico, sendo capaz de coagular o leite (Klessen *et al.*, 1989).

A linhagem recombinante de *Aspergillus niger* var. *awamori* produtora de Quimosina desenvolvida por Dunn-Coleman e cols. (1991) atingiu a produção de 1g.L<sup>-1</sup>.

Parente e cols. (1991) construíram linhagens de *B. subtilis* produtoras da Pró-quimosina; para isso utilizaram dois tipos de plasmídeos: um para produção da enzima na forma secretada e outro para produção na forma intracelular. No entanto, a Pró-quimosina produzida pela linhagem com produção intracelular, encontrava-se acumulada em uma forma insolúvel, como os corpos de inclusão observados na produção em *E. coli*. A Pró-quimosina com endereçamento extracelular foi secretada em baixas quantidades.

Em *Kluyveromyces lactis* a ORF da *pró-quimosina* foi inserida em seu genoma sob o controle do promotor da lactase, o LAC4, um promotor forte e induzível. O precursor produzido foi capaz de converter-se autocataliticamente na sua forma ativa, a Quimosina (Van-den-Berg *et al.*, 1990).

A literatura também descreve a produção de Quimosina por células epiteliais humanas (Kolmer *et al.*, 1991) e pelas glândulas mamárias de coelhos transgênicos (Brem *et al.*, 1995).

Segundo o *Food and Drug Administration* (FDA), a Quimosina bovina recombinante não apresenta diferença daquelas produzidas pelos bezerros, sendo que a proteína heteróloga possui a vantagem de ser obtida com maior grau de pureza que as extraídas do abomaso dos bovinos devido à presença de outras enzimas gástricas. Porém ainda poucas empresas como a Pfizer (Chr-Hansen; *E. coli* K12 – Pró-quimosina A), Genencor International (Chr-Hansen; *Aspergillus niger* var. *awamori* – Pró-quimosina B) e Royal Gist-Brocades (*Kluyveromyces lactis* – Pró-quimosina B) produzem e comercializam Quimosinas recombinantes (Halfhide, 1992; Harboe, 1992; De Leeuw and Swinkels, 1993; Lynch, 1994; Praaning-Van Dalen, 1992; <http://www.fda.gov/>).

A Quimosina recombinante chega ao mercado com um valor 40-50% menor que a Quimosina obtida a partir de bezerros. De acordo com o *U.S. Department of State* (<http://fpc.state.gov/6176.htm>), em 1999, mais de 60% dos queijos “firmes” foram produzidos utilizando Quimosina produzida por engenharia genética. Em

2006, a Quimosina recombinante já ocupava mais de 80% do mercado mundial de coagulantes (Jonhoson and Lucey, 2006) e dois anos depois a Quimosina recombinante já era utilizada em aproximadamente 90% dos queijos produzidos nos Estados Unidos e na Grã Bretanha.

# **II**

## **JUSTIFICATIVA**

## II. JUSTIFICATIVA

Durante o processo de produção de queijo as proteínas do leite são precipitadas para a formação do coágulo devido à atividade proteolítica do coagulante acrescido ao leite. A Quimosina, a enzima mais abundante no estômago de bezerros recém-nascidos, tem sido tradicionalmente utilizada para isso (Figarty and Kelly, 1990; Harris *et al.*, 1982; Hidaka *et al.*, 1986; Vega-Hernández, 2004).

Com a redução do número de bezerros disponíveis para o abate e a alta demanda de coagulante gerada pelo constante crescimento da produção de queijo mundial, fontes alternativas de coagulantes foram buscadas (Ustunol and Hicks, 1990).

Nesse contexto, diversos microrganismos geneticamente modificados produtores de Quimosina bovina foram construídos. Embora a Quimosina recombinante apresentasse maior grau de pureza que a Quimosina obtida a partir de bezerros, poucas construções apresentaram características que permitissem um escalonamento de sua tecnologia para a indústria (Beppu, 1991; Emtage *et al.*, 1983; Harris *et al.*, 1982; Mohanty *et al.*, 1999; Parente *et al.*, 1990; Teuber, 1990; Vega-Hernández *et al.*, 2004; Yu, 1994).

*L. lactis*, a BL mais bem caracterizada e organismo modelo no estudo das mesmas; pode ser considerado um bom candidato para a produção de proteínas heterólogas, devido ao fato de: (i) ser um microrganismo de fácil manipulação; (ii) ser “GRAS”; (iii) ter sido a primeira BL cujo genoma foi seqüenciado (Bolotin *et al.*, 2001) e possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (De Vos and Simons, 1994; Duwat *et al.*, 2000; Bolotin *et al.*, 2001), (iv) possuir sistemas de expressão com diferentes endereçamentos protéicos (citoplasma, meio extracelular e ancoramento junto a parede celular), (v) por ser um microrganismo que não produz endotoxinas ou mesmo qualquer produto metabólico tóxico (Bolotin *et al.*, 2001) e (vi) apresentar poucas proteínas naturalmente secretadas (Van Asseldonk *et al.*, 1990).

O desenvolvimento de um sistema de expressão contendo o promotor da xilose permease, *PxyIT* (XIES - *Xylose-Inducible Expression System*), ou seja, um sistema de expressão induzido por açúcar, torna a produção de proteína heterólogas

menos dispendiosa e, principalmente, mais segura, característica importante para a produção de moléculas destinadas a produção de alimentos (Miyoshi *et al.*, 2009).

A capacidade do sistema XIES em endereçar a proteína para o meio extracelular, juntamente com o fato de *L. lactis* não secretar quantidade considerável de proteínas endógenas, podem constituir uma interessante alternativa para a obtenção da Quimosina bovina. Pois, conforme descrito na literatura e utilizado industrialmente, proteínas heterólogas produzidas sob estas condições podem ser recuperadas pela simples separação destas moléculas das células produtoras, por centrifugação ou filtração, sem a necessidade de passos posteriores de purificação (Van Dijck, 1999).

Como diversas linhagens de *L. lactis* têm sido amplamente utilizadas pela indústria queijeira como “culturas starters”, ou culturas iniciadoras, que são adicionadas ao leite para reduzir o pH do mesmo, pela conversão da lactose em ácido láctico. E assim, o leite acidificado gera instabilidade nas micelas de caseína tornando as ligações peptídicas mais suscetíveis a clivagem pelo coagulante (Aquarone *et al.*, 2001; Nicolau, 2008).

Ou seja, durante o processo de fabricação de queijo, a Quimosina (coagulante) é adicionada ao leite logo após este ser inoculado com *L. lactis* (culturas lácticas), de modo que o desenvolvimento de um fermento láctico produtor de Quimosina bovina mostra-se como alternativa interessante, no que diz respeito à redução do processo *downstream* de obtenção do coagulante (Sheehan *et al.*, 2006).

Neste caso, a Quimosina bovina produzida por *L. lactis* poderia ser tanto secretada como retida no citoplasma, duas opções de endereçamento disponíveis pelo sistema XIES de expressão.

Tendo isso em vista, o objetivo do presente trabalho foi o de desenvolver um novo processo de produção e obtenção microbiológica da Quimosina bovina baseado na utilização de linhagens recombinantes de *L. lactis*.

**III**  
**ESTRATÉGIA 1**

### III. ESTRATÉGIA 1

#### **Construção de Linhagens de *L. lactis* Produtoras da Forma Citoplasmática e Secretada da Pró-quimosina bovina B**

Esta primeira estratégia descreve a utilização da seqüência codificadora da Pró-quimosina bovina B para a construção de linhagens recombinantes de *L. lactis*. A *pró-quimosina bovina B* foi utilizada pela grande maioria dos trabalhos descritos na literatura para construção de microrganismos geneticamente modificados produtores de Quimosina bovina.

A proteína heteróloga foi produzida por *L. lactis* com dois endereçamentos: citoplasmático e secretado.

Nesta estratégia, as proteínas produzidas foram, ainda, submetidas à avaliação quanto a sua atividade proteolítica.

## III.1. Objetivos

### III.1.1. Objetivo Geral

Desenvolver um novo processo de produção e obtenção microbiológica da Quimosina bovina baseado na utilização de linhagens recombinantes de *L. lactis*.

### III.1.2. Objetivos Específicos

1. Confeccionar a ORF (*open reading frame*) sintética codificadora da Pró-quimosina bovina B, modificada para códons preferenciais de *L. lactis*.
2. Clonar a ORF modificada nos vetores de expressão pXyIT:CYT (endereçamento citoplasmático) e pXyIT:SEC (endereçamento extracelular), do sistema XIES (*Xylose-Inducible-Expression-System*).
3. Obter linhagens de *L. lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada da Pró-quimosina bovina B.
4. Avaliar a capacidade de coagulação do leite da Pró-quimosina B recombinante (rPró-quimosina B).

## III.2. Material e Métodos

### III.2.1. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho, bem como suas características, encontram-se listados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio 2xYT a 37°C com aeração (sob agitação de 150 rpm). As linhagens de *L. lactis* foram cultivadas em meio M17 acrescido de 0,5% de glicose (GM17) a 30°C sem aeração (sem agitação). Para o cultivo em meio sólido, os meios foram acrescidos de 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico. Quando necessário, os meios foram suplementados com ampicilina (100 µg.mL<sup>-1</sup>), canamicina (100 µg.mL<sup>-1</sup>) ou cloranfenicol (10 µg.mL<sup>-1</sup>).

### III.2.2. Manipulação do DNA

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados na manipulação de DNA plasmidiano foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook and Russel, 2001), com algumas modificações especificadas junto aos métodos.

**Tabela 1:** Linhagens bacterianas utilizadas para realizar a clonagem e expressão da Pró-quimosina B em *L. lactis*.

<i>Linhagens</i>	<i>Características</i>	<i>Referências</i>
<i>E. coli</i> TG1 (pXyIT:CYT:nuc)	<i>supE</i> , <i>hsd</i> , $\Delta 5$ , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , F'(traD36 proAB-lacZ $\Delta$ M15); Portadora do plasmídeo pXyIT:CYT:nuc	Coleção <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> TG1 (pXyIT:SEC:nuc)	<i>supE</i> , <i>hsd</i> , $\Delta 5$ , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , F'(traD36 proAB-lacZ $\Delta$ M15); Portadora do plasmídeo pXyIT:SEC:nuc	Coleção <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> TOP10	(F $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> -m <sub>k</sub> +) <i>deoR thi-1 supE44 <math>\lambda^-</math> gyrA96 relA1</i> )	Invitrogen™
<i>L. Lactis</i> NCDO2118	Linhagem selvagem de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Coleção <sup>a</sup>
<i>L. Lactis</i> NCDO2118 (pXyIT:CYT:pró-quimosina B)	Linhagem recombinante de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; Portadora do plasmídeo pXyIT:CYT:pró-quimosina B	Este trabalho
<i>L. Lactis</i> NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B)	Linhagem recombinante de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; Portadora do plasmídeo pXyIT:SEC:pró-quimosina B	Este trabalho

<sup>a</sup>: Linhagem pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Tabela 2:** Plasmídeos utilizados para realizar a clonagem e expressão da pró-quimosina B em *L. lactis* na forma secretada e citoplasmática.

<i>Plasmídeos</i>	<i>Características relevantes</i>	<i>Referências</i>
pBSIISK: <i>pró-quimosina B</i>	Vetor pBluescript II SK (Vetor de clonagem/Amp <sup>r</sup> /pUC ORI) contendo a ORF sintética codificadora da Pró-quimosina bovina B com códons preferenciais de <i>L. lactis</i>	<i>Epoch Biolabs Inc.</i>
pCR <sup>®</sup> II-TOPO (Blunt)	Vetor de clonagem/Amp <sup>r</sup> -Km <sup>r</sup> /pUC ORI	Invitrogen™
pCRII-TOPO: <i>pró-quimosina B:CYT</i>	Vetor pCR <sup>®</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup> contendo a ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B (forma citoplasmática) com códons preferenciais de <i>L. lactis</i>	Este trabalho
pCRII-TOPO: <i>pró-quimosina B:SEC</i>	Vetor pCR <sup>®</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup> contendo a ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B (forma secretada) com códons preferenciais de <i>L. lactis</i>	Este trabalho
pXyIT:CYT: <i>nuc</i>	pWV01/Cm <sup>r</sup> ; vetor de expressão contendo o sítio de ligação do ribossomo (RBS) da seqüência codificadora da proteína Usp45 fusionado à seqüência codificadora da nuclease de <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>nuc</i> ), sob o controle do promotor P <sub>xyIT</sub>	Miyoshi e cols., 2004

pXylT:SEC:nuc	pWV01/Cm <sup>r</sup> ; vetor de expressão contendo a seqüência codificadora do peptídeo sinal da proteína Usp45 (SPUsp) fusionada à ORF nuc de <i>S. aureus</i> , sob o controle do promotor P <sub>xyT</sub>	Miyoshi e cols., 2004
pXylT:CYT:pró-quimosina B	Vetor de expressão pXylT:CYT:nuc no qual a ORF nuc foi substituída pela ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B com códons preferenciais de <i>L. lactis</i>	Este trabalho
pXylT:SEC:pró-quimosina B	Vetor de expressão pXylT:SEC:nuc no qual a ORF nuc foi substituída pela ORF Pró-quimosina bovina B com códons preferenciais de <i>L. lactis</i>	Este trabalho

Amp<sup>r</sup>: confere resistência à ampicilina; Km<sup>r</sup>: confere resistência à canamicina; Cm<sup>r</sup>: confere resistência à cloranfenicol.

### III.2.3. Construção da ORF sintética da Pró-quimosina bovina B com códons preferenciais de *L. lactis*

A seqüência codificadora da Pró-quimosina bovina B foi confeccionada pela empresa *Epoch Biolabs, Inc.*, sediada nos Estados Unidos. Para tanto, em um primeiro estágio, a seqüência nucleotídica do cDNA da Pró-quimosina bovina B foi obtida junto ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através do número de acesso NM\_180994.1. Em seguida, a referida seqüência teve a seqüência codificadora do seu peptídeo sinal retirada. Logo após, a seqüência foi submetida a um programa computacional, da própria *Epoch Biolabs*, para a conversão da seqüência original, com códons preferenciais de *Bos taurus*, em uma seqüência modificada com códons preferenciais de *L. lactis*; o que, ao final, resultou em uma seqüência modificada de 1.098 pb. Por fim, a ORF sintética foi, então, clonada no

vetor pBluescript II SK, gerando o plasmídeo pBSIISK:*pró-quimosina B*. A integridade do mesmo foi conferida por seqüenciamento nucleotídico (Sanger *et al.*, 1977).

### **III.2.4. Preparação do DNA plasmidiano pBSIISK:*pró-quimosina B***

Cerca de 1 µg do plasmídeo pBSIISK:*pró-quimosina B*, liofilizado (assim como recebido da empresa *Epoch Biolabs*) foi eluído em 20 µL de água ultrapura estéril, homogeneizado em vórtex, mantido a 37°C por 30 minutos, e utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E.coli* TOP10.

#### **III.2.4.1. Transformação bacteriana**

##### **III.2.4.1.1. Confeção de *E. coli* eletrocompetente**

Uma colônia de *E. coli* TOP10 (Tabela 1) foi inoculada em 5 mL de meio 2xYT e incubada a 37°C durante 18 horas com aeração. Uma alíquota de 3 mL desta cultura foi inoculada em 300 mL de 2xYT e incubada, sob as mesmas condições, até atingir uma densidade óptica a 600nm ( $DO_{600nm}$ ) entre 0,2 e 0,3. Uma vez alcançada a  $DO_{600nm}$  desejada, a cultura foi centrifugada a 5.000 rpm durante 18 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 300 mL de uma solução de glicerol 10% estéril; processo este que foi repetido mais 4 vezes. Após a última lavagem, as bactérias foram ressuspensas em 1 mL de solução de glicerol 10%. Por fim, a mistura foi dividida em alíquotas de 100 µL que foram estocadas a -70°C.

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota com células eletrocompetentes, congelada a -70°C, foi colocada no gelo durante 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 10 ng do plasmídeo pUC18 e a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (2 mm – Bio-Rad Laboratórios), previamente resfriada. A amostra foi submetida a um pulso de 2,5 kV de voltagem, 25 µFD de capacitância e 200 Ω de resistência utilizando um eletroporador CelljectUno (Thermo Electro Corporation). Imediatamente após o pulso, as células foram ressuspensas em 900 µL de meio 2xYT e estas foram incubadas a 37°C por cerca de uma hora e meia. Diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  foram semeadas em meio 2xYT ágar suplementado com

ampicilina ( $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 18 horas. Foram obtidas  $8,7 \times 10^7$  unidades formadoras de colônia (UFC) por micrograma de DNA.

#### **III.2.4.1.2. Transformação de *E. coli* TOP10 com o plasmídeo pBSIISK:pró-quimosina B**

A transformação do plasmídeo pBSIISK:pró-quimosina B em células de *E. coli* TOP10 foi conduzida por eletroporação seguindo os mesmos parâmetros descritos no item III.2.4.1.1.. Para tanto, cerca de 100 ng do plasmídeo pBSIISK:pró-quimosina B foram utilizados. Como controle negativo, utilizou-se, no lugar do plasmídeo,  $0,5 \mu\text{L}$  de água ultrapura estéril.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em transferir uma alíquota de  $100 \mu\text{L}$  da suspensão de células eletroporadas, de cada amostra, para placas de Petri contendo meio 2xYT ágar suplementado com  $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de ampicilina. As culturas foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$  por aproximadamente 16 horas. Após este período as placas foram avaliadas quanto à presença de clones recombinantes.

A etapa seguinte consistiu na seleção de alguns clones, obtidos na placa resultante da transformação com o plasmídeo pBSIISK:pró-quimosina B, para proceder com a extração do DNA plasmidiano.

#### **III.2.4.1.3. Extração do plasmídeo pBSIISK:pró-quimosina B de *E. coli***

As colônias selecionadas foram transferidas, isoladamente, para tubos tipo "Falcon" de 50 mL contendo 5 mL de meio 2xYT suplementado com  $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de ampicilina. As culturas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por aproximadamente 18 horas com aeração. Após a incubação, foi feita uma cultura estoque em glicerol ( $1 \text{ mL}$  da cultura +  $1 \text{ mL}$  de glicerol 80%) sendo estas armazenadas a  $-70^\circ \text{C}$ . Uma alíquota ( $1,5 \text{ mL}$ ) de cada cultura foi também transferida para tubos de microcentrífuga e procedeu-se com a extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina como descrito por Sambrook and Russel (2001) com algumas modificações.

Após a centrifugação das culturas (7 minutos; 13.000 rpm;  $25^\circ\text{C}$ ), as células foram coletadas e ressuspensas em  $200 \mu\text{L}$  da solução I (50 mM glicose; 10 mM tris-HCl, pH 7,4). Em seguida, adicionou-se  $200 \mu\text{L}$  da solução II (1% SDS, 0,2 M NaOH) e após a inversão dos tubos (10 a 15 vezes) foi adicionado  $200 \mu\text{L}$  de solução III (3 M acetato de sódio; pH 5,2). A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos. Ao sobrenadante,

adicionou-se 420  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado. Os tubos foram então incubados por 30 minutos a  $-70^\circ\text{C}$  e após esse período, foram centrifugados e o sobrenadante descartado. Logo após, o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado ( $-20^\circ\text{C}$ ) e ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril. Por fim, a ressuspensão foi tratada com RNase A ( $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  por meia hora.

A presença e qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese.

#### **III.2.4.1.4. Resolução eletroforética**

O produto da extração de DNA plasmidiano foi aplicado em gel de agarose a 1%, como segue. As amostras de DNA acrescida de 1:5 do volume de tampão de amostra (Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X) foram fracionados em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (45 mM tris; 45 mM ácido bórico; 1mM EDTA), contendo brometo de etídeo ( $0,5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). As resoluções foram realizadas a 100 Volts durante aproximadamente 1 hora. O DNA foi visualizado e o gel fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta (320 nm) através do sistema de documentação fotográfica *Benchtop UV Transilluminator (UVP)* e a foto processada pelo programa *MultiDoc-It Digital Imagem System (UVP)*.

O peso molecular dos plasmídeos foi estimado comparando-se ao marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder™* (Invitrogen).

#### **III.2.4.1.5. Quantificação do pBSIISK:pró-quimosina B**

A concentração do pBSIISK:pró-quimosina B foi determinada utilizando o espectrofotômetro BioPhotometer plus (Eppendorf) com a leitura da absorbância em 260 nm.

### **III.2.5. Clonagem da ORF pró-quimosina B no sistema TOPO**

#### **III.2.5.1. Amplificação da ORF pró-quimosina B**

Um fragmento de DNA de 1.098 pb, contendo a seqüência codificadora da Pró-quimosina bovina B, foi amplificado por PCR utilizando como molde a seqüência codificadora presente no plasmídeo pBSIISK:pró-quimosina B (Tabela 2). Os

oligonucleotídeos iniciadores contendo um sítio artificial de restrição em cada extremidade foram confeccionados, baseados na seqüência nucleotídica da ORF sintética (Tabela 3).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50  $\mu$ L, contendo 1 U AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase (Invitrogen), 1X AccuPrime™ Pfx Reaction Mix, 0,2 pmol de cada iniciador e 130 ng do vetor pBSIIISK:*pró-quimosina B*. A reação foi realizada em um termociclador ATC 401 (Nyx Technik) onde as amostras foram submetidas as seguintes etapas: desnaturação inicial (95°C; 5 min.) seguida de 30 ciclos de desnaturação (95°C; 1 min.), anelamento (50°C; 30 seg.), extensão (68°C; 2 min.) e, ao término destes 30 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (68°C; 7 min.). As seqüências dos iniciadores, bem como suas temperaturas de anelamento e seus sítios de restrição artificiais encontram-se descritos na Tabela 3.

Ao final da reação de PCR, uma alíquota de 5  $\mu$ L do produto de amplificação foi observada em gel de agarose a 1%, seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item III.2.4.1.4..

**Tabela 3:** Parâmetros da reação de PCR utilizada para a amplificação da sequência codificadora da Pró-quimosina B.

<i>PCR</i>	
Iniciador <i>forward</i> (F) da forma secretada	5' <u>GATGCATA</u> CTGAAATTACTCGAATTC 3'
Sítio de restrição para a enzima <i>Nsi</i> I está sublinhado	
Iniciador <i>forward</i> (F) da forma citoplasmática	5' <u>GATGCAT</u> CAACTGAAATTACTCGAATTC 3'
Sítio de restrição para a enzima <i>Nsi</i> I está sublinhado	
Iniciador <i>reverse</i> (R) tanto da forma secretada quanto da citoplasmática	5' <u>GGATATCT</u> TAGATGGCCTTGGCAAG 3'
Sítio de restrição para a enzima <i>Eco</i> RV está sublinhado	
Temperatura de anelamento	50 °C
Tamanho do fragmento amplificado	1.098 pb

### ***III.2.5.2. Clonagem da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B no vetor pCRII-TOPO (Blunt)***

Os produtos de PCR, correspondentes à forma citoplasmática ou secretada da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B, foram purificados utilizando o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e ligados ao vetor pCRII-TOPO (Blunt; Invitrogen), para a geração dos plasmídeos pCRII-TOPO:pró-quimosina B:CYT e pCRII-TOPO:pró-quimosina B:SEC (Tabela 2). Os procedimentos foram realizados conforme as recomendações do fabricante. O produto de ligação foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10.

A confecção das células competentes, transformação e extração da DNA plasmidiano foi realizado seguindo os procedimentos dos itens III.2.4.1.1., III.2.4.1.2. e III.2.4.1.3., respectivamente.

### ***III.2.5.3. Confirmação da presença e tamanho da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B no vetor pCRII-TOPO (Blunt)***

Para verificar a presença do inserto e o peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor pCRII-TOPO (Blunt), o inserto presente no referido vetor foi amplificado por PCR utilizando o protocolo descrito no item III.2.5.1., porém, com as seguintes alterações: as reações de amplificação foram feitas em um volume final de 10 µL, contendo 1 U de Taq DNA polimerase (Phonetría) e uma temperatura de extensão de 72°C, ao invés de 68°C, além de 50 ng dos plasmídeos extraídos.

Após a reação, todo o volume da mesma foi aplicado em gel de agarose a 1% e a resolução eletroforética realizada sob as mesmas condições descritas no item III.2.4.1.4.

## **III.2.6. Subclonagem da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B nos vetores XIES**

### ***III.2.6.1. Digestão enzimática dos vetores pXyIT:CYT:nuc e pXyIT:SEC:nuc***

Para a subclonagem da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B nos vetores de expressão pXyIT:CYT e pXyIT:SEC (Tabela 2), inicialmente foi realizada a extração desses plasmídeos a partir das linhagens de *E. coli* TG1 (pXyIT:CYT:nuc) e *E. coli* TG1 (pXyIT:SEC:nuc) (Tabela 1) utilizando o Kit *The Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), conforme as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada uma reação de digestão enzimática de 10 µL que consistiu em: 5 µL (contendo aproximadamente 500 ng) dos plasmídeos pXyIT:CYT:nuc ou pXyIT:SEC:nuc, 1 µL do *One-Phor-All buffer* (10 mM tris-acetato, pH 7,5; 10 mM acetato de magnésio; 50 mM acetato de potássio; Amersham Pharmacia), 1 µL de *NsiI* (10 U/µL), 1 µL de *EcoRV* (10 U/µL) e 1 µL de água ultrapura estéril. A reação foi mantida em banho-maria a 37°C por quatro horas.

### ***III.2.6.2. Purificação dos fragmentos de DNA pXyIT:CYT e pXyIT:SEC***

A reação de digestão descrita no item III.2.6.1 teve todo o seu volume aplicado em gel de agarose a 1% e a resolução eletroforética realizada sob as mesmas condições descritas no item III.2.4.1.4. Ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes aos vetores pXyIT:CYT (3.244 pb) e pXyIT:SEC (3.316 pb), desprovidos da seqüência codificadora da nuclease de *S. aureus* (nuc; 511 pb), foram purificados com o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza dos produtos purificados foram então estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1%, utilizando o *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus*, como marcador de peso molecular.

### ***III.2.6.3. Digestão enzimática dos plasmídeos pCRII-TOPO:pró-quimosina B:CYT e pCRII-TOPO:pró-quimosina B:SEC***

Os plasmídeos pCRII-TOPO:pró-quimosina B:CYT e pCRII-TOPO:pró-quimosina B:SEC (Tabela 2) foram extraídos a partir dos clones de *E. coli* previamente confirmados (item III.2.5.3) seguindo o protocolo do item III.2.4.1.3. Em seguida, foi realizada uma reação de digestão enzimática de 20 µL que consistiu em:

15  $\mu\text{L}$  (contendo aproximadamente 1  $\mu\text{g}$ ) dos plasmídeos pCRII-TOPO:*pró-quimosina B:CYT* e pCRII-TOPO:*pró-quimosina B:SEC*; 1  $\mu\text{L}$  do *One-Phor-All buffer*, 1  $\mu\text{L}$  de *NsiI* (10 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de *EcoRV* (10 U/ $\mu\text{L}$ ) e 2  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril. A reação foi mantida em banho-maria a 37°C por quatro horas.

#### ***III.2.6.4. Purificação dos fragmentos de DNA contendo a seqüência codificadora da Pró-quimosina bovina B***

A reação de digestão apresentada no item III.2.6.3 foi toda aplicada em gel de agarose a 1% e a resolução eletroforética realizada sob as mesmas condições descritas no item III.2.4.1.4.. Ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes à seqüência codificadora da Pró-quimosina bovina B (1.098 pb) foram purificados com o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza dos produtos purificados foram então estimados através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1%, utilizando o *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus*, como marcador de peso molecular.

#### ***III.2.6.5. Ligação da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B nos vetores pXyIT:CYT e pXyIT:SEC***

Os produtos digeridos e purificados, correspondentes ao inserto *pró-quimosina B* (item III.2.6.4.) e aos vetores pXyIT:CYT e pXyIT:SEC (item III.2.6.2.), foram submetidos a uma reação de ligação. Cada reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) a temperatura de 4°C durante 16 horas utilizando uma proporção equimolar (3/1) de inserto/vetor.

#### ***III.2.6.6. Transformação de E. coli TOP10 com os plasmídeos pXyIT:CYT:pró-quimosina B e pXyIT:SEC:pró-quimosina B***

Uma alíquota de 8  $\mu\text{L}$  do produto de cada reação de ligação (pXyIT:CYT:*pró-quimosina B* ou pXyIT:SEC: *pró-quimosina B*) (item III.2.6.5.) foi usada para transformar 100  $\mu\text{L}$  de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 de acordo com o protocolo descrito no item III.2.4.1.2..

O processo de seleção dos transformantes consistiu em transferir uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de células eletroporadas, com cada um dos plasmídeos, para placas de Petri contendo meio 2xYT ágar suplementado com 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cloranfenicol. As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 20 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de clones recombinantes.

Quatro colônias transformadas com cada construção, selecionadas aleatoriamente, foram inoculadas em 5 mL de meio 2xYT suplementado com 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cloranfenicol. As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 18 horas sob agitação. Foi feita uma cultura estoque em glicerol (1 mL da cultura + 1 mL de glicerol 80%) de cada clone e estes foram armazenados a -70°C.

Em seguida, foi realizada a extração dos plasmídeos de acordo com o protocolo apresentado no item III.2.4.1.3..

#### **III.2.6.7. Confirmação da presença e tamanho do inserto pró-quimosina B nos vetores pXyIT:CYT e pXyIT:SEC**

Os plasmídeos extraídos (item III.2.4.1.3.) (aproximadamente 20 ng) foram utilizados em uma reação de PCR com os iniciadores já descritos (Tabela 3), com o objetivo de confirmar a obtenção de plasmídeos recombinantes contendo a ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B. As reações de amplificação foram realizadas de acordo com o descrito no item III.2.5.3..

##### **III.2.6.7.1. Reação de seqüenciamento e análise *in silico***

A seqüência nucleotídica do inserto *pró-quimosina B*, clonada nos vetores pXyIT:CYT e pXyIT:SEC, foi confirmada através de seqüenciamento (Sanger *et al.*, 1977), utilizando o Kit *DYEnamic ET Dye Terminator* (Amersham Biosciences) e o seqüenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences). Os iniciadores utilizados foram os mesmos descritos na Tabela 3.

As seqüências de DNA obtidas através do seqüenciamento foram analisadas no programa *ContigExpress* (Informax Inc.). A seqüência consenso gerada foi então alinhada com a seqüência da *pró-quimosina B* modificada para códons preferências de *L. lactis* fornecida pela empresa *Epoch Biolabs*, utilizando o mesmo programa.

### **III.2.7. Transformação de *L. lactis* NCDO2118 com os plasmídeos pXylT:CYT:pró-quimosina B e pXylT:SEC:pró-quimosina B**

#### ***III.2.7.1. Confeção de células eletrocompetentes de *L. lactis* NCDO2118***

A confecção de células eletrocompetentes de *L. lactis* NCDO2118 foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: um primeiro inóculo foi realizado com uma única colônia de *L. lactis* NCDO2118 em meio M17Glu-Sac (M17; 0,5% glicose; 0,5 M sacarose). Este inóculo foi mantido a 30°C, *overnight* e sem agitação. Um segundo inóculo foi realizado com 100 µL dessa primeira cultura, que foi novamente inoculada em meio M17Glu-Sac, a qual foi incubada a 30°C, sem agitação, por 8-10 horas. Uma alíquota de 1 µL desta última cultura foi então inoculada em 150 mL de meio M17Glu-Sac contendo glicina (1%). Uma vez que a cultura alcançou uma  $DO_{600nm}$  em torno de 0,4-0,6, esta foi centrifugada a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O precipitado celular foi então ressuspenso em 150 mL de uma solução gelada constituída de sacarose 0.5 M e glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais três vezes e, após a última lavagem, o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de uma solução constituída por PEG3000 30% e glicerol 10%. Alíquotas de 100 µL dessas células foram estocadas a -70° C até o momento de uso.

#### ***III.2.7.2. Transformação de *L. lactis* NCDO2118 com os plasmídeos pXylT:CYT:pró-quimosina B e pXylT:SEC:pró-quimosina B***

Uma alíquota contendo 1 µg dos plasmídeos pXylT:CYT:pró-quimosina B e pXylT:SEC:pró-quimosina B, extraídos utilizando o Kit *The Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) a partir dos clones de *E. coli* TOP10 e previamente confirmados, foram usados para transformar as células de *L. lactis* NCDO2118. O processo de transformação das células foi o mesmo que o já descrito para *E. coli* (item III.2.4.1.2), porém com as seguintes modificações: (i) utilização de 2,4 kV de voltagem para o pulso, (ii) ressuspenção das células transformadas em M17Glu-Sac, e (iii) incubação, sem agitação, a 30° C por quatro horas.

A seleção dos transformantes consistiu em semear 100  $\mu\text{L}$  da cultura de células eletroporadas, com cada um dos plasmídeos, em placas de Petri contendo meio M17Glu-Sac ágar suplementado com 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cloranfenicol. As culturas foram mantidas a 30° C por aproximadamente 48 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de clones recombinantes. A etapa seguinte consistiu na recuperação desses clones para proceder com a extração de plasmídeos.

#### ***III.2.7.3. Extração do DNA plasmidiano de *L. lactis* em pequena escala***

As colônias resultantes da transformação de *L. lactis* com os plasmídeos pXylT:CYT: *pró-quimosina B* e pXylT:SEC: *pró-quimosina B* (item III.2.7.2.) foram coletadas e então inoculadas em 5mL de meio M17Glu-Sac suplementado com 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cloranfenicol. As culturas foram incubadas a 30°C por aproximadamente 18 horas. Foi feita uma cultura estoque em glicerol (750  $\mu\text{L}$  da cultura + 750  $\mu\text{L}$  de glicerol 80%) de cada clone e estes foram armazenados a -70° C. O protocolo utilizado para a extração de plasmídeos foi o mesmo que foi utilizado para *E. coli* com uma única modificação: após a primeira centrifugação, o precipitado celular foi ressuspensão em 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de TE-LYS (50 mM tris – pH 7,5; 5 mM de EDTA; 10  $\text{mg.mL}^{-1}$  lisozima) e incubado por meia hora.

#### ***III.2.7.4. Confirmação dos clones de *L. lactis* portadores dos plasmídeos pXylT:CYT: pró-quimosina B e pXylT:SEC: pró-quimosina B***

Os plasmídeos extraídos (aproximadamente 50 ng; item III.2.7.3.) foram aplicados em uma reação de PCR com os iniciadores já descritos (Tabela 3) com o objetivo de confirmar a obtenção de plasmídeos recombinantes contendo a ORF *pró-quimosina*. As reações de amplificação foram realizadas de acordo com o descrito no item III.2.5.3..

### **III.2.8. Confirmação da produção da Pró-quimosina bovina B pelas linhagens recombinantes de *L. lactis***

### ***III.2.8.1. Indução da expressão gênica da ORF de interesse em *L. lactis****

Uma alíquota de 10 µL da cultura estoque dos clones confirmados de *L. lactis* NCDO2118 (pXylT:CYT: *pró-quimosina B* e pXylT:SEC: *pró-quimosina B*) foi inoculada em meio GM17 (vide item III.2.1) suplementado com 10 µg.mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol. Os inóculos foram mantidos *overnight* a 30°C, sem agitação. Essas culturas foram então diluídas (1:10.000) em meio XM17 (M17; 1% xilose) ou GM17 (controle negativo da indução) suplementados com 10 µg.mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol. Uma vez que as culturas alcançaram uma DO<sub>600nm</sub> em torno de 1,5 – 2,0, estas foram submetidas a extração protéica.

### ***III.2.8.2. Extração das frações protéicas dos clones recombinantes de *L. lactis* NCDO2118***

#### **III.2.8.2.1. Fração celular (Total) e Secretada**

Alíquotas de 2 mL das culturas (induzidas e não induzidas) foram centrifugadas a 13.000 rpm, 4°C, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi separado do precipitado celular e estes foram tratados separadamente.

O sobrenadante foi filtrado e então adicionou-se 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 100% gelado; ditioneitol (DTT) 10mM e fenil-metil sulfonil fluoreto (PMSF) 1mM e este foi incubado por uma hora no gelo. Após incubação, foi centrifugado a 13.000 rpm, 4 °C, por 20 minutos. O precipitado protéico foi então ressuspensão em 115 µL de NaOH 50 mM.

O *pellet* celular foi ressuspensão em 100 µL de solução de TE-LYS (ver item III.2.7.3.) acrescido de PMSF 1 mM e DTT 10mM. Em seguida, foi incubado a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, foi adicionado 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%.

Ao final da extração, as amostras foram ressuspensas em tampão DTT-LB 2X (75 mM tris-HCl pH 6,8; 3% SDS; 15% glicerol; 0,15% azul de bromofenol; 200 mM DTT) na proporção de 1:1, aquecidas à 100°C por 5 minutos e estocadas à -20° C.

#### **III.2.8.2.2. Fração citoplasmática**

Dez mililitros das culturas (induzida e não induzida) foram centrifugados a 13.000 rpm a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante formado foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 100 µL de solução de TE-LYS. Este foi homogeneizado e incubado

em banho-maria por 30 minutos. Em seguida foi centrifugado a 6.000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado (poro 0,22 µm) e em 500 µL deste filtrado foi adicionado 120 µL de TCA 100%. As amostras foram mantidas no gelo por 30 minutos para a precipitação das proteínas. Posteriormente foram centrifugadas a 13.000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 115 µL de NaOH 50 mM. Ao final da extração, as amostras foram ressuspensas em tampão DTT-LB 2X na proporção de 1:1, aquecidas à 100°C por 5 minutos e estocadas à -20° C.

### **III.2.8.2.3. Protoplasto**

Para o isolamento das proteínas presentes no protoplasto seguiu-se o mesmo protocolo para extração de proteínas do citoplasma (item III.2.8.2.2.), porém, utilizando TES-LYS (20% sacarose; 50 mM tris – pH 7,5; 5 mM EDTA; 10 mg.mL<sup>-1</sup> lisozima) em lugar de TE-LYS e não submetendo as amostras a passagem pelo filtro (0,22 µm).

### **III.2.8.3. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida**

As proteínas extraídas de *L. lactis* (item III.2.8.2.) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com o protocolo descrito por Sambrook and Russel (2001).

Para isso foi utilizado gel de “separação” na concentração de 12% e gel de “empilhamento” na concentração de 5%. A eletroforese foi conduzida com voltagem constante de 100 V em tampão Tris-glicina (25 mM tris; 250 mM glicina; 0,1% SDS).

Aos géis foram aplicados 5 µL do padrão *RPN800V - Full range Rainbow™ recombinant protein molecular weight marker* (Amersham Biosciences), 30 µl das amostras, e como controle, Quimosina bovina purificada (Sigma) (4 µL de solução estoque de Quimosina bovina 2 mg/mL + 4 µL DTT – LB 2X), extraída do estômago de bezerros.

### **III.2.8.4. Produção de anticorpos policlonais anti-Quimosina bovina**

Para confirmar a produção da Pró-quimosina bovina B pelas linhagens recombinantes de *L. lactis*; adotou-se a técnica de *Western Blotting* seguida de

imunodeteção. Para tanto, como um primeiro passo, deu-se início a obtenção dos anticorpos policlonais anti-Quimosina.

#### **III.2.8.4.1. Preparação dos animais**

Para o desenvolvimento deste experimento foram utilizados 5 camundongos BALB/c de 5 a 6 semanas obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG. Durante 7 dias, os animais receberam água filtrada contendo 1% de Ivermectina, como procedimento de vermifugação, seguidos de 7 dias recebendo apenas água filtrada.

#### **III.2.8.4.2. Doses administradas**

A Quimosina bovina purificada (Sigma) foi administrada nos animais em 3 doses de 20 µg da proteína diluída em 50 µL de PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e acrescida de 50 µL de adjuvante. Sendo utilizado Adjuvante Completo de Freud (CFA – Sigma) na primeira dose e Adjuvante Incompleto de Freud (IFA – Sigma) nas doses seguintes. Cada dose foi aplicada com intervalo de 15 dias, por via subcutânea.

#### **III.2.8.4.3. Coleta do Sangue e obtenção do Soro**

Antes de iniciar o processo de imunização foi coletado o sangue pré-imune (dia zero). As outras coletas foram realizadas nos dias 14, 28 e 42 após a primeira imunização. O sangue foi retirado do plexo retro-orbital dos camundongos com o auxílio de pipetas Pasteur e transferidos para microtubos. Na última coleta os animais foram anestesiados como uma mistura de Xilazina (ROMPUM) - 10 mg.kg<sup>-1</sup> e Ketamina (DOPALEN) - 100 mg.kg<sup>-1</sup> e o sangue retirado por sangria dos vasos axilares.

O sangue obtido em cada coleta foi mantido à temperatura ambiente por 4 horas e posteriormente centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos. O soro resultante foi coletado em microtubos e estocado a – 20°C.

A resposta imune humoral gerada foi avaliada pelo teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto.

### ***III.2.8.5. Western Blotting***

A Pró-quimosina bovina B, produzida pelas linhagens de *L. lactis*, foi submetida a procedimentos de imunodeteccção por *Western Blotting*.

Antes de dar inicio ao procedimento de eletrotransferência, as membranas de PVDF (Invitrogen) foram re-hidratadas em metanol 100% (5 minutos) e, posteriormente, juntamente com os géis e os papéis de filtro foram equilibrados na solução de transferência (40 mM glicina; 50 mM tris; 0,04% SDS; 20% metanol) por 15 minutos. A transferência foi realizada no equipamento The Panther™ Semidry Electroblotter (Apogent).a 300 mA por 1 hora

Após a transferência, as membranas foram reveladas utilizando-se soro de camundongo anti-Quimosina (1:100), através do Kit *Western Breeze® Chromgenic Western Blot Immunodetection* (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante.

## **III.2.9. Detecção da atividade proteolítica da Pró-Quimosina bovina B produzida pelas linhagens recombinantes de *L. lactis***

### ***III.2.9.1. Teste de coagulação em placa***

As linhagens *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:pró-quimosina B), *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B) e *L. lactis* NCDO2118 (controle negativo) foram cultivadas em presença de xilose (amostra induzida) e glicose (amostra não induzida), segundo o procedimento descrito no item III.2.8.1..

Vinte microlitros de cada cultura, lisado (*pellet* de 1 mL de cultura ressuspensa em 200 µL de TE-LYS, mantido em banho-maria a 37°C por 30 minutos), e sobrenadante, foram adicionados, em forma de *spots*, às placas contendo 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 1% de leite em pó desnatado e suplementada com 10.µg.mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol. As placas foram incubadas em atmosfera microaerofílica a 30°C por 72 horas (Dr. Sergio Echeverrigaray, Laboratório de Biotecnologia Vegetal – UCS, comunicação pessoal).

### ***III.2.9.2. Ensaio da atividade proteolítica da Pró-quimosina bovina B produzida pelas linhagens recombinantes de *L. lactis* (determinação quantitativa)***

A atividade proteolítica da Pró-quimosina bovina B produzida pelas linhagens recombinantes de *L. lactis* foi determinada utilizando a metodologia descrita por Bonato e cols.(1982), com algumas modificações.

Esta metodologia baseia-se na utilização de um substrato derivado da caseína, ao qual foi adicionado um grupo sulfanilamida, esse substrato chama-se azocaseína (Sigma). O produto da atuação de proteases sobre a azocaseína (liberação do grupo sulfanilamida), em presença de TCA resulta na formação de componentes coloridos solúveis (tons alaranjados), e pela intensidade da coloração é possível determinar a atividade proteolítica da enzima.

Para determinar a atividade proteolítica da Quimosina bovina B recombinante, primeiramente, realizou-se a extração protéica das frações secretada, celular e protoplasto das culturas (induzidas e não induzidas; vide itens III.2.8.1. e III.2.8.2.) das linhagens recombinantes de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:pró-quimosina B e pXyIT:CYT:pró-quimosina B) e da linhagem selvagem (*L. lactis* NCDO2118). Como o objetivo deste experimento consiste em avaliar a atividade proteolítica da Quimosina B, o protocolo de extração protéica foi modificado eliminando o uso do DTT, PMSF e da fervura, no intuito de que essas etapas não interfiram na atividade da enzima.

Em seguida 60 µL da proteína extraída foi adicionada a quatro soluções de azocaseína (1% caseína, 25 mM tampão fosfato) tamponada com os pH 4,6; 5,6; 6,5 e 7,5 e incubadas a 37°C por 60, 120 ou 180 minutos. Após o período de incubação adicionou-se 300 µL de 10% TCA para interromper a reação. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos, sendo transferido um volume de 400 µL, de cada amostra, para outro microtubo onde adicionou-se 100 µL de 1,8 M NaOH e determinou-se a absorbância utilizando um espectrofotômetro Libra S12 (Biochrom) a 420 nm ( $A_{420}$ ). Todas as amostras foram avaliadas em duplicata.

Uma unidade de enzima ativa foi definida como o montante que resultou no aumento de 0,1  $A_{420}$  por mL em 60 minutos a 37°C.

### III.2.9.2.1. Análise Estatística

A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste One-Way ANOVA, disponível no software SSPS Data Editor. Sendo utilizado um valor de  $p < 0,05$  como limite da significância estatística.

### III.2.9.3. Zimograma (determinação semi-quantitativa da atividade proteolítica da Quimosina B)

O zimograma foi realizado segundo descrito por Secades e Guijarro (1999), com algumas modificações.

As proteínas extraídas das linhagens de *L. lactis* (item III.2.8.2.) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Para isso foi utilizado gel de “empilhamento” na concentração de 4,5% e gel de “separação” na concentração de 10%, sendo adicionado a este último 0,01% de caseína (leite em pó desnatado) antes da polimerização.

As amostras (15  $\mu$ L) e o controle (4  $\mu$ L da Quimosina bovina Purificada a 2 mg/mL; Sigma) acrescidos de tampão de amostra (0,004% de azul de bromofenol; 20% glicerol; 55 mM tris-HCl – pH 6,8) na proporção 1:1, foram aplicados ao gel sem passar por fervura.

A eletroforese foi conduzida a 110 V em tampão Tris-glicina a 4°C por 5 horas.

Ao término da corrida, o SDS do gel foi retirado pela imersão do mesmo em uma solução de Triton X-100 a 2,5% sob leve agitação por um período de duas horas, sendo trocada a solução a cada hora.

Posteriormente, o gel foi incubado em uma solução tampão com pH de favorecimento da atividade da enzima e, neste caso, foi usado tampão fosfato (fosfato de sódio monobásico) pH 6,5 na concentração de 50 e 200 mM.

Para revelação, o gel foi corado com *comassie blue* (1% Brilliant Blue R; 30% etanol; 7% ácido cético glacial), sendo fixada a cor das bandas de proteínas e retirado o excesso de corante com a solução fixadora (30% etanol, 7% ácido acético glacial).

### III.3. Resultados e Discussão

#### III.3.1. Construção das linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da Pró-quimosina bovina B

##### III.3.1.1. Confeção da ORF sintética

Devido à redundância do código genético, a maioria dos 20 aminoácidos são codificados por mais de uma trinca de nucleotídeos. Grantham e cols (1981) observaram que os códons mais freqüentemente utilizados pelos genes com maior nível de expressão de *E. coli* não eram os mesmos utilizados pelos genes menos expressos. Um ano depois (1982) Gouy e Gautier publicam o resultado de seus experimentos demonstrando que a variação dos códons sinônimos de *E. coli* está relacionada ao nível de tradução produzido.

A análise sistemática de padrões dos códons preferenciais de *E. coli* conduziu às seguintes observações: (i) há uma preferência para um ou dois códons entre toda uma família de códons degenerados; (ii) alguns códons são freqüentemente usados por todos os genes, independente da abundância da proteína codificada; (iii) genes com alto nível de expressão apresentam um maior grau de preferência aos códons que os genes poucos expressos; (iv) a freqüência do uso de códons sinônimos normalmente reflete a abundância dos seus tRNAs cognatos (Jana and Deb, 2005; Saier, 1995).

Além da variação da freqüência do uso de códons sinônimos entre genes dentro de uma mesma espécie, há diferenças na preferência de códons e a freqüência de uso entre espécies (Chen and Inouye, 1994; Karlin *et al.*, 1998; Sharp and Li, 1987), de modo que a eficiência da expressão do gene heterólogo poderá ser desfavorecida ou favorecida conforme o conteúdo dos seus códons, de uso raro ou preferencial do hospedeiro (Chen and Inouye 1994; Saier, 1995).

Nesse sentido, visando uma melhor produção da Pró-quimosina bovina B, uma proteína de origem animal, em *L. lactis*, decidiu-se pela confeção de uma ORF sintética da mesma modificada para códons preferências de *L. lactis*.

A representação esquemática do vetor construído contendo a ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B modificada encontra-se na Figura 4.

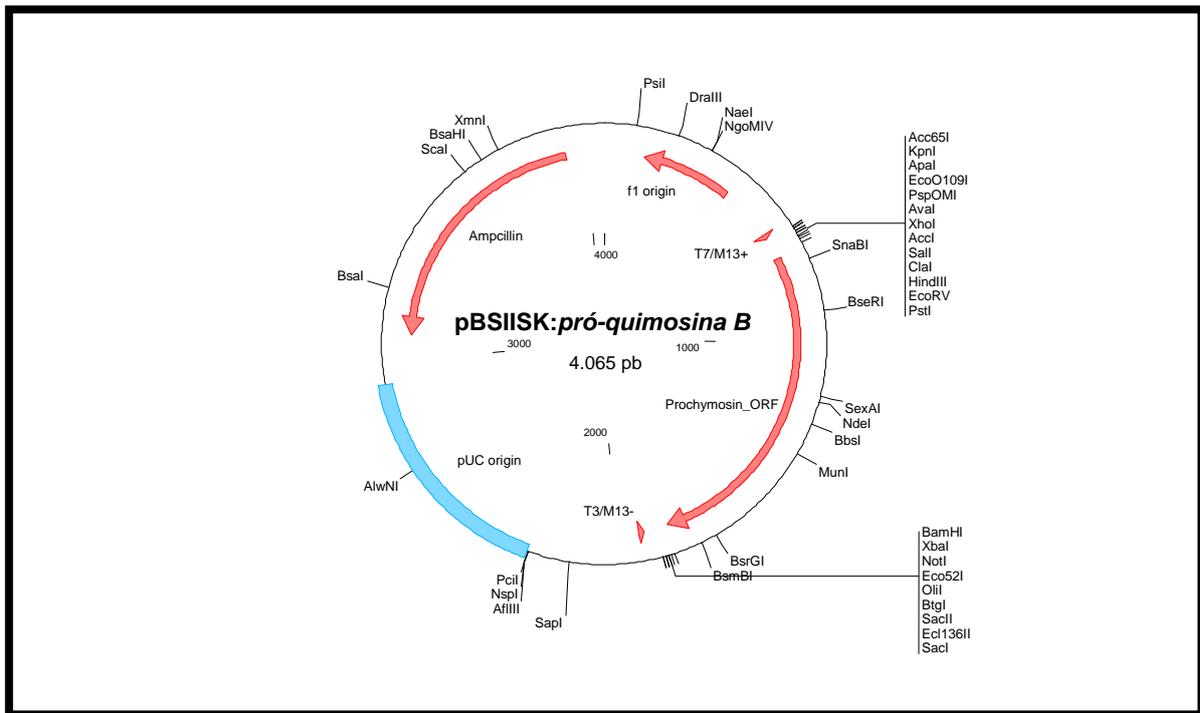


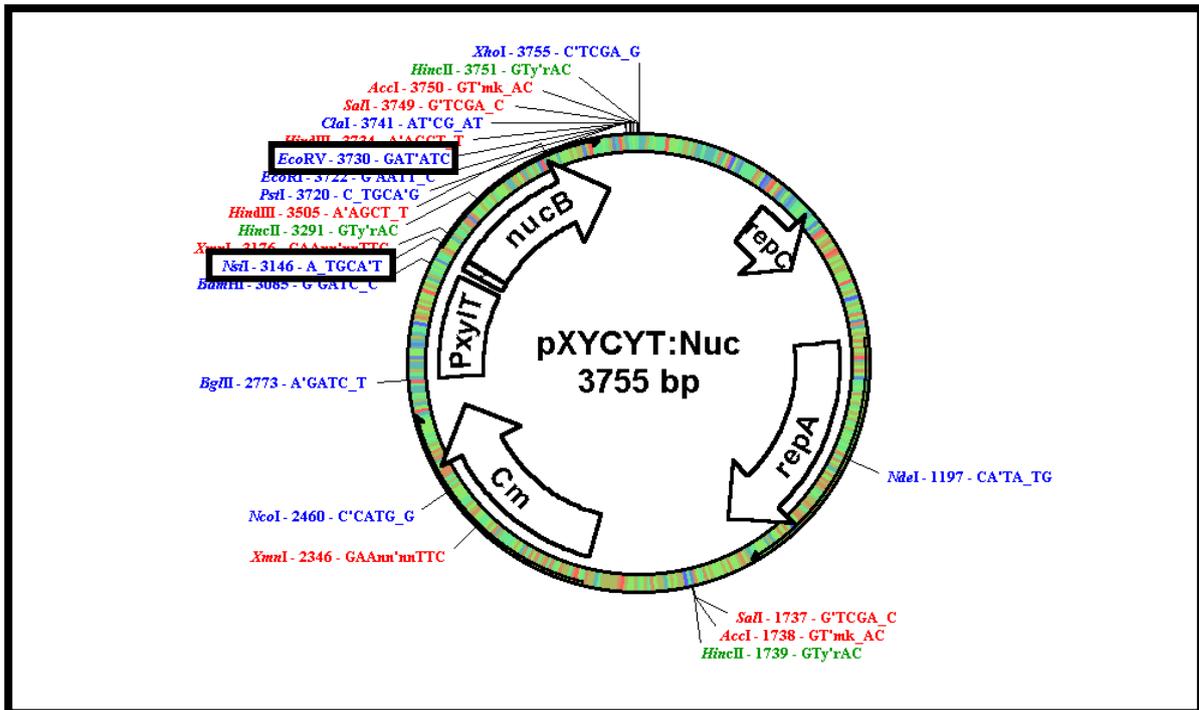
Figura 4 – Representação esquemática do vetor pBSIISK:pró-quimosina B.

### III.3.1.2. Amplificação da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B com códons preferenciais de *L. lactis*

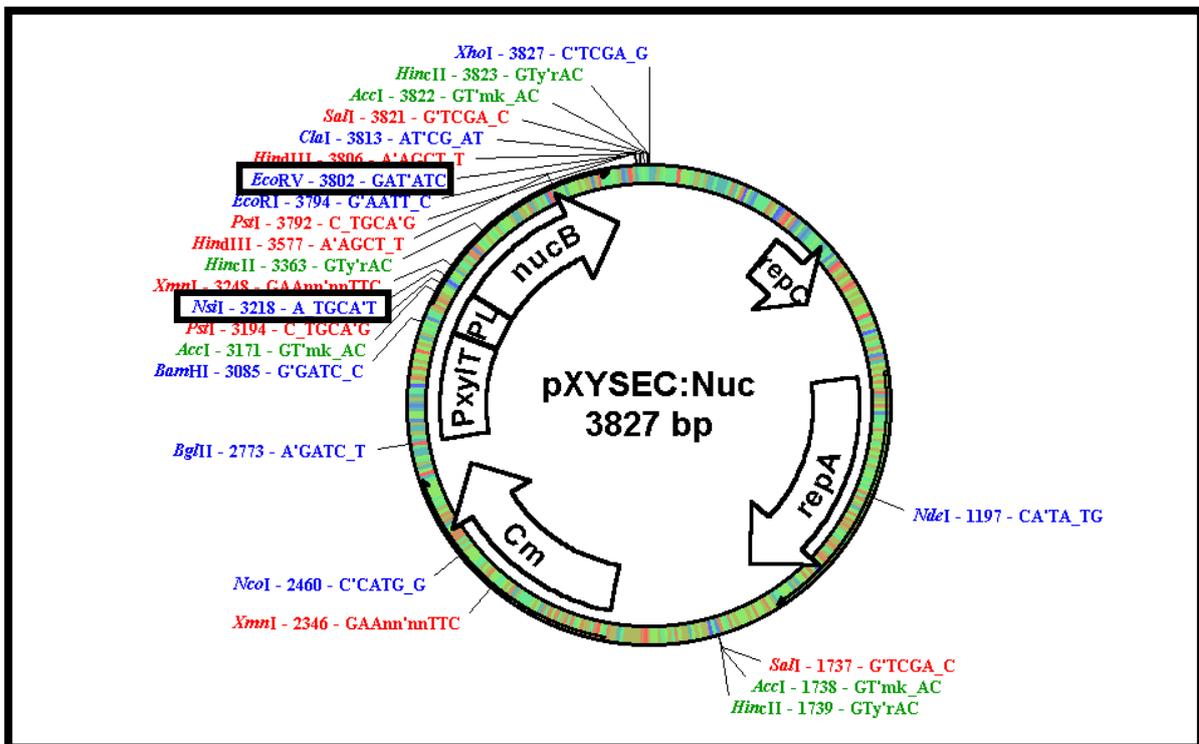
Inicialmente foi realizada a amplificação da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B por PCR, a partir do plasmídeo pBSIISK:pró-quimosina B.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Tabela 3) foram desenhados de forma complementar a seqüência codificadora da pró-quimosina B modificada para códons preferências de *L. lactis*.

Sítios de restrição artificiais para as enzimas *NsiI* e *EcoRV* foram acrescentados aos oligonucleotídeos iniciadores para que a referida ORF pudesse ser clonada, de forma direcional e em fase de leitura correta, nos vetores de expressão pXyIT:CYT:nuc e pXyIT:SEC:nuc de *L. lactis* (sistema XIES; Figuras 5 e 6).



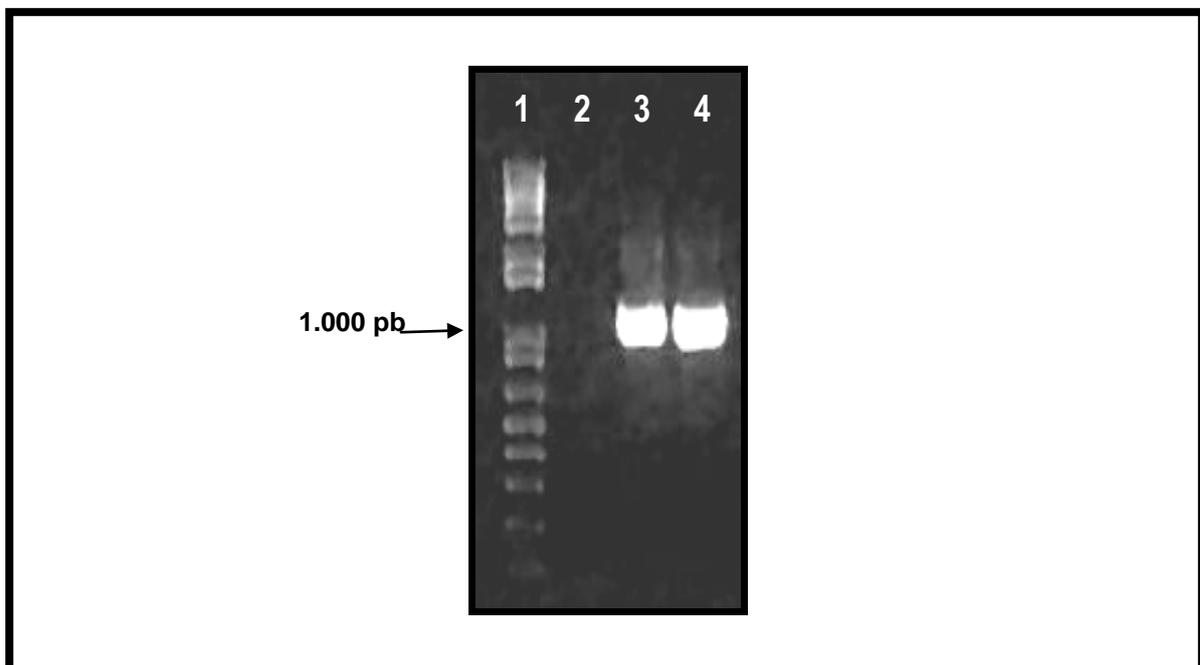
**Figura 5** – Representação esquemática do vetor de expressão do sistema XIES para endereçamento citoplasmático (pXYIT:CYT:nuc) de proteínas. Destaque para a localização dos sítios de clivam das enzimas de restrição *NsiI* e *EcoRV*, utilizadas para clonagem da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B.



**Figura 6** – Representação esquemática do vetor de expressão do sistema XIES para endereçamento extracelular (pXYIT:SEC:nuc) de proteínas. Destaque para a localização dos sítios de clivam das enzimas de restrição *NsiI* e *EcoRV*, utilizadas para clonagem da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B.

Para a reação de amplificação foi utilizada a enzima Accuprime™ Pfx DNA Polimerase (Invitrogen), cuja atividade é altamente estável e de alta especificidade e precisão, sendo, assim, ideal para amplificações por PCR que requerem taxas mínimas de mutações durante a incorporação de nucleotídeos.

Sendo assim, observou-se a amplificação de dois fragmentos de DNA de aproximadamente 1.098 pb, como o esperado para a da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B utilizando as duas combinações de pares de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 3). Os fragmentos amplificados, quando visualizados em gel de agarose, corado com brometo de etídio, apresentaram forte intensidade, demonstrando uma alta eficiência de amplificação (Figura 7). Além disso, não foi observada a presença de produtos inespecíficos de amplificação. Como controle negativo das reações, foram utilizados os três iniciadores (o oligonucleotídeo iniciador senso da forma citoplasmática, o oligonucleotídeo iniciador senso da forma secretada e o oligonucleotídeo iniciador anti-senso comum a ambas as formas), e água utrapura estéril ao invés do plasmídeo pBSIISK:*pró-quimosina B*. Como esperado, o controle negativo não apresentou nenhum sinal de amplificação (Figura 7).



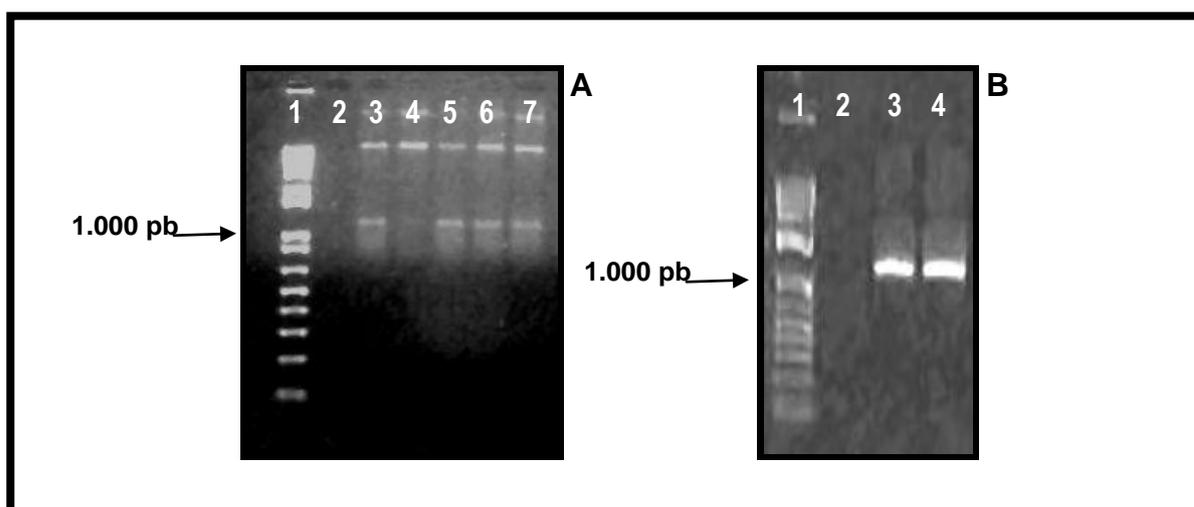
**Figura 7** – Análise do produto da amplificação por PCR da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B. Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio mostrando o produto amplificado referente a ORF *pró-quimosina bovina B*. Coluna 1, Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); coluna 2, controle negativo da reação; e colunas 3 e 4, produto da amplificação da *pró-quimosina bovina B* (1.098 pb) utilizando oligonucleotídeos iniciadores das formas citoplasmática e secretada, respectivamente.

### III.3.1.3. Clonagem da ORF codificadora da Pró-quimosina bovina B no sistema TOPO

Os dois fragmentos amplificados foram clonados no vetor pCR<sup>®</sup> - II-TOPO<sup>®</sup>, gerando os plasmídeos pCR II-TOPO:*pró-quimosina B*:CYT e pCR II-TOPO:*pró-quimosina B*:SEC.

Estes plasmídeos foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10. Colônias oriundas da transformação foram selecionadas aleatoriamente e cultivadas. O DNA plasmidiano foi extraído e utilizado como molde para confirmar a clonagem do inserto através de uma reação de PCR utilizando os iniciadores específicos da ORF *pró-quimosina B*. Sete clones, 5 da construção pCR II-TOPO:*pró-quimosina B*:CYT e 2 da construção pCR II-TOPO:*pró-quimosina B*:SEC foram confirmados, como sendo portadores do inserto correspondente à ORF *pró-quimosina B* (1.098 pb).

O produto da amplificação pode ser observado na Figura 8.



**Figura 8** – Amplificação por PCR da ORF *pró-quimosina bovina B* a partir do DNA plasmidiano extraído de células de *E. coli* transformadas com os plasmídeos pCR II-TOPO:*pró-quimosina B*:CYT e pCR II-TOPO:*pró-quimosina B*:SEC. Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. A: Colunas 1, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); coluna 2, controle negativo; e colunas 3-7, inserto *pró-quimosina B* amplificado a partir do plasmídeo pCR II-TOPO:*pró-quimosina B*:CYT. B: Coluna 1, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); coluna 2, controle negativo; e colunas 3 e 4, inserto *pró-quimosina B* amplificado a partir do plasmídeo pCR II-TOPO:*pró-quimosina B*:SEC.

A geração desses “plasmídeos intermediários” é importante, haja vista que a digestão enzimática destes plasmídeos libera insertos com extremidades coesivas que permitem com que os mesmos sejam clonados de forma direcional nos vetores de expressão de *L. lactis*.

### III.3.2. Clonagem da ORF *pró-quimosina B* no sistema de expressão XIES

A escolha pelo sistema de expressão XIES (Miyoshi *et al.*, 2004) baseou-se em algumas características vantajosas, apresentadas por este, em relação a outros sistemas de expressão já desenvolvidos para *L. lactis*. Esse sistema permite endereçar corretamente proteínas heterólogas tanto para o citoplasma quanto para o meio extracelular, e é menos dispendioso e mais seguro para o uso humano e animal, visto que o mesmo é induzido por um açúcar.

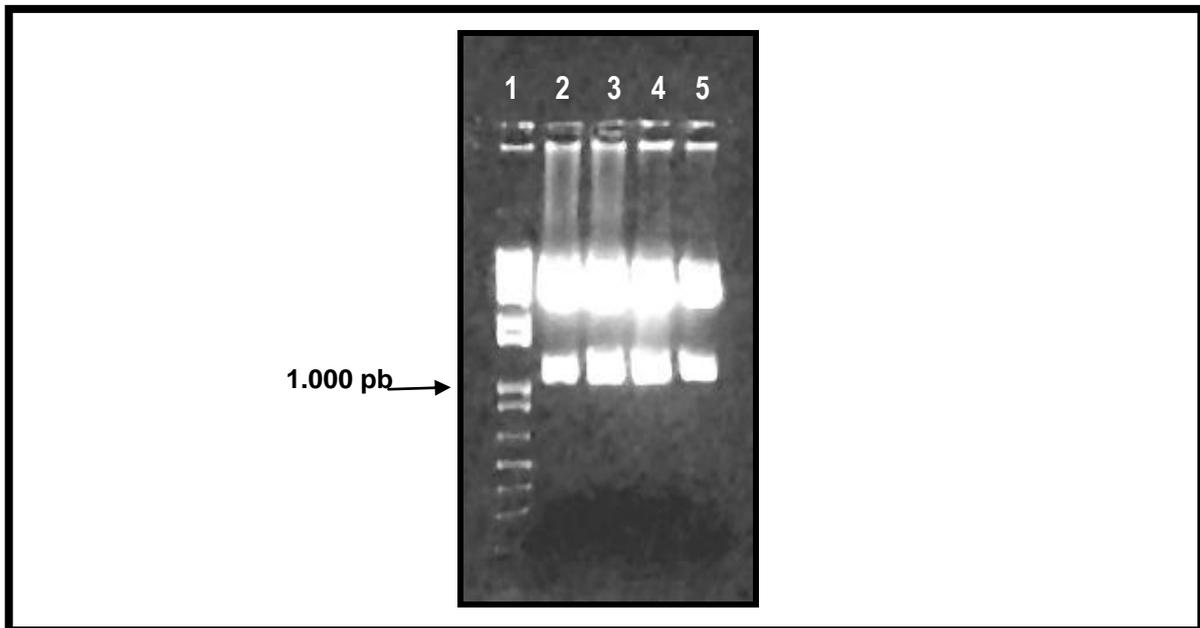
Paralelamente à digestão enzimática dos clones pCR II-TOPO:*pró-quimosina B:CYT* e pCR II-TOPO:*pró-quimosina B:SEC* (Fig. 9) e à purificação dos fragmentos correspondentes aos insertos *pró-quimosina B:CYT* citoplasmático e *pró-quimosina B:SEC* secretado, os vetores de expressão pXyIT:CYT:*nuc* (citoplasmático) e pXyIT:SEC:*nuc* (secretado) foram também digeridos com as enzimas *Nsi*I e *Eco*RV para liberação da ORF *nuc* e posterior purificação dos fragmentos pXyIT:CYT e pXyIT:SEC. Os fragmentos purificados (vetores e insertos) foram então submetidos a uma reação de ligação.

Os produtos de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10. A seleção de colônias de *E. coli* transformadas com esses plasmídeos foi realizada em meio 2xYT ágar contendo 10 µg.mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol. A visualização das colônias foi feita com aproximadamente 48 horas após a transformação. Foram observadas colônias transformadas com o plasmídeo pXyIT:CYT:*pró-quimosina B* e com o plasmídeo pXyIT:SEC:*pró-quimosina B*.

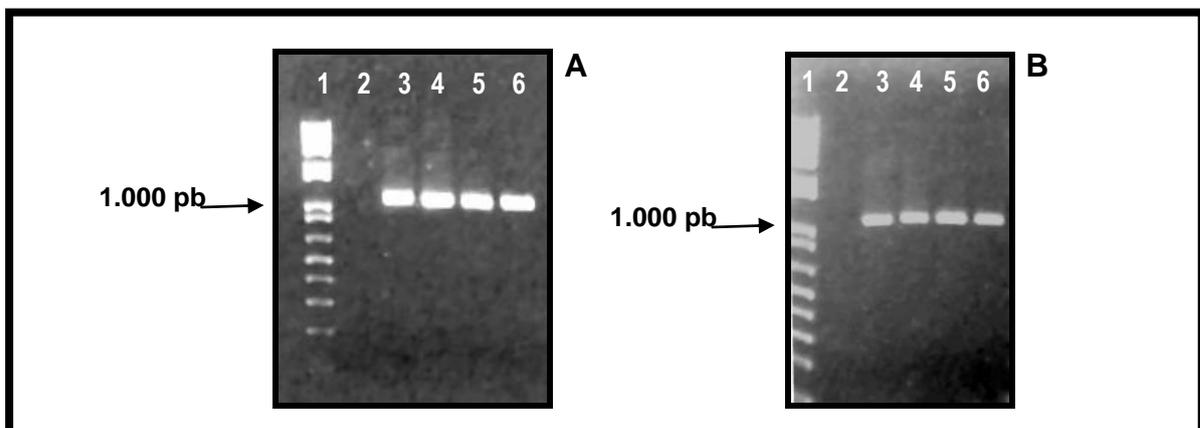
Todas as colônias foram inoculadas em meio líquido com cloranfenicol e incubadas a 37° C sob agitação *overnight*. Essas culturas foram então utilizadas para fazer uma cultura estoque em glicerol de cada possível clone e para a realização da extração dos plasmídeos recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação.

Os plasmídeos extraídos de cada colônia foram utilizados em reações de PCR utilizando os iniciadores específicos da ORF *pró-quimosina B*. Todos os clones obtidos foram confirmados como sendo portadores das ORFs *pró-quimosina B:CYT* e *pró-quimosina B:SEC*. A Figura 10 mostra os produtos de amplificação dos

insertos citoplasmático e secretado, respectivamente, provenientes de 4 clones escolhidos aleatoriamente.



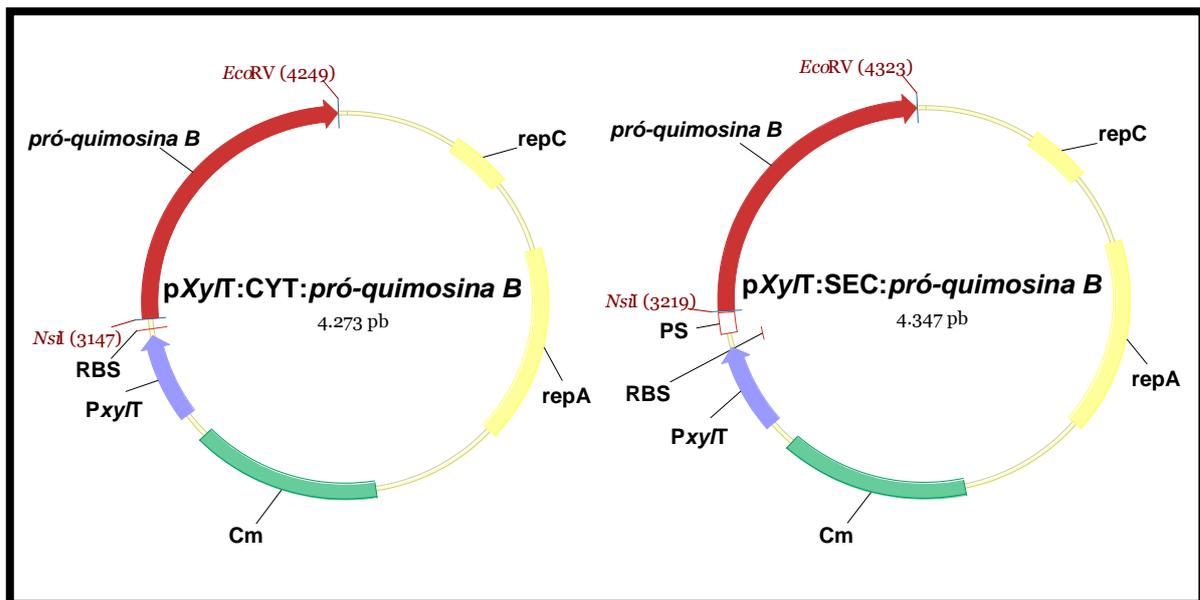
**Figura 9** – Digestão enzimática dos plasmídeos pCR II-TOPO:*pró-quimosina B:CYT* e pCR II-TOPO:*pró-quimosina B:SEC*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Coluna 1, Marcador de Peso Molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); colunas 2 e 3, o produto da digestão dos clones pCR II-TOPO:*pró-quimosina B:CYT*; e colunas 4 e 5, produto da digestão dos clones pCR II-TOPO:*pró-quimosina B:SEC*.



**Figura 10** – Amplificação por PCR da ORF *pró-quimosina B* a partir do DNA plasmidiano extraído de células de *L. lactis* transformadas com os plasmídeos pXylT:CYT:*pró-quimosina B* e pXylT:SEC:*pró-quimosina B*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A: Coluna 1, Marcador de Peso Molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); coluna 2, controle negativo; e colunas 3-6, inserto *pró-quimosina B* amplificado a partir dos clones pXylT:CYT:*pró-quimosina B*. B: Coluna 1, Marcador de Peso Molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); coluna 2, controle negativo; e colunas 3-6, inserto *pró-quimosina B* amplificado a partir dos clones pXylT:SEC:*pró-quimosina B*.

### III.3.2.1. Seqüenciamento dos vetores construídos

Uma vez confirmado os clones recombinantes, foi realizado o seqüenciamento de dois deles a fim de verificar a integridade da seqüência nucleotídica da ORF clonada nos vetores de expressão (Figura 11). Sendo escolhido, aleatoriamente, um clone de cada construção (*pXyIT:CYT:pró-quimosina B* e *pXyIT:SEC:pró-quimosina B*). Ambos apresentaram suas seqüências fiéis a ORF *pró-quimosina B* com códons preferenciais para *L. lactis*. Sendo estes clones então utilizados para dar continuidade aos experimentos.



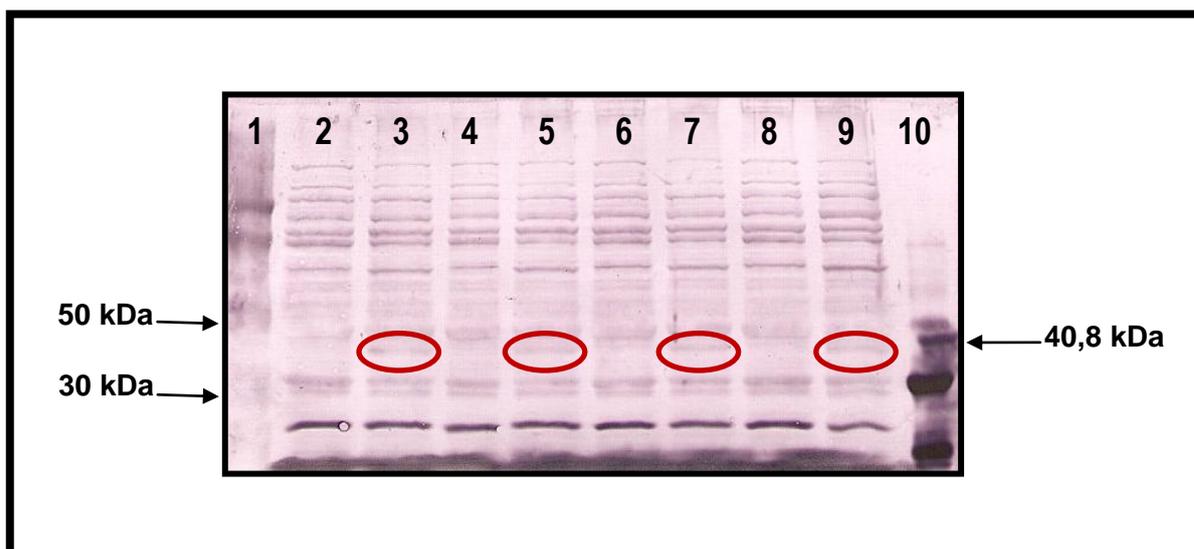
**Figura 11** – Representação dos vetores de expressão *pXyIT:CYT:pró-quimosina B* e *pXyIT:SEC:pró-quimosina B*. *PxyIT*: Promotor induzido por xilose. RBS: Sítio de ligação do ribossomo da seqüência codificadora da proteína Usp45 de *L. lactis*. PS: Peptídeo sinal da proteína Usp45. *NsiI* e *EcoRV*: Sítio para as enzimas de restrição *NsiI* e *EcoRV*. *pró-quimosina B*: Seqüência codificadora da Pró-quimosina bovina B. *repA* e *repC*: origens de replicação. *Cm*: Gene que confere resistência ao cloranfenicol. Ilustração gerada pelo programa Vector NTI 8.0 (InforMax).

### III.3.3. Análise da produção da Pró-quimosina bovina B pelas linhagens recombinantes de *L. lactis* NCDO2118

A capacidade de produção e correto endereçamento da Pró-quimosina bovina B produzida por *L. lactis*, utilizando o sistema XIES, foi analisada através das técnicas de SDS-PAGE e *Western blotting* utilizando anticorpos anti-Quimosina para a imunodeteção da proteína recombinante.

Para a obtenção do soro anti-Quimosina, camundongos BALB/c foram imunizados com Quimosina bovina purificada (Sigma). Um ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) foi realizado utilizando o soro pré-imune dos animais e o soro obtido ao final do experimento para verificar a presença de anticorpos anti-Quimosina. Constatou-se que a imunização dos camundongos com Quimosina bovina induziu uma forte resposta de anticorpos específicos no grupo de animais estudados. Pôde-se observar que a imunização induziu a síntese de anticorpos capazes de reconhecer a Quimosina. Havendo diferença significativa nos títulos de anticorpos IgG entre o soro obtido antes da imunização e após a imunização dos animais (dados não demonstrados).

Através do experimento de imunodeteção foi possível confirmar que 4 clones avaliados de *L. lactis* NCDO2118 (*pXyIT:CYT:pró-quimosina B*) foram capazes de produzir a Pró-quimosina bovina B, como demonstrado na Figura 12.



**Figura 12** – Imunodeteção da rPró-quimosina bovina B a partir das proteínas extraídas da fração celular dos clones de *L. lactis* NCDO2118 (*pXyIT:CYT:pró-quimosina B*). Coluna 1, Marcador de peso molecular - *Full range Rainbow™ recombinant protein molecular weight marker* (Amersham Biosciences); colunas 2 e 3, clone 1 - não induzido e induzido, respectivamente; colunas 4 e 5, clone 2 - não induzido e induzido, respectivamente; colunas 6 e 7, clone 3 - não induzido e induzido, respectivamente; colunas 8 e 9, clone 4 - não induzido e induzido, respectivamente; e coluna 10, controle: proteína Quimosina bovina purificada (Sigma). A marcação em vermelho destaca o fragmento protéico referente à rPró-quimosina bovina B. Trinta microlitros de cada amostra e oito microlitros do controle foram depositados nas canaletas. A membrana foi revelada utilizando-se soro de camundongo anti-Quimosina bovina (1:100).

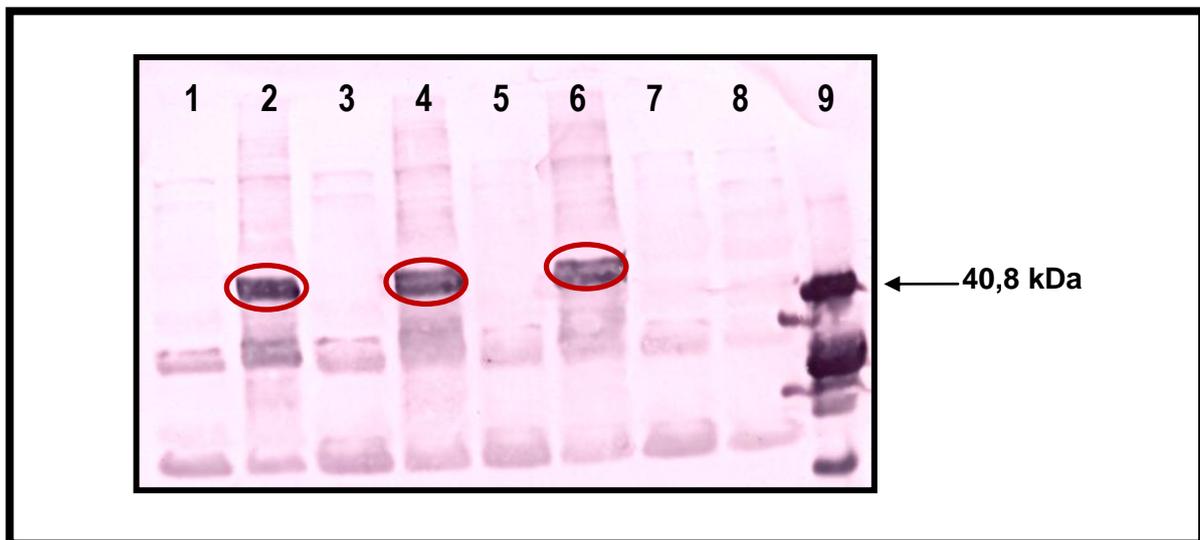
As culturas crescidas em presença de glicose (não induzidas; colunas 2, 4, 6 e 8) não foram capazes de produzir a proteína. Porém, aquelas culturas crescidas na presença de xilose (induzidas; colunas 3, 5, 7 e 9) foram capazes de sintetizar a

proteína. Quando avaliado a presença da mesma no meio extracelular destas culturas não foi encontrada (dados não demonstrados) Como esperado, a Pró-quimosina bovina B ficou retida no interior da célula, o que está de acordo com o esperado, já que o vetor de expressão, pXyIT:CYT, não possui peptídeo sinal para a exportação da mesma.

Quando avaliada a presença da proteína recombinante no meio extracelular do cultivo das linhagens *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B), esta não foi encontrada nem em sua forma ativa e nem mesmo como pró-enzima (dados não demonstrados). Deste modo foi necessário realizar uma nova extração protéica, não mais utilizando o sobrenadante das culturas, mas a fração celular, para confirmar a produção da proteína heteróloga, caso esta não estivesse sendo secretada.

O resultado da imunodeteção (Figura 13) demonstrou que três dos quatro clones analisados, quando cultivados em presença de xilose apresentaram uma proteína maior que 40,8 kDa (colunas 2, 4 e 6) que não foi observada quando as mesmas culturas foram cultivadas em presença de glicose. É esperado que a Pró-quimosina bovina B, produzida pela linhagem de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B) apresente um peso molecular superior a 40,8 kDa, uma vez que esta proteína é sintetizada fusionada ao peptídeo sinal da proteína Usp45 de *L. lactis*, adquirindo, assim, um peso molecular de 43 kDa. A Pró-quimosina B não esta sendo secretada por *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B) provavelmente devido a conformação que esta proteína adquiriu, pois segundo Le Loir e cols. (2005) esta é a característica que predominantemente prejudica a eficiência de secreção.

A linhagem de *L. lactis* construída para a produção da Pró-quimosina bovina B na forma secretada apresentou nível de produção superior ao nível obtido pela linhagem de *L. lactis* construída para produção citoplasmática. Este dado é condizente com o descrito na literatura. Linhagens recombinantes de *L. lactis*, produtoras da proteína repórter Nuc (nuclease de *S. aureus*; apresentaram maior produção da proteína em construções para secreção, utilizando tanto promotores induzíveis quanto constitutivos (Bermudez-Humaran *et al.*, 2003; Le Loir *et al.*, 2005).



**Figura 13** – Imunodeteção da rPró-quimosina bovina B a partir das proteínas extraídas da fração celular dos clones de *L. lactis* NCDO2118 (*pXylT:SEC:pró-quimosina B*). Colunas 1 e 2, clone 1 - não induzido e induzido, respectivamente; colunas 3 e 4, clone 2 - não induzido e induzido, respectivamente; colunas 5 e 6, clone 3 - não induzido e induzido, respectivamente; colunas 7 e 8, clone 4 - não induzido e induzido, respectivamente; e coluna 10, controle: proteína Quimosina bovina purificada (Sigma). A marcação em vermelho destaca o fragmento protéico referente à rPró-quimosina bovina B. Trinta microlitros de cada amostra e oito microlitros do controle foram depositados nas canaletas. A membrana foi revelada utilizando-se soro de camundongo anti-Quimosina bovina (1:100).

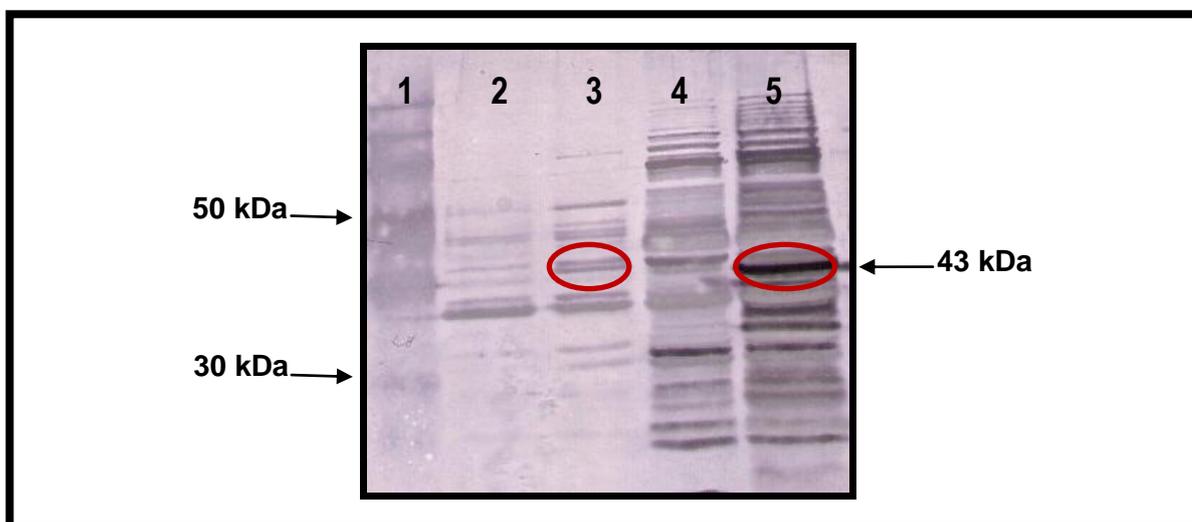
### III.3.3.1. Avaliação do endereçamento da Pró-quimosina bovina B secretada

A secreção de proteínas em *L. lactis* ocorre, via Sec-dependente, pela síntese de um precursor composto pela proteína a ser exportada fusionada a um peptídeo sinal, uma seqüência hidrofóbica na porção N-terminal. Esse precursor é reconhecido pela maquinaria de secreção e é translocado através da membrana citoplasmática. O peptídeo sinal é, então, clivado e degradado, e a proteína madura é liberada para o meio extracelular (Dieye *et al.*, 2001).

Como não foi detectada a presença da Pró-quimosina bovina B no meio extracelular das culturas induzidas da linhagem *L. lactis* NCDO2118 (*pXylT:SEC:pró-quimosina B*), mas apenas na fração celular, o endereçamento da proteína recombinante foi avaliado. Para isso, foi realizada uma nova extração protéica da linhagem de *L. lactis* NCDO2118 (*pXylT:SEC:pró-quimosina B*). Culturas não induzida e induzida, foram submetidas à extração protéica das frações celular e

citoplasmática e submetidas à imunodeteccção com soro anti-Quimosina, no intuito de identificar o compartimento em que a proteína recombinante esta sendo retida.

A imunodeteccção demonstrou (Figura 14) que a maior concentração de Pró-quimosina B encontra-se na fração celular, apresentando uma quantidade muito superior a detectada na fração citoplasmática. E como a única diferença entre o conteúdo protéico dessas duas frações extraídas é a presença das proteínas da membrana citoplasmática e parede celular (na fração celular), este resultado sugere que a proteína recombinante deve estar sendo direcionada a membrana celular pelo peptídeo sinal, e como esta não esta sendo secretada, provavelmente esteja ficando retida junto ao envelope celular.



**Figura 14** – Imunodeteccção para avaliação do endereçamento da rPró-quimosina bovina B produzido pela linhagem *L. lactis* NCDO2118 (*pXylIT:SEC:pró-quimosina B*). Coluna 1, Marcador de peso molecular - *Full range Rainbow™ recombinant protein molecular weight marker* (Amersham Biosciences); colunas 2 e 3, proteínas extraídas da fração citoplasmática, não induzido e induzido, respectivamente; e colunas 4 e 5, proteínas extraídas da fração celular, não induzido e induzido, respectivamente. A marcação em vermelho destaca o fragmento protéico referente à rPró-quimosina bovina B. Trinta microlitros de cada amostra foram depositados em cada canaleta. A membrana foi revelada utilizando-se soro de camundongo anti-Quimosina bovina (1:100).

### III.3.4. Detecção da atividade proteolítica da proteína recombinante produzida por *L. lactis*

Como apenas a Pró-quimosina B (40,8 kDa) foi detectada nas linhagens recombinantes de *L. lactis*, não sendo identificada a presença de sua forma madura, a Quimosina (35,6 kDa), testes sobre atividade proteolítica foram realizados para verificar a presença da enzima na sua forma ativa.

### **III.3.4.1. Avaliação da capacidade de coagulação e atividade proteolítica da Quimosina bovina B (ensaio em placa)**

As culturas não induzidas e induzidas de *L. lactis* NCDO2118 (pXyT:CYT:pró-quimosina B), *L. lactis* NCDO2118 (pXyT:SEC:pró-quimosina B) e *L. lactis* NCDO2118 (controle negativo) foram adicionadas em forma de spots em placas contendo, além do meio de cultura, caseína, no intuito detectar a Quimosina B através da sua capacidade de coagulação do leite e a atividade proteolítica. Assim sendo, as linhagens foram avaliadas em três formas: aplicação direta da cultura, do sobrenadante e do lisado celular sobre o meio de cultura.

Ao redor de cada spot foi observado um halo opaco e esbranquiçado, característico de coagulação, seguido de outro halo opaco e translúcido, característico de atividade proteolítica, não sendo observada diferença entre os halos encontrados nas linhagens recombinantes com os produzidos pela linhagem selvagem, utilizada como controle. Os resultados foram iguais em todas as linhagens, independente de indução ou fração utilizada para análise.

### **III.3.4.2. Determinação da atividade azocaseinolítica (quantitativa) e zimograma (semi-quantitativa)**

Para determinar a atividade proteolítica (quantitativa e semi-quantitativa) da Quimosina bovina B produzida por *L. lactis*, culturas não induzidas e induzidas das linhagens recombinantes de *L. lactis* [*L. lactis* NCDO2118 (pXyT:CYT:pró-quimosina B) e *L. lactis* NCDO2118 (pXyT:CYT:pró-quimosina B)], assim como da linhagem selvagem (*L. lactis* NCDO2118), utilizada como controle negativo, foram submetidas a extração de proteínas das frações celular, secretada e protoplasto.

A análise quantitativa das amostras foi realizada em quatro diferentes pH (4,6; 5,6; 6,5 e 7,5), no entanto, a Quimosina bovina utilizada como controle, mostrou atividade apenas no pH 6,5 após 90 e 120 minutos de reação com azocaseína, gerando os seguintes valores:

Em análise estatística, os dados (Tabela 4) não apresentaram diferença significativa, tendo sido detectando, provavelmente, apenas a atividade de protease endógenas a linhagem selvagem (*L. lactis* NCDO2118) (Wang *et al.*, 1998; Kok, 1990).

Como o pH 6,5 mostrou-se melhor para identificação da atividade da Quimosina controle, este pH foi escolhido para ser trabalhado na revelação do gel de poliacrilamida do zimograma da Quimosina recombinante.

Para analisar o zimograma, as proteínas extraídas foram separadas por SDS-PAGE utilizando um gel polimerizado com caseína. Após a resolução eletroforética o gel foi imerso em solução de Triton X-100 por 2 horas para a retirada do SDS, o reagente desnaturante, para que as proteínas retornassem a sua conformação original. Posteriormente a esta etapa, o gel foi revelado por imersão em tampão fosfato pH 6,5 na concentração de 50 mM, o pH de melhor atuação da enzima em estudo. Esperava-se encontrar sobre a Quimosina a presença de um halo translúcido, referente à degradação da  $\kappa$ -caseína contida no gel. No entanto este resultado não foi observado nem mesmo sobre o controle positivo, a Quimosina bovina purificada. Provavelmente a quantidade de  $\kappa$ -caseína utilizada no experimento não tenha sido suficiente para a gerar o halo translúcido, ou ainda, que ao produto da clivagem da  $\kappa$ -caseína não tenha conseguido ultrapassar a malha do gel em direção a solução por tratar-se de fragmentos com alto peso molecular.

**Tabela 4:** Valores obtidos pela leitura da  $A_{420}$  das amostras após 90 e 180 minutos de reação com azocaseína em pH 6,5.

90 minutos	Quimosina	Quimosina	Wt I	Wt I	Wt NI	Wt NI	Ct I	Ct I	Ct NI	Ct NI	Sc I	Sc I	Sc NI	Sc NI
Extra Celular	-	-	0,041	0,035	0,021	0,018	0,017	0	0,004	0,01	0	-	0,011	0,145
Fração Celular	-	-	1,438	1,403	1,416	1,424	1,417	-	1,435	1,451	1,442	1,454	1,465	1,454
Protoplasto	-	-	0,015	0,006	-0,025	-0,013	-0,034	-0,018	-0,036	-0,035	-0,005	-0,002	-0,022	-0,018
Purificada	0,056	0,064												

180 minutos	Quimosina	Quimosina	Wt I	Wt I	Wt NI	Wt NI	Ct I	Ct I	Ct NI	Ct NI	Sc I	Sc I	Sc NI	Sc NI
Extra Celular	-	-	0,033	0,03	0,044	0,042	0,049	0,073	0,051	0,057	0,032	0,026	0,027	0,039
Fração celular	-	-	1,595	1,597	1,604	1,605	1,585	1,58	1,592	1,588	1,587	1,594	1,597	1,596
Protoplasto	-	-	0,007	0,008	0,006	0,03	0,008	0,004	0,009	0,006	0,005	0,006	0,011	0,006
Purificada	0,042	0,05												

Wt – *L. lactis* NCDO2118 (selvagem)

Ct – *L. lactis* NCDO2118 pXylT:CYT:pró-quimosina B

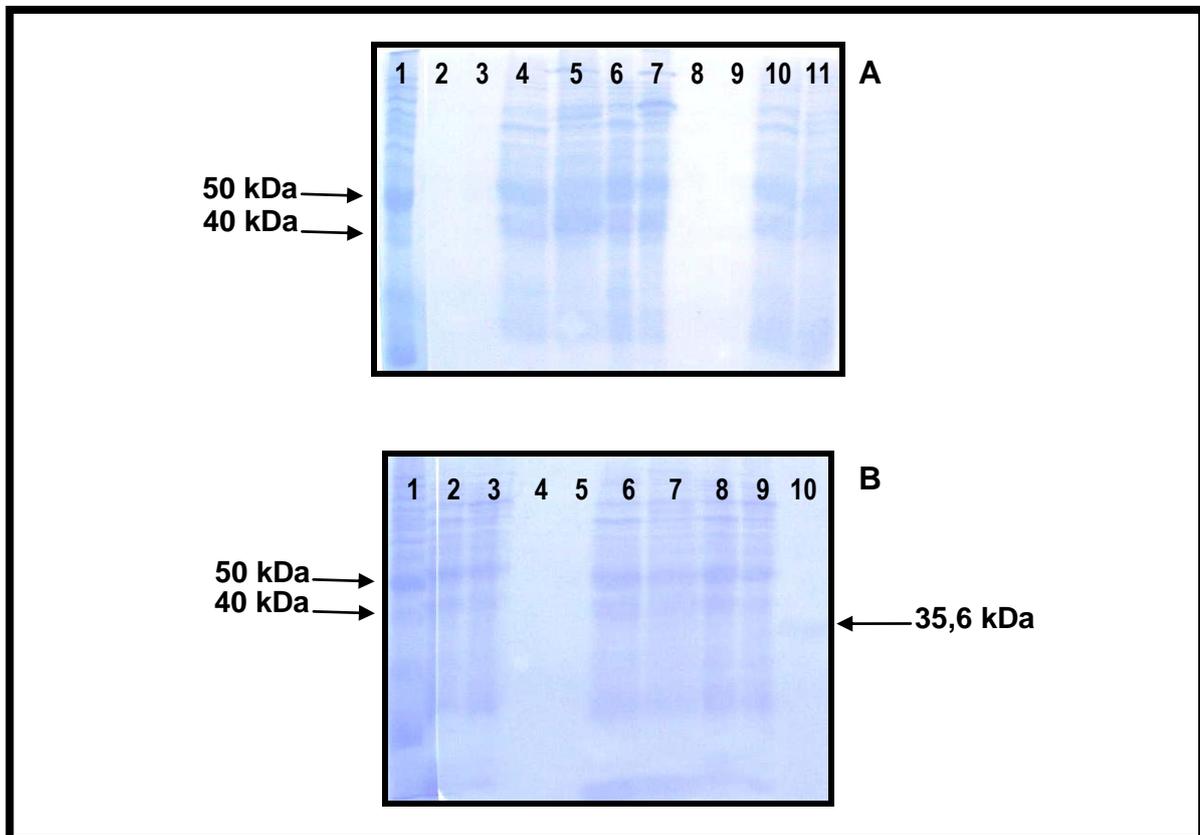
Sc – *L. lactis* NCDO2118 pXylT:SEC:pró-quimosina B

Quimosina – Quimosina bovina purificada (Sigma)

I – induzido

NI- não induzido.

Devido aos resultados obtidos, o experimento foi repetido, utilizando um tampão fosfato na de concentração de 200 mM pH 6,5, com o objetivo de favorecer a atividade da Quimosina. No entanto, nenhuma atividade proteolítica foi detectada, como mostra a Figura 15.



**Figura 15** – Zimograma sobre a atividade proteolítica das proteínas extraídas das frações secretada, celular e protoplasto das linhagens de *L. lactis* (pXyIT:CYT:pró-quimosina B e pXyIT:SEC:pró-quimosina B) sobre a caseína. A: Coluna 1, BenchMark Protein Ladder (Invitrogen); colunas 2 e 3, controle negativo: proteínas extraídas da fração secretada de *L. lactis* NCDO2118, não induzida e induzida, respectivamente; colunas 4 e 5, controle negativo: proteínas extraídas da fração celular de *L. lactis* NCDO2118, não induzida e induzida, respectivamente; colunas 6 e 7, controle negativo: proteínas extraídas do protoplasto de *L. lactis* NCDO2118, não induzida e induzida, respectivamente; colunas 8 e 9, proteínas extraídas da fração secretada de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:pró-quimosina B), não induzida e induzida, respectivamente; e colunas 10 e 11, proteínas extraídas da fração celular de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:pró-quimosina B), não induzida e induzida, respectivamente. B: Coluna 1, BenchMark Protein Ladder (Invitrogen); colunas 2 e 3, proteínas extraídas do protoplasto de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:pró-quimosina B) não induzida e induzida, respectivamente; colunas 4 e 5, proteínas extraídas da fração secretada de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B), não induzida e induzida, respectivamente; colunas 6 e 7, proteínas extraídas da fração celular de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B), não induzida e induzida, respectivamente; colunas 8 e 9, proteínas extraídas do protoplasto de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:pró-quimosina B), não induzida e induzida, respectivamente; e coluna 10, controle positivo: Quimosina bovina purificada (Sigma).

A ausência de atividade proteolítica no controle positivo sugere que a atividade das enzimas está sofrendo algum tipo de interferência durante alguma

etapa deste experimento. De modo que faz-se necessário a padronização deste experimento para a enzima em estudo.

### III.4. Conclusão

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem chegar às seguintes conclusões:

1. As linhagens recombinantes [*L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:pró-quimosina B) e *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B)] aqui construídas foram capazes de produzir a Pró-quimosina bovina B na forma citoplasmática e secretada.

2. *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B) apresentou maior produção de Pró-quimosina bovina B que *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:pró-quimosina B).

3. A linhagem de *L. lactis* construída para a secreção da proteína para o meio extracelular não foi capaz de secretar a Pró-quimosina bovina B, ficando esta retida junto ao envelope celular.

4. A Pró-quimosina não foi capaz de converter-se em sua forma ativa, a Quimosina.

**IV**  
**ESTRATÉGIA 2**

## IV. ESTRATÉGIA 2

### **Construção de Linhagens de *L. Lactis* Produtoras da Forma Secretada da Quimosina bovina A e B**

Esta segunda estratégia surgiu como uma possível alternativa a “Estratégia 1”. Uma vez que as linhagens de *L. lactis* construídas na estratégia anterior apresentaram certas limitações, como a baixa quantidade da Pró-quimosina produzida pela linhagem recombinante de *L. lactis* com endereçamento citoplasmático, a não secreção da Pró-quimosina pela linhagem recombinante com endereçamento exportado, e principalmente a não conversão do precursor, Pró-quimosina em Quimosina, sua forma ativa.

Considerando os maiores níveis de produção encontrados na construção plasmidiana utilizando o vetor para endereçamento secretado, pXy/T:SEC, este foi escolhido para ser utilizado nesta segunda estratégia.

Como a interferência na secreção por *L. lactis* deve-se principalmente a conformação da proteína (Le Loir *et al.*, 2005), vislumbrou-se a produção da molécula da Quimosina, que poderia ser mais suscetível a exportação, e além disso a enzima já seria produzida em sua forma ativa.

A literatura descreve a Quimosina A como possuindo maior afinidade a  $\kappa$ -caseína que a Quimosina B, e conseqüentemente maior atividade proteolítica específica, devido apenas uma diferença: a presença de um aminoácido Ác. Aspártico na posição 244 na Quimosina A enquanto a Quimosina B possui uma Glicina (Mohanty *et al.*, 1999).

Com a aquisição da ORF sintética da *pró-quimosina B* modificada para códons preferências de *L. lactis*, e considerado o pequeno número de nucleotídeos divergentes entre seqüência codificadora da Quimosina A e a B, vislumbrou-se a obtenção da ORF codificadora da Quimosina A com códons preferências de *L. lactis*, utilizando para isso a técnica de mutação sítio-dirigida por *PCR-overlapping* (Ho *et al.*, 1999; Simionatto *et al.*, 2009).

Sendo assim, para esta estratégia vislumbrou-se a construção de linhagens de *L. lactis* produtoras da forma secretada da Quimosina A e Quimosina B.

## IV.1. Objetivos

### IV.1.1. Objetivo Geral

Desenvolver um novo processo de produção e obtenção microbiológica da Quimosina bovina baseado na utilização de linhagens recombinantes de *L. lactis*.

### IV.1.2. Objetivos Específicos

1. Realizar mutação sítio-dirigida para conversão da Quimosina bovina *B*, com códons preferenciais para *L. lactis*, em Quimosina bovina *A*.
2. Clonar as ORFs (*open reading frame*) codificadoras da Quimosina bovina *A* e da Quimosina bovina *B* no vetor de expressão pXyIT:SEC (endereçoamento secretado), do sistema XIES (*Xylose-Inducible-Expression-System*).
3. Obter linhagens de *L. lactis* produtoras da forma secretada da Quimosina bovina *A* e *B*.
4. Avaliar a capacidade de coagulação do leite da Quimosina *A* e *B* produzidas por *L. lactis*.

## **IV.2. Material e Métodos**

### **IV.2.1. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo**

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho, bem como suas características, encontram-se listados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. As linhagens foram cultivadas conforme descrito no item III.2.1..

### **IV.2.2. Manipulação do DNA**

Os procedimentos de biologia molecular empregados foram realizados segundo o item III.2.2..

**Tabela 5:** Linhagens bacterianas utilizadas para realizar a clonagem e expressão da da Quimosina A e Quimosina B em *L. lactis*.

<i>Linhagens</i>	<i>Características</i>	<i>Referências</i>
<i>E. coli</i> TG1 (pXyIT:SEC:nuc)	<i>supE</i> , <i>hsd</i> , $\Delta 5$ , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , F'(traD36 proAB-lacZ $\Delta$ M15); Portadora do plasmídeo pXyIT:SEC:nuc	Coleção <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> TOP10	(F $\phi$ 80d/lacZ $\Delta$ M15 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> -m <sub>k</sub> +) <i>deoR thi-1 supE44</i> $\lambda^-$ <i>gyrA96 relA1</i> )	Invitrogen™
<i>L. Lactis</i> NCDO2118	Linhagem selvagem de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Coleção <sup>a</sup>
<i>L. Lactis</i> NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina A)	Linhagem recombinante de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; Portadora do plasmídeo pXyIT:SEC:quimosina A	Este trabalho
<i>L. Lactis</i> NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina B)	Linhagem recombinante de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; Portadora do plasmídeo pXyIT:SEC:quimosina B	Este trabalho

<sup>a</sup>: Linhagem pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Tabela 6:** Plasmídeos utilizados para realizar a clonagem e expressão da da Quimosina A e Quimosina B em *L. lactis* na forma secretada.

<b>Plasmídeos</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Referências</b>
pBSIISK:pró-quimosina B	Vetor pBluescript II SK (Vetor de clonagem/Amp <sup>r</sup> /pUC ORI) contendo a ORF sintética codificadora da Pró-Quimosina bovina B com códons preferenciais de <i>L. lactis</i>	<i>Epoch Biolabs Inc.</i>
pCR <sup>®</sup> II-TOPO (Blunt)	Vetor de clonagem/Amp <sup>r</sup> -Km <sup>r</sup> /pUC ORI	Invitrogen <sup>™</sup>
pCRII-TOPO:quimosina A	Vetor pCR <sup>®</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup> contendo a ORF codificadora da Quimosina bovina A (forma secretada), com códons preferenciais de <i>L. lactis</i>	Este trabalho
pCRII-TOPO:quimosina B	Vetor pCR <sup>®</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup> contendo a ORF codificadora da Quimosina bovina B (forma secretada), com códons preferenciais de <i>L. lactis</i>	Este trabalho
pXyIT:CYT:nuc	pWV01/Cm <sup>r</sup> ; vetor de expressão contendo o sítio de ligação do ribossomo (RBS) da seqüência codificadora da proteína Usp45 fusionado à ORF da seqüência codificadora da nuclease de <i>Staphylococcus aureus</i> (nuc), sob o controle do promotor P <sub>xyIT</sub>	Miyoshi e cols., 2004
pXyIT:SEC:nuc	pWV01/Cm <sup>r</sup> ; vetor de expressão contendo a seqüência codificadora do peptídeo sinal da proteína Usp45 (SPUsp) fusionada à ORF nuc de <i>S. aureus</i> , sob o controle do promotor P <sub>xyIT</sub>	Miyoshi e cols., 2004
pXyIT:SEC:quimosina A	Vetor de expressão pXyIT:SEC:nuc no qual a ORF nuc foi substituída pela ORF codificadora da Quimosina bovina A, com códons preferenciais de <i>L. lactis</i>	Este trabalho

---

p*XylIT*:SEC:quimosina B    Vetor de expressão p*XylIT*:SEC:*nuc* no qual a ORF *nuc* foi substituída pela ORF codificadora da Quimosina bovina B, com códons preferenciais de *L. lactis*

---

Amp<sup>r</sup>: confere resistência à ampicilina; Km<sup>r</sup>: confere resistência à canamicina; Cm<sup>r</sup>: confere resistência à cloranfenicol.

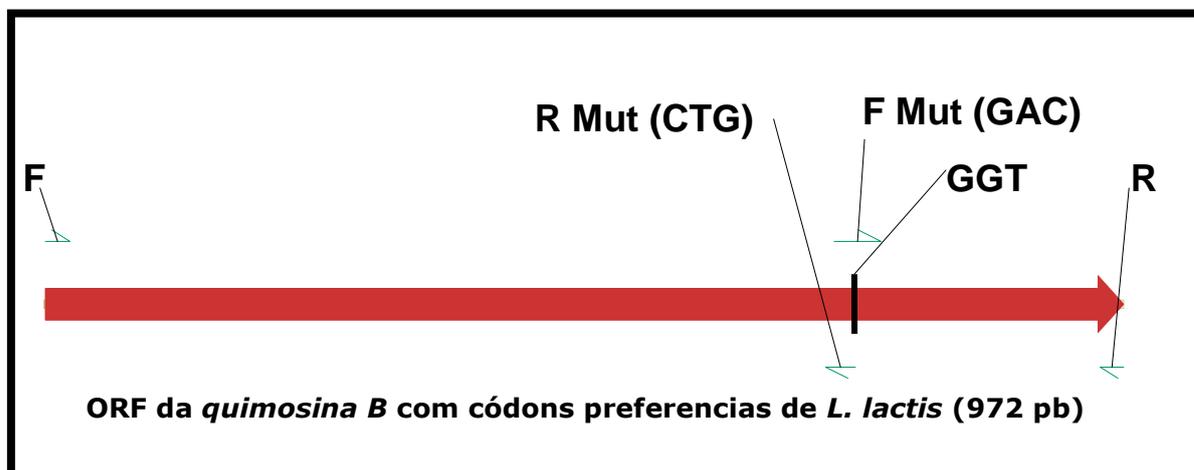
### IV.2.3. Confeção dos oligonucleotídeos iniciadores e mutação sítio-dirigida

A mutação sítio-dirigida, para a conversão da Quimosina B com códons preferenciais de *L. lactis* em Quimosina A, foi realizada através da estratégia de *PCR-overlapping* (Ho *et al.*, 1989; Simionatto *et al.*, 2009). Como a única diferença entre as ORFs codificadoras das Quimosinas B e A é a presença de um códon GGT, codificador de Glicina na posição aminoacídica 244 (Gly244), na Quimosina B, e um códon GAC, codificador de Ácido Aspártico (GAC; Asp244), na Quimosina A, (Mohanty *et al.*, 1999) dois pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para que fosse possível a substituição das bases GT pelas bases AC.

O primeiro par de oligonucleotídeos iniciadores foi confeccionado para a amplificação da região que compreende a porção inicial da seqüência codificadora da Quimosina B e estende-se até o códon GGT, codificadora de Gly244 (fragmento 5': 1-732 pb). Porém o oligonucleotídeo iniciador *reverse* (anti-senso), utilizado para a amplificação desse fragmento, foi modificado para que ao invés de possuir um códon CCA, complementar ao códon GGT, o mesmo possuísse um códon CTG para se parear com o códon GAC.

O segundo par de oligonucleotídeos iniciadores foi confeccionado para a amplificação de uma região que antecede o GGT da Gly244 em 18 nucleotídeos e estende-se até o final da seqüência codificadora da Quimosina B (fragmento 3': 712-972 pb). Neste caso, o oligonucleotídeo iniciador *forward* (senso) foi modificado de forma que adicionou-se códon GAC ao invés do códon GGT.

Em ambos os casos, os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com auxílio do programa Vector NTI 8.0 (InforMax). A representação esquemática da ORF de 972 pb codificadora da Quimosina B, bem como os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para mutar esta ORF numa ORF codificadora da Quimosina A, pode ser observada na Figura 16.



**Figura 16** – Representação do anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para realizar mutação sítio-dirigida para converter a ORF codificadora da Quimosina bovina B com códons preferências para *L. lactis* em Quimosina A. Entre parênteses indicado a modificação que o oligonucleotídeo iniciador irá acrescentar a seqüência amplificada. Localização da trinca nucleotídica GGT codificadora para o aminoácido Glicina da posição 244 (representada em preto). Ilustração gerada pelo programa Vector NTI 8.0 (InforMax).

Aos oligonucleotídeos iniciadores externos (F e R; Figura 16) foram adicionados sítios de restrição artificial para posterior clonagem direcional no vetor de expressão em *L. lactis* (pXylT:SEC). A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores encontra-se na Tabela 7.

**Tabela 7:** Parâmetros da PCR utilizada para a amplificação da seqüência codificadora da Pró-quimosina B.

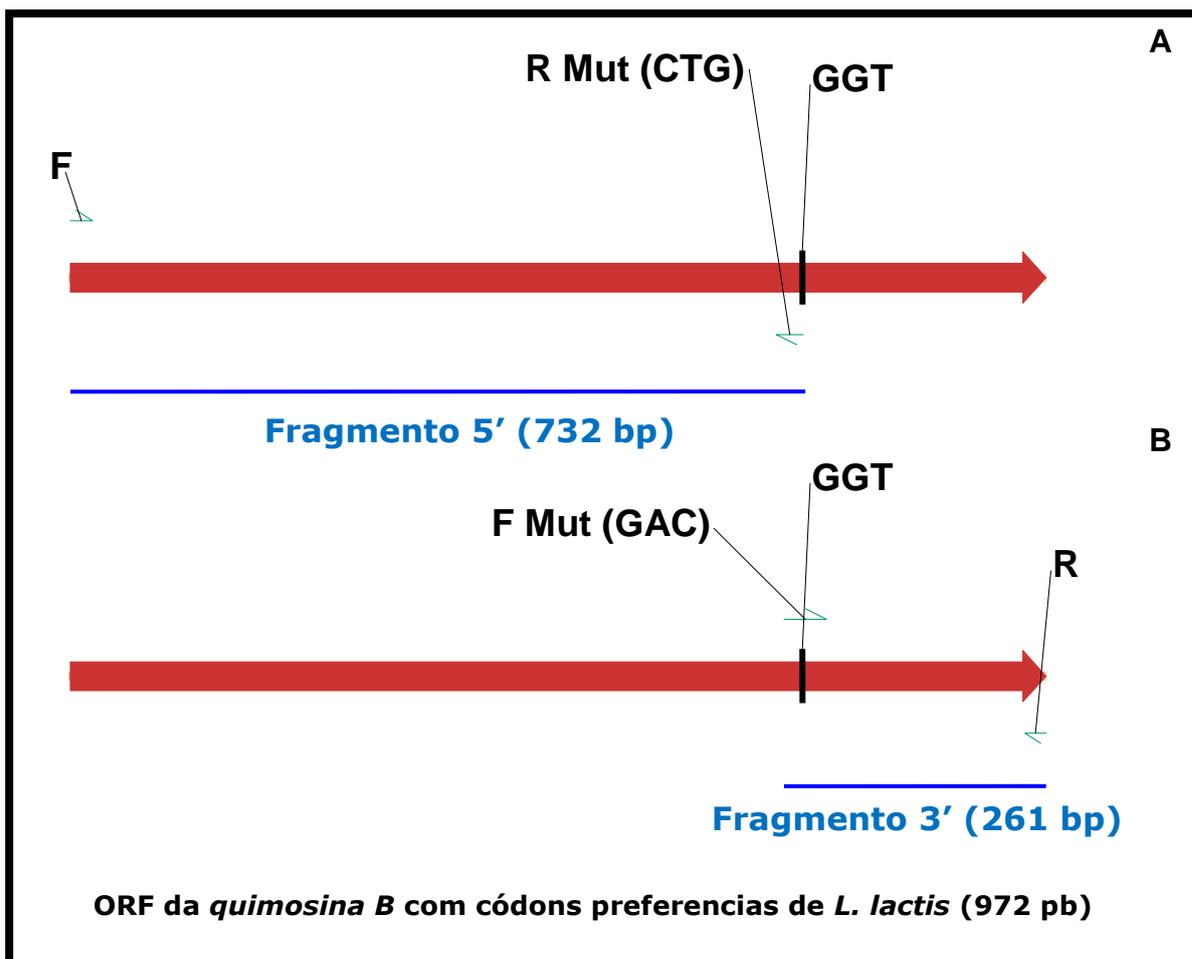
<i>PCR</i>	
Iniciador <i>forward</i> da ORF codificadora da Quimosina B (F) Sítio de restrição para a enzima <i>Nsi</i> I está sublinhado	5' TCGATGCATCA GGTGAGGTTGCAAGTGTTCTC 3'
Temperatura de anelamento do iniciador F	55.1°C
Iniciador <i>reverse</i> para anelamento interno da ORF codificadora da Quimosina B (R Mut) Trinca contendo a modificação nucleotídica para gerar mutação está em negrito	5' <b>GTC</b> ATATT GATTTTGTGTTGCTCCAATAG 3'
Temperatura de anelamento do iniciador R Mut	55.5°C
Tamanho do fragmento amplificado com os iniciadores F e R Mut (fragmento 5')	732 pb
Iniciador <i>forward</i> para anelamento interno da ORF codificadora da Quimosina B (F Mut) Trinca contendo a modificação nucleotídica para gerar mutação está em negrito	5' GCAACACAA AATCAATAT <b>GAC</b> GAATTTGACATAG ATTGTGAC 3'
Temperatura de anelamento do iniciador F Mut	57.5°C
Iniciador <i>reverse</i> da ORF codificadora da Quimosina B (R) Sítio de restrição para a enzima <i>Eco</i> RI está sublinhado	5' GGAATTCTT AGATGGCCTTGGCAAGTCC 3'

---

Temperatura de anelamento do iniciador R	55.6°C
Tamanho do fragmento amplificado com os iniciadores F Mut e R (fragmento 3')	261 pb
Tamanho do fragmento amplificado com os iniciadores externos F e R	972 pb

---

Os pares de iniciadores (F e R Mut, e F Mut e R) foram utilizados em duas distintas reações de PCR realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 0,5 U de Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen), 1X *Pfx Amplification Buffer*, 1X *PCRx Enhancer Solution*, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 0,3 mM dNTP, 0,2 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 130 ng do vetor pBSIISK:*pró-quimosina B*. A reação foi realizada em termociclador ATC 401 (Nyx Technik) onde as amostras foram submetidas as seguintes etapas: desnaturação inicial (95°C; 5 min.) seguida de 30 ciclos de desnaturação (95°C; 30 seg.), anelamento (54°C; 30 seg.), extensão (68°C; 2 min.) e, ao término destes 30 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (68°C; 7 min.). Como produto desta reação de PCR, obteve-se a amplificação dos fragmentos 5' (732 pb) e 3' (261 pb) (Figura 17).

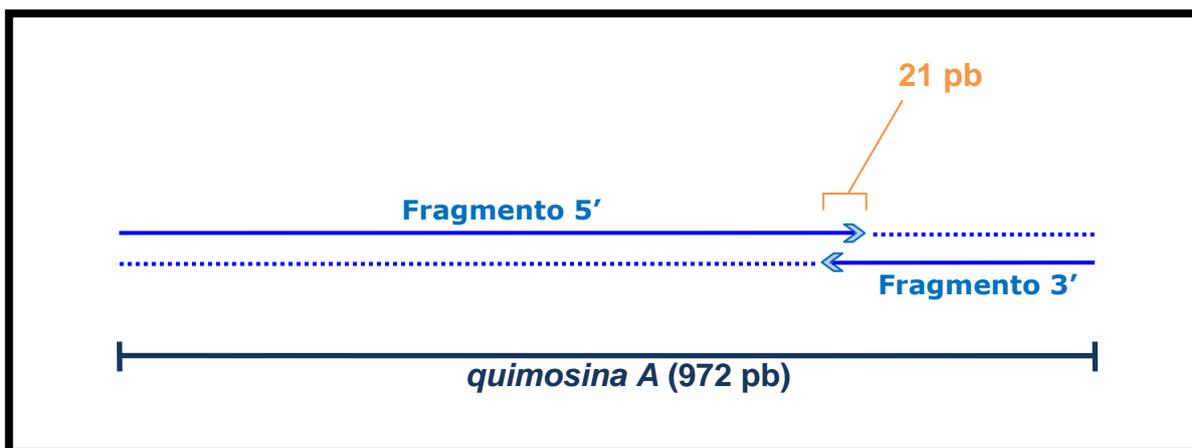


**Figura 17** – Representação esquemática da primeira etapa da mutação sítio-dirigida para conversão da seqüência codificadora da Quimosina bovina B com códons preferências para *L. lactis* em Quimosina A: amplificação dos fragmentos 5' e 3'. A: Representação esquemática do fragmento 5', amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores F e R Mut. B: Representação esquemática do fragmento 3', amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores F Mut e R. A modificação que o oligonucleotídeo iniciador irá acrescentar à seqüência amplificada está indicada entre parênteses. Localização da trinca nucleotídica GGT codificadora para o aminoácido Glicina da posição 244 (representada em preto). Ilustração gerada pelo programa Vector NTI 8.0 (InforMax).

Em seguida os fragmentos 5' e 3' foram isolados utilizando-se o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) conforme recomendações do fabricante. A concentração dos fragmentos foi determinada utilizando-se o espectrofotômetro BioPhotometer plus (Eppendorf) com a leitura da absorbância em 260 nm.

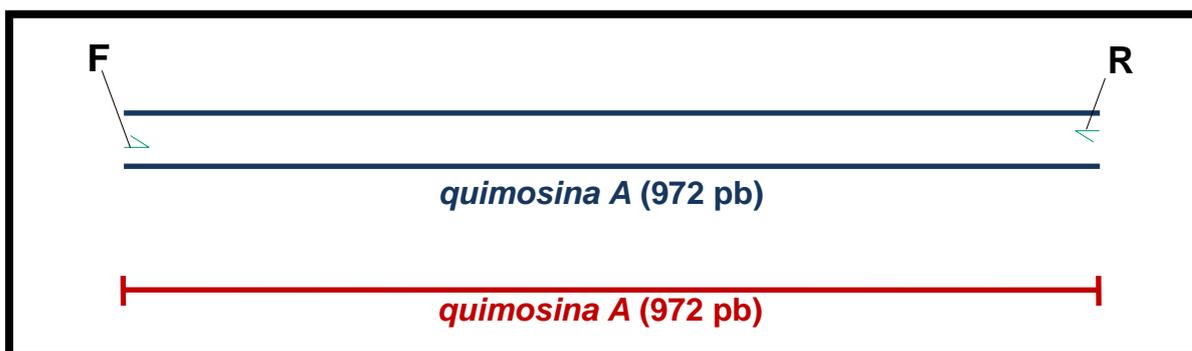
Os fragmentos 5' e 3', previamente amplificados, foram utilizados em uma única reação de PCR. Para esta nova PCR não foram adicionados oligonucleotídeos iniciadores à reação, uma vez que os dois fragmentos apresentam uma região de complementariedade de 21 nucleotídeos e suas próprias extremidades 3'-OH serviram como iniciadores para a extensão do resto da seqüência codificadora da

Quimosina A (Figura 18). Nesta reação de PCR foram seguidos os parâmetros da reação anteriormente descrita neste item, porém utilizando 60 ng de cada fragmento.



**Figura 18** – Representação esquemática da segunda etapa da mutação sítio-dirigida para conversão da seqüência codificadora da Quimosina B com códons preferenciais de *L. lactis* em Quimosina A: reação de PCR com os fragmentos 5' e 3' e sem oligonucleotídeos iniciadores. O local e o número de pares de base (pb) da complementariedade entre as moléculas de DNA dos fragmentos 5' e 3' (representadas em laranja), extensão das moléculas (representada em tracejado azul), e a obtenção da seqüência codificadora da Quimosina A como produto desta etapa e seu peso molecular (representa em azul escuro).

Por fim, realizou-se uma terceira reação de PCR utilizando o produto da segunda reação de PCR e os oligonucleotídeos iniciadores externos (F e R) para obter um maior número de moléculas da seqüência mutada (Figura 19).



**Figura 19** – Representação esquemática da terceira etapa da mutação sítio-dirigida para conversão da seqüência codificadora da Quimosina B com códons preferenciais de *L. lactis* em Quimosina A: reação de PCR para a amplificação da seqüência codificadora da Quimosina A. Molécula de DNA gerada pela reação de PCR utilizando os fragmentos 5' e 3', sem adição de oligonucleotídeos iniciadores (representada em azul escuro), iniciadores externos contendo os sítios de restrição artificial para a clonagem direcional no vetor de expressão (F e R), e a amplificação da seqüência codificadora da Quimosina A como produto desta etapa e seu peso molecular (representa em vermelho).

#### ***IV.2.3.1. Resolução eletroforética***

Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1%, como segue. As amostras de DNA acrescida de 1:5 do volume de tampão de amostra (Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X) foram fracionados em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (45 mM tris; 45 mM ácido bórico; 1mM EDTA), contendo brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). As resoluções foram realizadas a 100 Volts durante aproximadamente 1 hora. O DNA foi visualizado e o gel fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta (320 nm) através do sistema de documentação fotográfica *Benchtop UV Transilluminator (UVP)* e a foto processada pelo programa *MultiDoc-It Digital Image System (UVP)*.

O peso molecular dos fragmentos amplificados foram estimado comparando-se ao marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder™* (Invitrogen).

#### **IV.2.4. Clonagem no Sistema TOPO**

##### ***IV.2.4.1. Clonagem das ORFs codificadoras da Quimosina bovina A e Quimosina B no vetor pCRII-TOPO (Blunt)***

O produto de PCR obtido da terceira etapa da mutação sítio-dirigida (item IV.2.3.) correspondente a seqüência codificadora da Quimosina A foi purificado utilizando o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e ligado ao vetor pCR®II-TOPO (Blunt; Invitrogen; Tabela 6), para a geração dos plasmídeos pCRII-TOPO:*quimosina A* e pCRII-TOPO:*quimosina B* (Tabela 6). Os procedimentos foram realizados conforme as recomendações do fabricante. O produto de ligação foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10.

##### ***IV.2.4.2. Transformação bacteriana (E. coli )***

A etapa de confecção de *E. coli* eletrocompetente, assim como, a etapa de transformação bacteriana da mesma, foi realizada segundo descrito nos itens III.2.4.1.1. e III.2.4.1.2., respectivamente.

#### ***IV.2.4.3. Extração do DNA plasmidiano de E. coli em pequena escala***

A extração do DNA plasmidiano, dos clones oriundos da transformação, foi realizada conforme o item III.2.4.1.3..

#### ***IV.2.4.4. Confirmação da presença e tamanho das ORFs codificadoras da Quimosina bovina A e Quimosina B no vetor pCRII-TOPO (Blunt)***

Para confirmar a presença e o peso molecular da ORF da *quimosina A* e *quimosina B* clonada no vetor pCRII-TOPO (Blunt) duas metodologias foram empregadas, PCR e digestão enzimática utilizando endonuclease de restrição.

##### **IV.2.4.4.1. PCR**

Para verificar a presença do inserto e o peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Blunt), o inserto presente no referido vetor foi amplificado por PCR utilizando o protocolo descrito no item III.2.5.3. (volume final 10 µL).

##### **IV.2.4.4.2. Digestão enzimática**

A digestão enzimática foi realizada utilizando a enzima de restrição *EcoRI*, uma vez que o sítio de entrada do inserto do pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Blunt) esta circundado por dois sítios de restrição para esta enzima.

A reação foi realizada utilizando: 2 U da enzima de restrição *EcoRI* 20 U/µL (0,1 µL), 1X REact<sup>®</sup> 3 *buffer* 3 (50 mM tris-HCl - pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, e 100 mM NaCl; 1,8 µL), aproximadamente 1,5 µg de DNA plasmidiano de cada clone (15 µL), e água ultrapura estéril para completar o volume de 18 µL . As reações foram mantidas em banho-maria a 37°C por 1 hora.

O produto da reação de PCR, assim como da digestão enzimática tiveram seu volume total aplicado em gel de agarose a 1% e a resolução eletroforética foi realizada sob as mesmas condições já descritas no item IV.2.3.1..

#### IV.2.5. Identificação dos clones recombinantes mutados

Para identificar quais dos clones recombinantes apresentavam o inserto mutado, foi realizado um ensaio *in silico* utilizando o programa Vector NTI 8.0 (Informax). Para tanto, na busca por um sítio de restrição que reconhecesse uma seqüência contendo GGT (Glicina 244) ou GAC (Ác. Aspártico 244), as ORFs das Quimosinas A e B foram analisadas quanto à presença de sítios para 1.537 enzimas de restrição. Após a seleção de uma enzima que reconhecesse tal seqüência, foi realizada uma simulação *in silico* de um gel de agarose 1% contendo os vetores pCR II-TOPO:*quimosina A* e pCR II-TOPO:*quimosina B* digeridos com a enzima e o resultado obtido foi comparado com o padrão de bandas das amostras analisadas.

Depois de identificados os vetores que contem a seqüência codificadora da Quimosina A e da Quimosina B, um clones de cada construção foi utilizado para realizar a subclonagem no sistema XIES.

#### IV.2.6. Subclonagem no sistema XIES

##### IV.2.6.1. Digestão enzimática do vetor pXyIT:SEC:nuc

Para a subclonagem das ORFs codificadoras da Quimosina A e Quimosina B no vetor de expressão pXyIT:SEC (Tabela 6), inicialmente foi realizada a extração desse plasmídeo a partir da linhagem de *E. coli* TG1 (pXyIT:SEC:nuc; Tabela 6) utilizando o Kit *The Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), conforme as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada uma reação de digestão enzimática de 120 µL que consistiu em: 100 µL (contendo aproximadamente 13 µg) do plasmídeo pXyIT:SEC:nuc, 12 µL do REact® 3 *buffer*, 1,3 µL de *Nsi*I (10 U/µL), 1,5 µL de *Eco*RI (20 U/µL) e 5,2 µL de água ultrapura estéril. A reação foi mantida em banho-maria a 37°C por 18 horas.

##### IV.2.6.2. Purificação do fragmento de DNA pXyIT:SEC

A reação de digestão descrita no item IV.2.6.1. teve todo o seu volume aplicado em gel de agarose a 1% e a resolução eletroforética realizada sob as mesmas condições descritas no item IV.2.3.1.. Ao término da eletroforese, o

fragmento de DNA correspondente ao vetor pXyIT:SEC (3.255 pb), desprovido da seqüência codificadora da nuclease de *S. aureus* (*nuc*; 511 pb), foi purificado com o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do produto purificado foi então estimada através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1%, utilizando o *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus*, como marcador de peso molecular.

#### ***IV.2.6.3. Digestão enzimática dos plasmídeos pCRII-TOPO:quimosina A e pCRII-TOPO:quimosina B***

Os plasmídeos pCRII-TOPO:quimosina A e pCRII-TOPO:quimosina B (Tabela 6) foram extraídos a partir dos clones de *E. coli* previamente confirmados (item IV.2.5.) seguindo o protocolo do item III.2.4.1.3. Em seguida, foi realizada uma reação de digestão enzimática de 120 µL que consistiu em: aproximadamente 20 µg de plasmídeo (100 µL cada), acrescido de 20 U de cada enzima (2 µL de *NsiI* 10 U/µL e 1 µL de *EcoRI* 20 U/µL), 1X REact® 3 *buffer* (12 µL) e água ultrapura estéril (5 µL). A reação foi mantida em banho-maria a 37°C por 18 horas.

#### ***IV.2.6.4. Purificação dos fragmentos de DNA contendo as seqüências codificadoras da Quimosina A e Quimosina B***

A reação de digestão apresentada no item IV.2.6.3. foi toda aplicada em gel de agarose a 1% e a resolução eletroforética realizada sob as mesmas condições descritas no item IV.2.3.1.. Ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes às seqüências codificadoras da Quimosina A e Quimosina B (972 pb) foram purificados com o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza dos produtos purificados foram então estimados através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1%, utilizando o *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus*, como marcador de peso molecular.

#### ***IV.2.6.5. Ligação das ORFs codificadoras da Quimosina A e Quimosina B no vetor pXylT:SEC e transformação de E. coli TOP10***

A ligação da ORF da *quimosina A* e *quimosina B* no vetor pXylT:SEC foi realizada conforme descrito no item III.2.6.5..

Os produtos das ligações foram usados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 (item III.2.4.1.2.).

#### ***IV.2.6.6 Confirmação dos clones recombinantes***

Os plasmídeos obtidos foram submetidos à digestão com as enzimas *Nsi*I e *Eco*RI, segundo a seguinte reação: 15 µL de DNA plasmidiano, 0,2 µL de *Nsi*I 10 U/µL (2 U), 0,2 µL de *Eco*RI 20 U/µL (4 U), 2,0 µL de 10X REact® 3 *buffer* (1X) e completando com água ultrapura estéril (2,6 µL) para um volume de 20 µL. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 1 hora, e o resultado observado em gel de agarose 1%. Após confirmação 10 µL de cada plasmídeo recombinantes foram utilizados para transformar *L. lactis* NCDO2118, eletrocompetente.

#### ***IV.2.7. Transformação de L. lactis NCDO2118 com os plasmídeos pXylT:SEC:quimosina A e pXylT:SEC:quimosina B***

##### ***IV.2.7.1. Confeção de células eletrocompetentes de L. lactis NCDO2118 e transformação com os plasmídeos pXylT:SEC:quimosina A e pXylT:SEC:quimosina B***

A preparação das células eletrocompetentes de *L. lactis* foi realizada de acordo com o item III.2.7.1..

O procedimento para transformação de *L. lactis* NCDO2118 eletrocompetente com os plasmídeos pXylT:SEC:quimosina A e pXylT:SEC:quimosina B foi segundo descrito no item III.2.7.2..

##### ***IV.2.7.2. Confirmação da construção das linhagens recombinantes de L. lactis***

As colônias resultantes da transformação de *L. lactis* com os plasmídeos pXylT:SEC: quimosina A e pXylT:SEC: quimosina B foram inoculadas em meio

M17Glu-Sac suplementado com  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de cloranfenicol, e mantidos na estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. A partir destas culturas o DNA plasmidiano foi extraído (item III.2.7.3.) e submetido a confirmação da presença do inserto por PCR e digestão enzimática conforme descrito no item IV.2.4.4.1. e IV.2.4.4.2..

#### **IV.2.8. Confirmação da produção da Quimosina A e Quimosina B pelas linhagens recombinantes de *L. lactis***

##### ***IV.2.8.1. Indução da produção de proteínas heterólogas em *L. lactis* e extração proteica***

A indução da expressão gênica das ORFs *quimosina A* e *quimosina B* em *L. lactis*, assim como o procedimento de extração proteica, foram realizados conforme os itens III.2.8.1. e III.2.8.2..

##### ***IV.2.8.2. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida e Western Blotting***

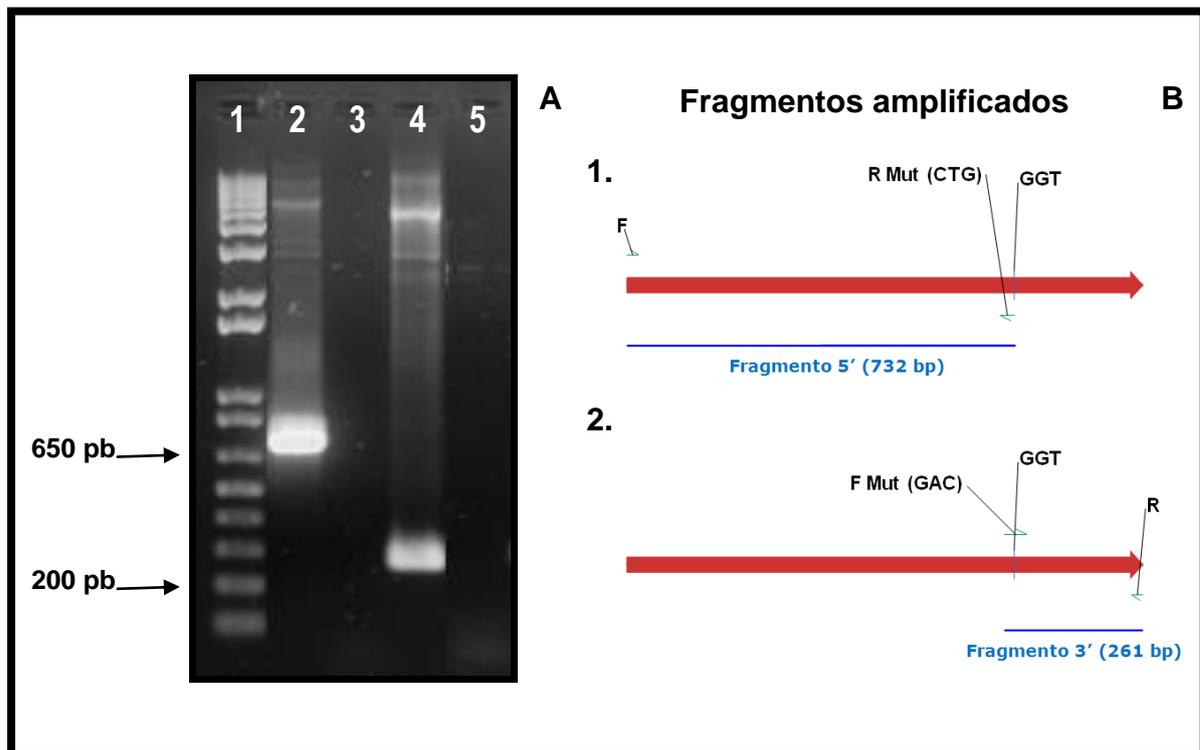
As proteínas extraídas de *L. lactis* foram submetidas às resoluções eletroforética descritas no item III.2.8.3. e a procedimentos de imunodeteção por *Western Blotting* (item III.2.8.5.) utilizando soro anti-Quimosina na diluição 1:100.

### IV.3. Resultados e Discussão

#### IV.3.1. Mutação sítio dirigida

A primeira etapa desta parte do trabalho consistiu na obtenção da seqüência codificadora da Quimosina A, a partir de uma mutação sítio-dirigida da ORF sintética da Quimosina B modificada para códons preferências de *L. lactis*. Como a única diferença entre as isoenzimas Quimosina A e B refere-se ao aminoácido 244, onde na Quimosina B há uma Glicina (GGT; Gly244) e na Quimosina A há um Ácido Aspártico (GAC; Asp244), optou-se pela estratégia de *PCR-overlapping* (Ho *et al.*, 1989; Simionatto *et al.*, 2009) para realizar a mutação sítio-dirigida. Para converter o códon GGT (codificador de Gly244) da Quimosina B em um códon GAC (codificador de Asp244) da Quimosina A, dois pares de oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados (Tabela 7). Um dos pares de iniciadores foi confeccionado para amplificar a região inicial da seqüência codificadora da Quimosina B (fragmento 5'). Já o outro par de oligonucleotídeos iniciadores, foi confeccionado para amplificar a região final (fragmento 3') também da Quimosina B, de forma que o iniciador *reverse* (anti-senso) utilizado para amplificar o fragmento 5' e o iniciador *forward* (senso) utilizado para amplificar o fragmento 3' apresentassem (após a ligação dos dois fragmentos) a alteração nucleotídica necessária para gerar a mutação (que converteria a Quimosina B em Quimosina A).

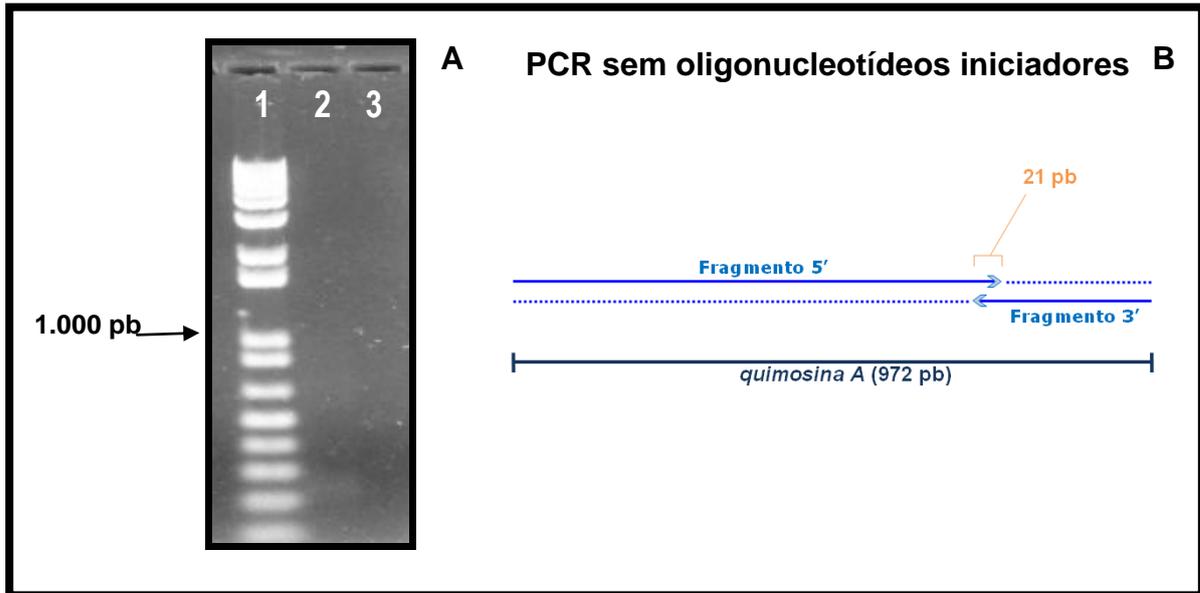
O produto das reações de PCR, utilizando os dois pares de iniciadores, foi analisado em gel de agarose 1%, onde se verificou que os fragmentos 5' e 3' apresentavam aproximadamente 732 e 261 pb, respectivamente, assim como esperado (Figura 20).



**Figura 20** – Produtos da amplificação da seqüência codificadora da Quimosina B utilizando os iniciadores contendo a mutação para obtenção da Quimosina A. A: Resolução eletroforética dos produtos de amplificação dos fragmentos de DNA 5' e 3'. Coluna 1, Marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); coluna 2, produto da amplificação do fragmento 5' (732 pb) utilizando os iniciadores F e R Mut; coluna 3, controle negativo; coluna 4, produto da amplificação do fragmento 3' (261 pb) utilizando os iniciadores F Mut e R; coluna 5, controle negativo. B: (1) Representação esquemática do fragmento 5', amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores F e R Mut. (2) Representação esquemática do fragmento 3', amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores F Mut e R.

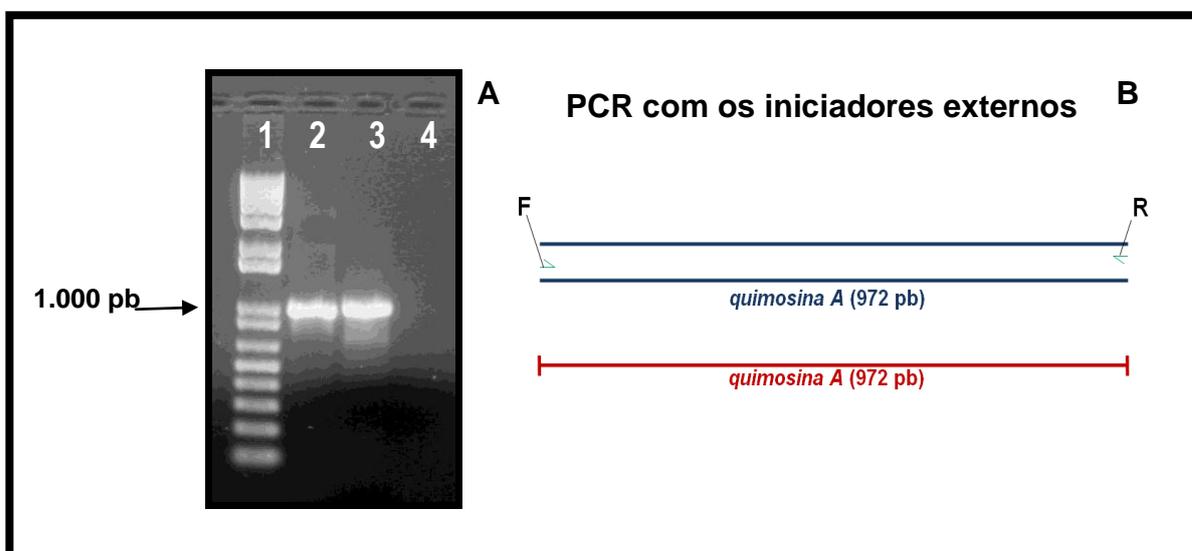
A eficiência da amplificação foi demonstrada pela intensidade das bandas obtidas. Algumas bandas inespecíficas foram observadas, provavelmente trata-se do plasmídeo *pBSIISK:pró-quimosina B*, utilizado como DNA molde da reação, devido ao peso molecular e disposição das bandas. No entanto, o fato de haver bandas de outros pesos moleculares não chegou a interferir de forma negativa no experimento, uma vez que após a amplificação dos fragmentos 5' e 3', estes foram purificados a partir de gel de agarose. Como controle negativo das reações foi utilizada água ultrapura estéril ao invés de DNA, e como esperado, o mesmo não apresentou nenhum sinal de amplificação.

Depois de purificados, os fragmentos 5' e 3' foram submetidos à técnica de *PCR-overlapping*, o resultado pode ser observado na Figura 21.



**Figura 21** – Produto da *PCR-overlapping*. A: Resolução eletroforética dos produtos de extensão dos fragmentos de DNA 5' e 3' sobrepostos. Coluna 1, Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); coluna 2, Produto da PCR sem iniciadores; coluna 3, controle negativo. B: Representação esquemática da reação de PCR com os fragmentos 5' e 3' sem oligonucleotídeos iniciadores. Complementariedade de bases (indicada em laranja), e o produto esperado (indicado em azul escuro).

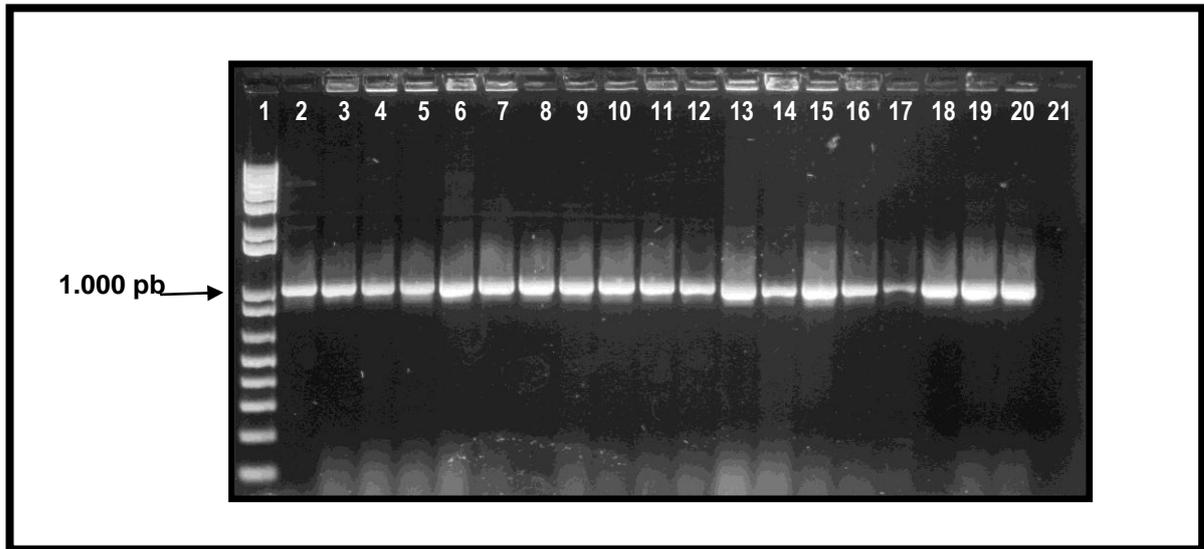
Em seguida, o produto gerado foi utilizado como DNA molde em uma terceira reação de PCR contendo os iniciadores externos (F e R; sem mutação) para a amplificação da ORF mutada (codificadora da Quimosina A). O produto desta terceira reação de PCR foi resolvido em gel de agarose onde foi possível observar que a amplificação da ORF mutada apresentou um fragmento de igual peso molecular e intensidade à gerada pelo controle positivo (amplificação da ORF da *quimosina B* utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores externos; Fig. 22). Nenhuma amplificação foi detectada no controle negativo.



**Figura 22** – Produto da amplificação da ORF mutada. A: Resolução eletroforética do produto de amplificação da seqüência mutada codificadora da Quimosina A. Coluna 1, Marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); coluna 2, controle positivo; coluna 3, produto gerado pela amplificação da ORF mutada utilizando os iniciadores externos F e R; e coluna 4, controle negativo. B: Representação esquemática da amplificação da seqüência codificadora da Quimosina A, gerada pela mutação sítio-dirigida, utilizando iniciadores externos contendo os sítios de restrição artificial para a clonagem direcional no vetor de expressão (F e R).

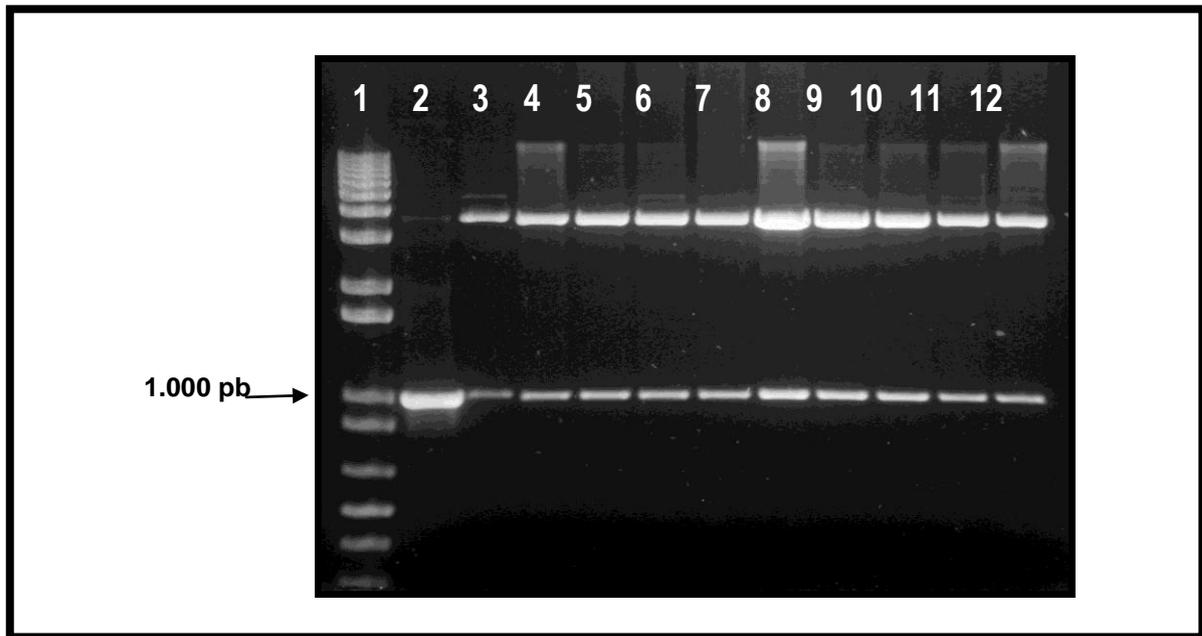
#### IV.3.2. Clonagem do produto da mutação sítio-dirigida no sistema Topo e confirmação dos clones recombinantes

O fragmento amplificado foi clonado no vetor pCR - II-TOPO. O produto da ligação foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10. Colônias oriundas da transformação foram selecionadas aleatoriamente e cultivadas. O DNA plasmidiano foi extraído e utilizado como molde para confirmar a clonagem do inserto através de uma reação de PCR utilizando os iniciadores específicos da ORF *quimosina B*. Dezoito clones foram confirmados, como sendo portadores de um inserto de 972 pb, como o observado no controle positivo, produto de amplificação da *quimosina B*. No controle negativo não nenhuma amplificação foi detectada, como esperado. O produto da amplificação pode ser observado na Figura 23.



**Figura 23** – Amplificação por PCR de um fragmento de aproximadamente 972 pb a partir do DNA plasmidiano extraído de células de *E. coli* transformadas com o produto da ligação do vetor pCR - II-TOPO com o produto da mutação sítio-dirigida. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Coluna 1, Marcador de Peso Molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); coluna 2, controle positivo: produto de amplificação da *quimosina B*; colunas 3-20, fragmento amplificado a partir dos clones pCR - II-TOPO:*quimosina*; e coluna 21, controle negativo.

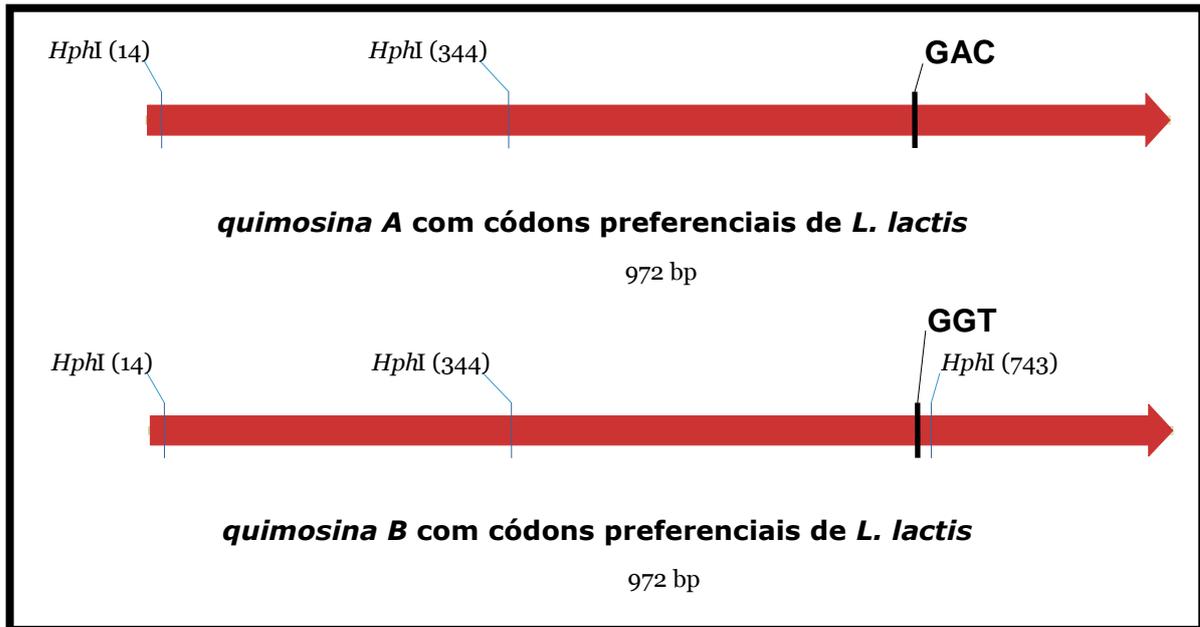
Dentre os clones que foram confirmados por PCR, dez foram escolhidos, aleatoriamente, para serem submetidas à digestão enzimática. A enzima de restrição utilizada foi a *EcoRI*, devido ao fato desta clivar o DNA em ambas as extremidades do sítio múltiplo de clonagem do vetor pCRII-TOPO (Blunt). Após a reação, todo o produto da digestão foi resolvido em gel de agarose, confirmando assim a presença do inserto em todos os clones avaliados (Figura 24).



**Figura 24** – Digestão enzimática dos plasmídeos gerados pela ligação do produto da mutação sítio-dirigida no vetor pCR - II-TOPO com a enzima *EcoRI*. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Coluna 1, Marcador de Peso Molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); coluna 2, controle positivo: produto de amplificação da *quimosina B*; coluna 3-12, produto da reação de digestão dos plasmídeos pCR - II-TOPO:*quimosina*.

### IV.3.3. Diferenciação dos clones recombinantes

A análise *in silico*, confrontando as seqüências codificadoras da Quimosina A e B contra 1.537 enzimas de restrição, apontou a enzima de restrição *HphI*. Essa enzima foi a única a apresentar um sítio de restrição diferenciado entre as duas seqüências, por utilizar o GGT (Gly244), presente na sequência codificadora da Quimosina B, como parte de seu sítio de restrição (GGTGANNNNNNNN/N). Reconhecendo dois sítios de restrição na seqüência da Quimosina A e três na seqüência da Quimosina B, como mostra a Figura 25. Sendo assim, os clones pCRII-TOPO:*quimosina A* e pCRII-TOPO:*quimosina B* quando digeridos com a *HphI* apresentarão um padrão de bandas diferenciados, permitindo a identificação dos clones que apresentam o inserto da *quimosina A* daqueles que apresentam o inserto da *quimosina B*.



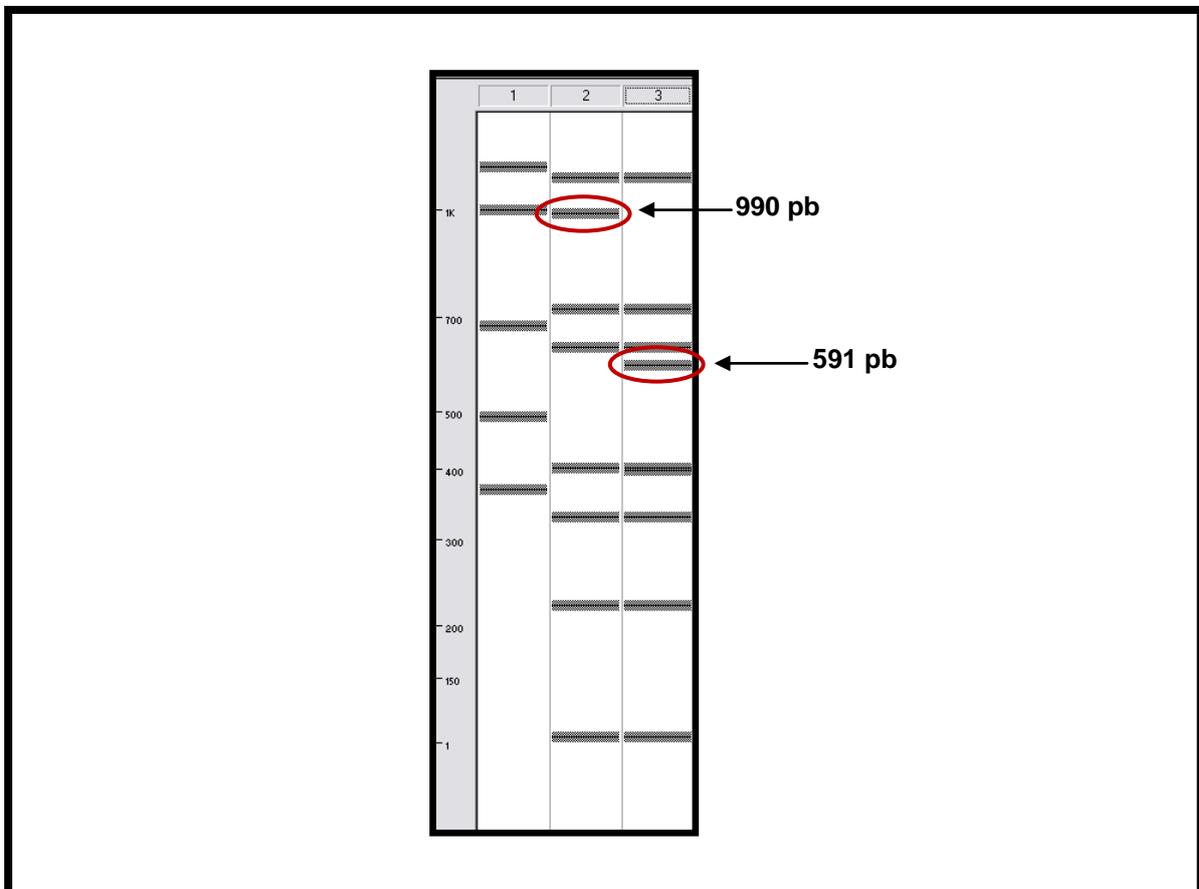
**Figura 25** – Representação esquemática dos sítios de restrição reconhecidos pela enzima *HphI* presentes nas seqüências da *quimosina A* e *quimosina B* com códons preferências de *L. lactis*. Ilustração gerada pelo programa Vector NTI 8.0 (InforMax).

Sendo assim calculou-se o peso molecular dos fragmentos gerados pela digestão com a enzima *HphI* para as possíveis construções obtidas: pCRII-TOPO:*quimosina A* e pCRII-TOPO:*quimosina B*, considerando a entrada do inserto no sentido horário e anti-horário. O resultado é apresentado na Figura 26.



**Figura 26** – Esquematização das possíveis orientações dos insertos dentro dos vetores pCRII-TOPO:quimosina A e pCRII-TOPO:quimosina B, o número de sítios de restrição para a enzima HphI e o provável peso molecular dos fragmentos gerados.

Em outra análise *in silico*, também utilizando o Programa Vector NTI 8.0, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o marcador SPP1-ECORI e as amostras pCRII-TOPO:*quimosina A* e pCRII-TOPO:*quimosina B* (ORFs em sentido horário) digeridas com a enzima *HphI*. Onde foi possível verificar a presença de um padrão de bandas diferenciado entre as amostras analisadas (Figura 27). De modo que o clone que possuisse a ORF mutada apresentaria um fragmento diferenciado com peso molecular de 990 pb, e o clone que possuisse a ORF sem modificação apresentaria um fragmento de peso molecular de 591 pb. Confirmando assim, que a digestão com a enzima *HphI* seria capaz de determinar qual ORF esta presente em cada clone.

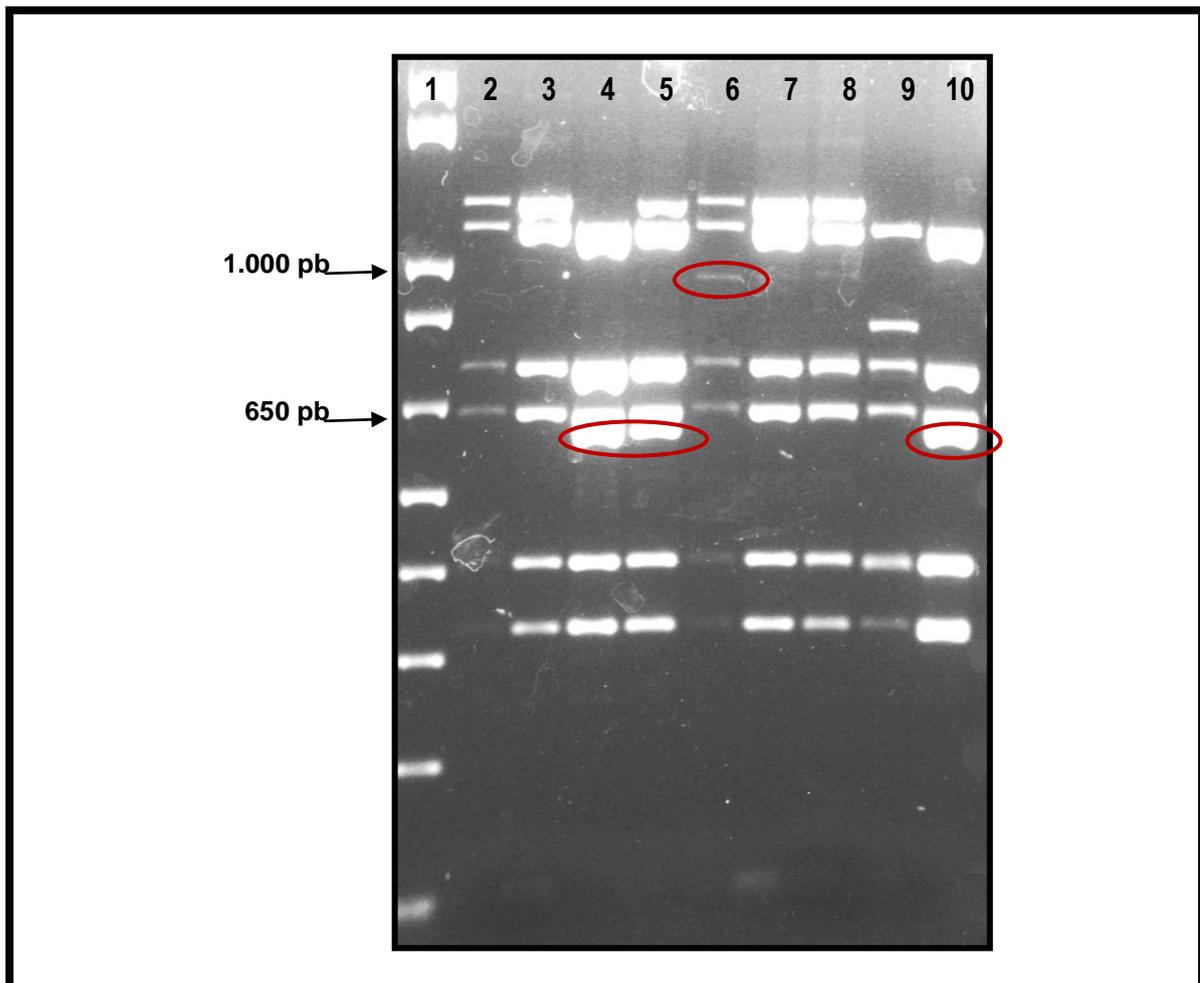


**Figura 27** – Análise *in silico* da digestão enzimática dos vetores pCRII-TOPO:*quimosina A* e pCRII-TOPO:*quimosina B* com a enzima de restrição *HphI*. Coluna 1, Marcador de peso molecular SPP1-ECORI; coluna 2, pCRII-TOPO:*quimosina A* digerido com *HphI*; coluna 3, pCRII-TOPO:*quimosina B* digerido com *HphI*. Marcação em vermelho destaca o fragmento de peso molecular diferencial que cada construção apresenta. O peso molecular dos fragmentos foi calculado com base no produto da digestão dos vetores pCRII-TOPO:*quimosina A* e pCRII-TOPO:*quimosina B* (contendo o inserto no sentido horário) com a enzima *HphI*.

#### ***IV.3.3.1. Identificação dos clones que contém o inserto codificador da Quimosina A ou B***

Nove dos clones recombinantes, dos dez obtidos, foram submetidos à digestão com *HphI* (Figura 28), onde foram identificados 3 clones contendo a ORF original (sem mutação; colunas 4, 5 e 10), provavelmente gerado pelo arraste de alguma cópia do plasmídeo contendo a seqüência codificadora da quimosina B nos passos iniciais da mutação sítio-dirigida, e um clone contendo a ORF mutada (coluna 6). Os outros clones não se enquadraram dentro de nenhum padrão esperado provavelmente por seu inserto conter alguma alteração na sequência (por exemplo, mutação espontânea) com mudança dos sítios de restrição ou por ter ocorrido uma digestão parcial.

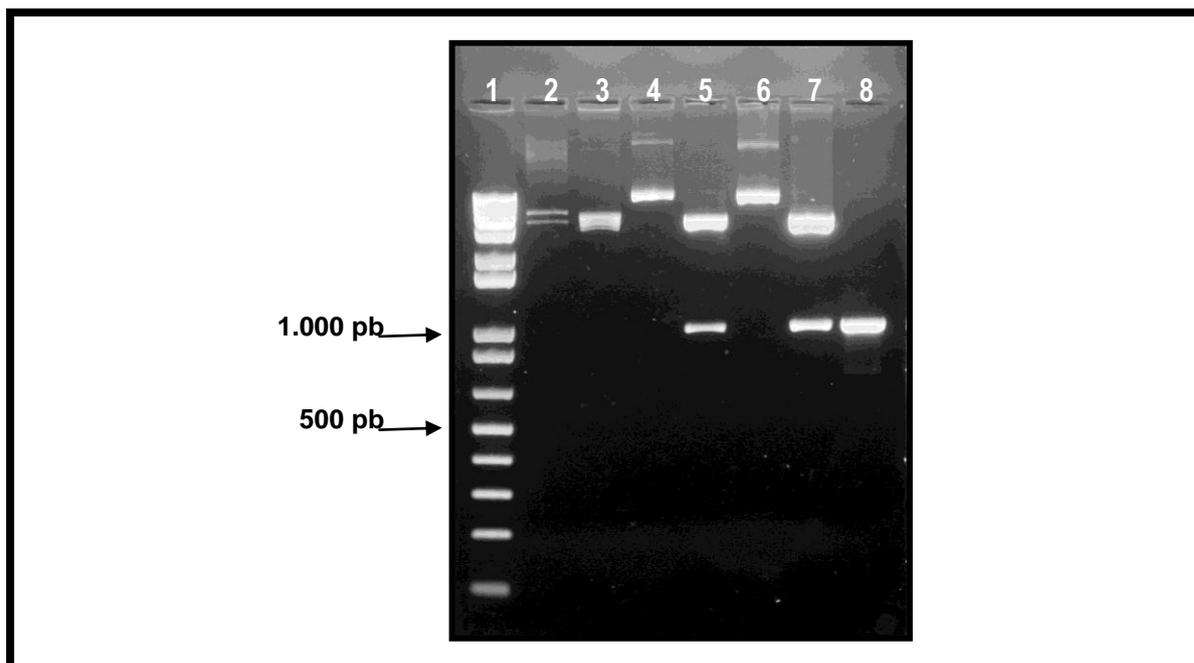
Os clones 6 (pCRII-TOPO:*quimosina A*) e 10 (pCRII-TOPO:*quimosina B*) foram selecionados para serem utilizados nos experimentos seguintes.



**Figura 28** – Digestão enzimática dos plasmídeos, oriundos da ligação do vetor pCRII-TOPO com o produto da mutação sítio-dirigida, com enzima *HphI*. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Coluna 1, Marcador de Peso Molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); coluna 2-10, clones digeridos com *HphI*. Marcação em vermelho destaca os fragmentos com peso molecular diferenciado: 990 pb, fragmento exclusivo dos clones contendo a ORF da *quimosina A*, e 591 pb, fragmento exclusivo dos clones contendo a ORF da *quimosina B*.

#### IV.3.4. Subclonagem no sistema XIES

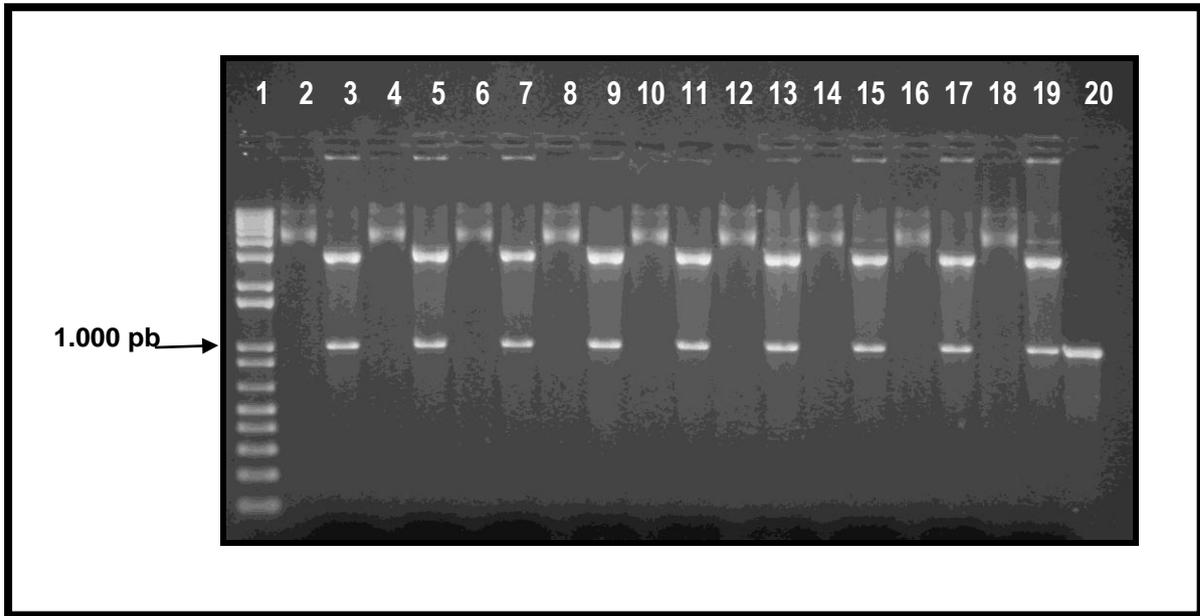
Paralelamente à digestão enzimática dos clones pCR II-TOPO:*quimosina A* e pCR II-TOPO:*quimosina B* e à purificação dos fragmentos correspondentes aos insertos codificadores das Quimosinas A e B, o vetor de expressão pXyIT:SEC:*nuc* também foi digerido com as enzimas de restrição *NsiI* e *EcoRI* para liberação da ORF *nuc* e posterior purificação do fragmento pXyIT:SEC. Os fragmentos purificados (vetor e insertos; Figura 29) foram então submetidos a uma reação de ligação.



**Figura 29** – Digestão enzimática dos plasmídeos pXyIT:SEC:nuc, pCRII-TOPO:quimosina A e pCRII-TOPO:quimosina B com as enzimas de restrição *Nsi*I e *Eco*RI. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Coluna 1, Marcador de Peso Molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); colunas 2 e 3, pXyIT:SEC:nuc não digerido e digerido, respectivamente; colunas 4 e 5, pCRII-TOPO:quimosina A não digerido e digerido, respectivamente; colunas 6 e 7, pCRII-TOPO:quimosina B não digerido e digerido, respectivamente; e coluna 8, controle positivo: produto de amplificação da seqüência codificadora da Quimosina B.

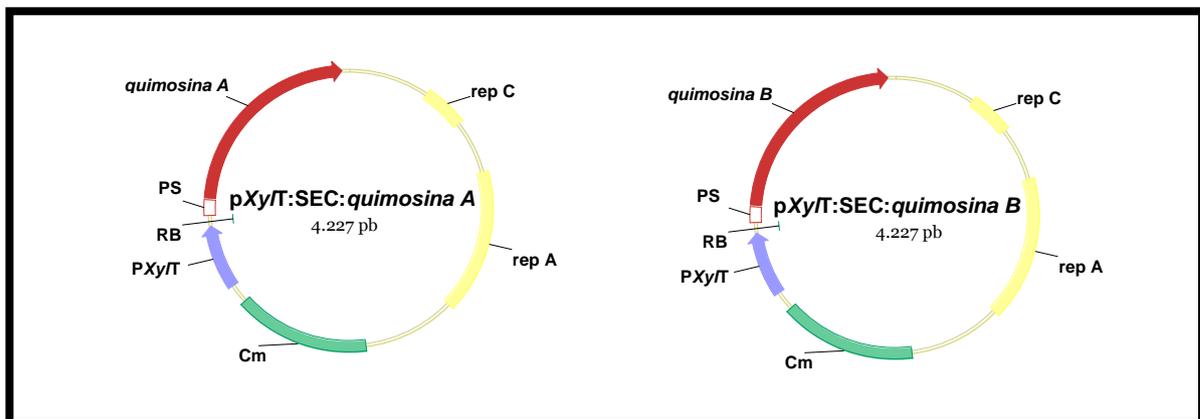
Os produtos de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10. A seleção de colônias de *E. coli* transformadas com esses plasmídeos foi realizada em meio 2xYT ágar contendo  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de cloranfenicol. A visualização das colônias foi feita com aproximadamente 48 horas após a transformação. Foram observadas colônias transformadas com o plasmídeo pXyIT:SEC:quimosina A e com o plasmídeo pXyIT:SEC:quimosina B. Algumas colônias, escolhidas aleatoriamente, foram inoculadas em meio líquido, suplementado com cloranfenicol, e incubadas, *overnight*, a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação. Essas culturas foram então utilizadas para fazer uma cultura estoque, em glicerol, de cada possível clone e para a realização da extração dos plasmídeos recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação.

Os plasmídeos extraídos foram submetidos a uma reação de digestão com as enzimas de restrição *Nsi*I e *Eco*RI. A Figura 30 mostra os produtos da digestão desses clones.



**Figura 30** – Digestão enzimática dos plasmídeos pXyIT:SEC:quimosina A e pXyIT:SEC:quimosina B com as enzimas *NsiI* e *EcoRI*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); colunas 2-13, clones pXyIT:SEC:quimosina A não digeridos e digeridos, respectivamente; colunas 14-19, clones pXyIT:SEC:quimosina B não digeridos e digeridos, respectivamente; e coluna 20, controle positivo: produto de amplificação da quimosina bovina B.

Todos os clones analisados confirmaram ser recombinantes, sendo que 6 deles apresentavam a construção pXyIT:SEC:quimosina A, e 3 deles a construção pXyIT:SEC:quimosina B. Essas construções estão representadas na Figura 31.

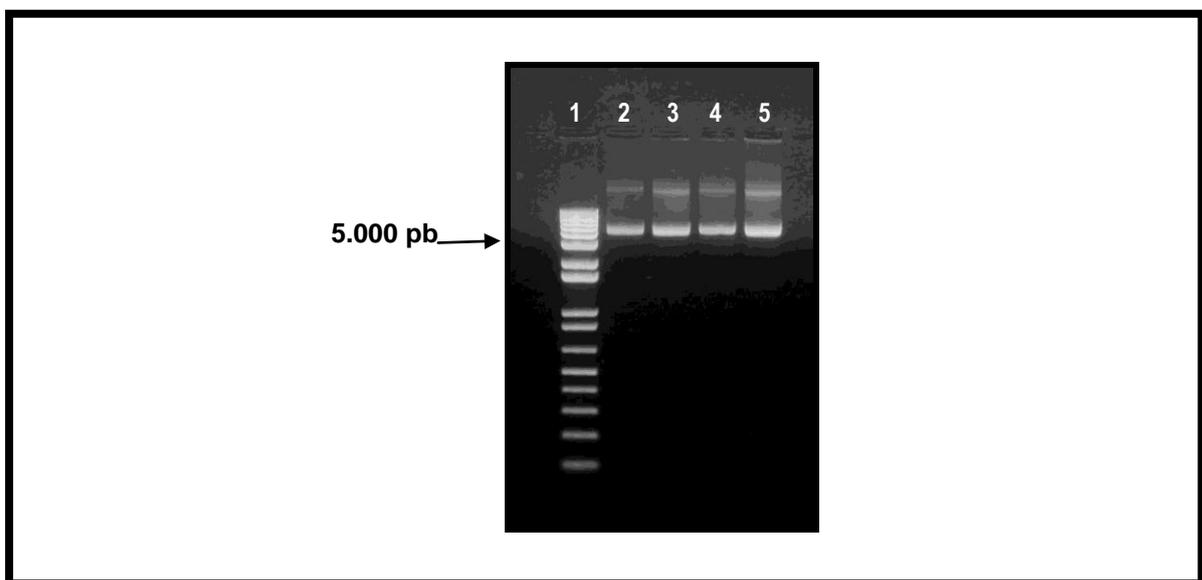


**Figura 31** – Representação esquemática dos vetores de expressão pXyIT:SEC:quimosina A e pXyIT:SEC:quimosina B. PxyIT: Promotor induzido por xilose. RBS: Sítio de ligação do ribossomo da seqüência codificadora da proteína Usp45 de *L. lactis*. PS: Peptídeo sinal da proteína Usp45. quimosina A: Seqüência codificadora da Quimosina A. quimosina B: Seqüência codificadora da Quimosina B. repA e repC: origens de replicação. Cm: Gene que confere resistência ao cloranfenicol. Ilustração gerada pelo programa Vector NTI 8.0 (InforMax).

#### IV.3.5. Obtenção das linhagens de *L. lactis* recombinantes

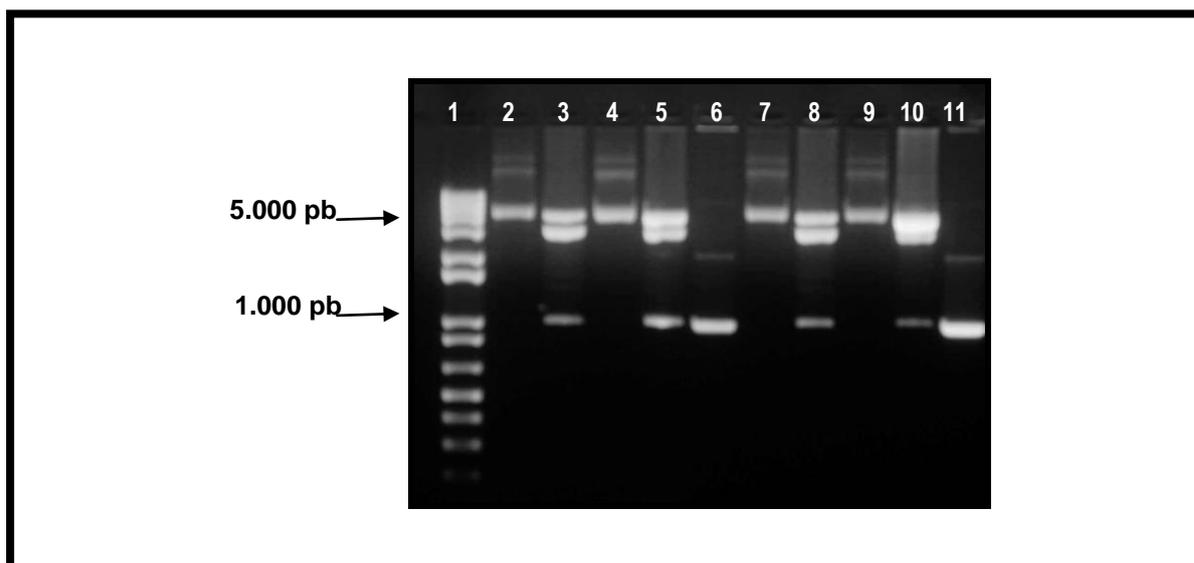
Um clone de cada construção foi utilizado para transformar *L. lactis* NCDO2118 eletrocompetente.

Após 48 horas de crescimento, quatro clones resistentes ao cloranfenicol foram selecionados (dois transformantes de cada construção). Estes, por sua vez, foram cultivados e tiveram seu DNA plasmidiano extraído para a confirmação da presença do inserto (Figura 32).



**Figura 32** – Produto da extração dos plasmídeos pXyIT:SEC:quimosina A e pXyIT:SEC:quimosina B obtidos a partir dos clones selecionados de *L. lactis* NCDO2118. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Coluna 1, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); coluna 2, plasmídeos pXyIT:SEC:quimosina A extraídos do clone 1; coluna 3, pXyIT:SEC:quimosina A extraído dos clone 2; coluna 4, pXyIT:SEC:quimosina B extraído do clone 1; coluna 5, pXyIT:SEC:quimosina B extraído do clone 2.

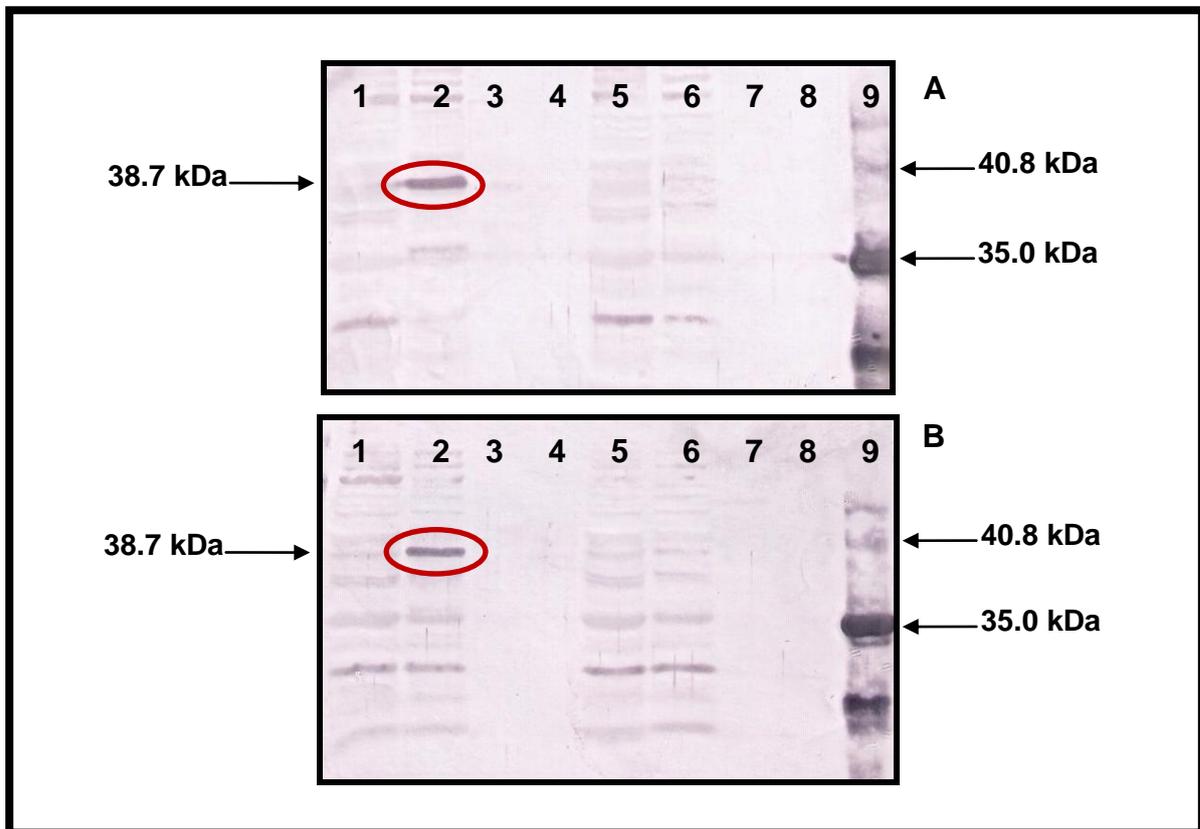
Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *NsiI* e *EcoRI* e apresentaram duas bandas de pesos moleculares de aproximadamente 972 e 3.255 pb, conforme esperado (Figura 33).



**Figura 33** – Digestão enzimática dos plasmídeos pXyIT:SEC:quimosina A e pXyIT:SEC:quimosina B (extraídos a partir de clones de *L. lactis*) com as enzimas *NsiI* e *EcoRI*. Coluna 1, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); colunas 2 e 3, pXyIT:SEC:quimosina A clone 1, não digerido e digerido, respectivamente; colunas 4 e 5, pXyIT:SEC:quimosina A clone 2, não digerido e digerido, respectivamente; coluna 6, controle positivo: amplificação da ORF da *quimosina bovina A*; colunas 7 e 8, pXyIT:SEC:quimosina B clone 1, não digerido e digerido, respectivamente; colunas 9 e 10, pXyIT:SEC:quimosina B clone 2, não digerido e digerido, respectivamente; coluna 11, controle positivo: amplificação da ORF *quimosina bovina B*.

#### IV.3.6. Detecção da produção da Quimosina A e B pelas linhagens recombinantes de *L. lactis*

Para verificar se os quatro clones, previamente confirmados (*L. lactis* NCDO2118 pXyIT:SEC:quimosina A clones 1 e 2, e *L. lactis* NCDO2118 pXyIT:SEC:quimosina B clones 1 e 2) estavam produzindo a proteína recombinante, foi realizada a extração de proteínas da fração total e do sobrenadante de suas culturas induzidas e não induzidas. As proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida para a realização de *Western blot* seguido de imunodeteccção; o que confirmou a produção da proteína por dois clones: *L. lactis* NCDO2118 pXyIT:SEC:quimosina A, clone 1 e *L. lactis* NCDO2118 pXyIT:SEC:quimosina B, clone 1 (Figura 34). Ambos os clones apresentaram níveis similares de produção.

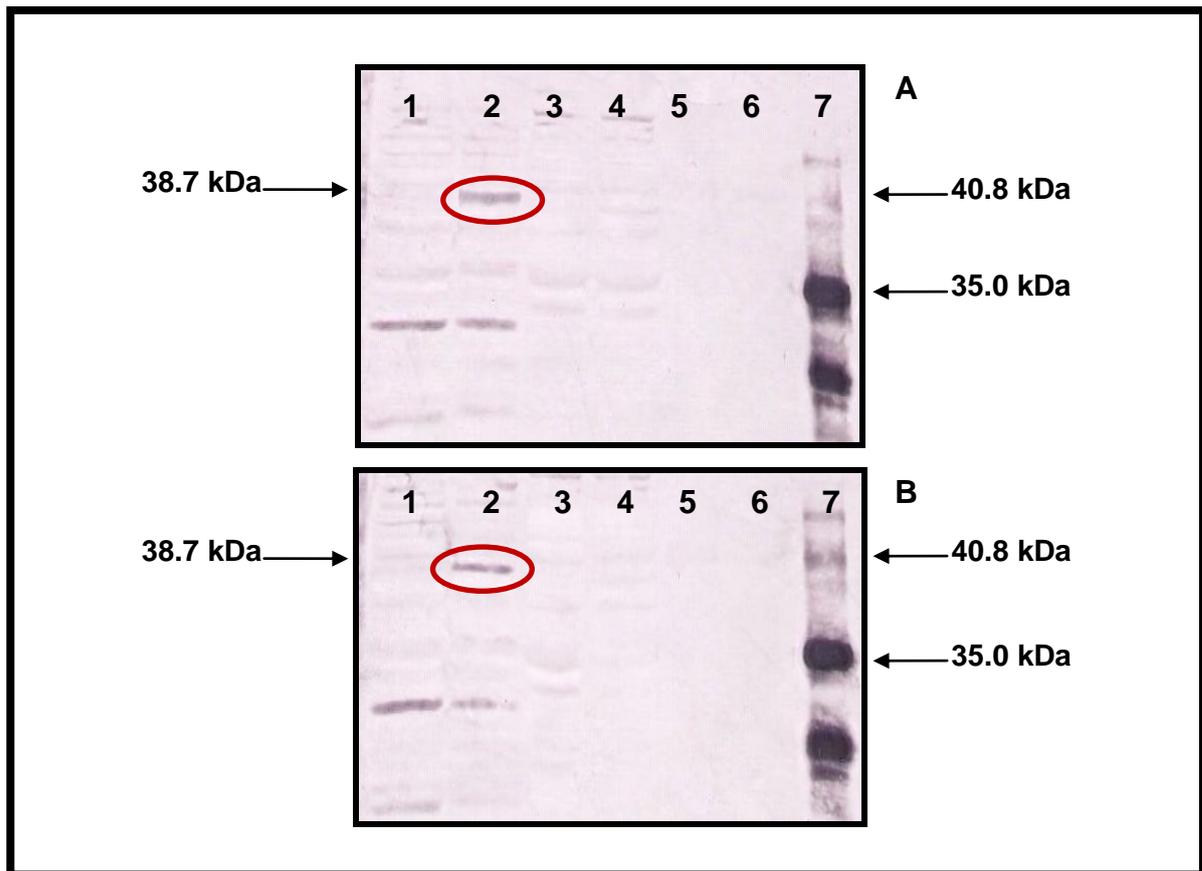


**Figura 34** – Imunodeteção da rQuimosina bovina A e rQuimosina bovina B a partir de culturas dos clones de *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:quimosina A) e *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:quimosina A), respectivamente. A: Colunas 1 e 2, proteínas extraídas da fração celular de *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:quimosina A) clone 1, não induzido e induzido, respectivamente; colunas 3 e 4, proteínas extraídas da fração secretada de *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:quimosina A) clone 1, não induzido e induzido, respectivamente; colunas 5 e 6, proteínas extraídas da fração celular de *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:quimosina A) clone 2; colunas 7 e 8, proteínas extraídas da fração secretada de *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:quimosina A) clone 2; e coluna 9, controle: proteína Quimosina bovina purificada (Sigma). B: Colunas 1 e 2, proteínas extraídas da fração celular de *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:quimosina B) clone 1, não induzido e induzido, respectivamente; colunas 3 e 4, proteínas extraídas da fração secretada de *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:quimosina B) clone 1, não induzido e induzido, respectivamente; colunas 5 e 6, proteínas extraídas da fração celular de *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:quimosina B) clone 2; colunas 7 e 8, proteínas extraídas da fração secretada de *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:quimosina B) clone 2; e coluna 9, controle: proteína Quimosina bovina purificada (Sigma). A marcação em vermelho destaca o fragmento protéico referente à rQuimosina bovina A e rQuimosina B. Trinta microlitros de cada amostra e oito microlitros do controle foram depositados nas canaletas. A membrana foi revelada utilizando-se soro de camundongo anti-Quimosina bovina (1:100).

#### ***IV.3.3.1. Avaliação do endereçamento da rQuimosina bovina A e rQuimosina B***

Na “Estratégia I” foi observado que a proteína heteróloga produzida pela linhagem *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B) não estava sendo secretada em decorrência de estar ficando retida no envelope celular. Nesta nova estratégia duas linhagens foram construídas *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina A) e *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:pró-quimosina B) no intuito de produzir uma molécula protéica que apresentasse uma conformação que pudesse ser secretada para o meio extracelular (Le Loir *et al.*, 2005). No entanto, nem mesmo as moléculas de rQuimosina A e B tem sido detectadas, por imunodeteção, no meio extracelular, de modo que o experimento realizado para avaliar o endereçamento da rPró-quimosina B, foi utilizado também para avaliar o endereçamento da rQuimosina A e rQuimosina B.

Para tanto, realizou-se uma nova extração protéica das linhagens de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina A) e *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina B). Culturas não induzida e induzida, foram submetidas à extração protéica das frações celular, citoplasmática e secretada, estas foram submetidas à imunodeteção com soro anti-Quimosina, no intuito de identificar o compartimento em que a proteína recombinante esta sendo retida. Na Figura 35 é possível observar que a maior concentração da proteína recombinante na fração celular, demonstrando assim, que a rQuimosina A e rQuimosina B estão ficando retidas no envelope celular, assim como aconteceu com a rPró-quimosina.



**Figura 35** – Imunodeteção para avaliação do endereçamento da rQuimosina A e rQuimosina B produzidas pelas linhagens de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina A) clone 1 e *L. lactis* NCDO 2118 (pXyIT:SEC:quimosina B) clone 1. A: Colunas 1 e 2, proteínas extraídas da fração celular de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina A) clone 1, não induzido e induzido, respectivamente; colunas 3 e 4, proteínas extraídas da fração citoplasmática de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina A) clone 1, não induzido e induzido, respectivamente; colunas 5 e 6, proteínas extraídas da fração secretada de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina A) clone 1, não induzido e induzido, respectivamente; e coluna 7, controle: proteína Quimosina bovina purificada (Sigma). B: Colunas 1 e 2, proteínas extraídas da fração celular de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina B) clone 1, não induzido e induzido, respectivamente; colunas 3 e 4, proteínas extraídas da fração citoplasmática de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina B) clone 1, não induzido e induzido, respectivamente; colunas 5 e 6, proteínas extraídas da fração secretada de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:quimosina B) clone 1, não induzido e induzido, respectivamente; e coluna 7, controle: proteína Quimosina bovina purificada (Sigma). A marcação em vermelho destaca o fragmento protéico referente à rQuimosina bovina A e rQuimosina B. Trinta microlitros de cada amostra e oito microlitros do controle foram depositados nas canaletas. A membrana foi revelada utilizando-se soro de camundongo anti-Quimosina bovina (1:100).

#### IV.4. Conclusão

Os resultados apresentados na presente seção permitem chegar às seguintes conclusões:

1. As linhagens recombinantes (*L. lactis* NCDO2118 pXyT:SEC:quimosina A e *L. lactis* NCDO2118 pXyT:SEC:quimosina B) foram capazes de produzir a Quimosina.

2. As linhagens de *L. lactis* construídas para a secreção da Quimosina A e B não foram capazes de secretá-la, ficando estas retidas no envelope celular.

3. A atividade proteolítica da Quimosina A e Quimosina B produzidas pelas linhagens recombinantes de *L. lactis* estão em fase de avaliação, não tendo sido finalizados os experimentos até a data de apresentação deste trabalho.

**V**  
**PERSPECTIVAS**

## V.2. Perspectivas

- Testar diferentes protocolos para promover a conversão da Pró-quimosina B em Quimosina B.
  
- Avaliar a capacidade de coagulação das rQuimosinas A e B.
  
- Comparar a eficiência de coagulação entre a Quimosina bovina produzida em *L. lactis* e as enzimas comerciais, obtidas a partir do estômago de bezerros e pela tecnologia do DNA recombinante.
  
- Ensaios de preparação de mini-queijo utilizando a Quimosina bovina recombinante produzida por *L. lactis*.

**VI**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ALONSO, P.R.** (2001). Caracterização do perfil proteolítico determinado pela utilização do cardo (*Cynara cardunculus* L.) em queijos de leite cru de ovelha. Relatório do trabalho de fim de curso de Engenharia Agro-Industrial, Lisboa.

**AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.** (2001). Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Bllucger, v. 4. 523p.

**ARAYA-KOJIMA, T.; ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S.; TANAKA, K. AND TAKAHASHI, H.** (1995). Identification and molecular analysis of *Lactococcus lactis* rpoD operon. *Biosci Biotechnol Biochem.* 59:73-77.

**ASATO, N. AND RAND, A. G. JR.** (1972). Fractionation and isolation of the multiple forms of prorennin (prochymosin). *Biochem J.* 129:841–846.

**ASATO, N. AND RAND, A. G. JR.** (1977). Activation studies of the multiple forms of prochymosin (prorennin). *Biochem J.* 167:429–434.

**BEPPU, T.** (1991). Recombinant DNA technology for production and modification of milk clotting enzymes. In: Proc XXII/th /nt Dairy Congr, Montreal, 8-12 October, 1990, vol 2. Int Dairy Fed, Brussels, Belgium; 1604-1612

**BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G.; CORTES-PEREZ, N.G.; LEFÈVRE, F.; GUIMARÃES, V.; RABOT, S.; ALCOCER-GONZALEZ, J.M.; GRATADOUX, J.J.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; TAMEZ-GUERRA, R.S.; CORTIER, G.; GRUSS, A. AND LANGELLA P.** (2005). A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol.* 175:7297-7302.

**BOLOTIN, A.; MAUGER, S.; MALARME, K.; EHRLICH, S.D. AND SOROKIN, A.** (1999). Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76: 27-76.

**BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, S.; JAILLON, O.; MALARME, K.; WEISSENBACH, J.; EHRLICH, S.D. AND SOROKIN, A.** (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res*. 11:731-753.

**BONATO, M.C.M.; COSTA, S.O.P. AND BIANCO, M.** (1982). Regulation of extracellular protease secretion in *Proteus mirabilis*. *Braz J Genet*. 3:467-482.

**BRAAT, H.; ROTTIERS, P.; HOMMES, D.W.; HUYGHEBAERT, N.; REMAUT, E.; REMON, J.P.; VAN DEVENTER, S.J.; NEIRYNCK, S.; PEPPELENBOSCH, M.P. AND STEIDLER, L.** (2006). A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 4:754-759.

**BREM, G.; BESENFELDER, U.; ZINOVIEVA, N.; SEREGI, J.; SOLT, L. AND HARTL, P.** (1995). Mammary gland-specific expression of chymosin constructs in transgenic rabbits. *Theriogenology*. 43:175.

**BRENNAN, M.J.** (2005). The tuberculosis vaccine challenge. *Tuberculosis* (Edinb). 85:7-12.

**CAMPOS, I.B.; DARRIEUX, M.; FERREIRA, D.M.; MIYAJI, E.N.; SILVA, D.A.; ARÊAS, A.P.; AIRES, K.A.; LEITE, L.C.; HO, P.L. AND OLIVEIRA, M.L.** (2008). Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the Pneumococcal Surface Protein A: induction of antibodies, complement deposition and partial protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Microbes Infect*. 10:481-488.

**CARR, F.J.; CHILL, D. AND MAIDA N.** (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*. 28:281-370.

**CARROLL, R.** (2003). Making Cheese, Butter & Yogurt. Storey Books.

**CHANG, T.L.; CHANG, C.H.; SIMPSON, D.A.; XU, Q.; MARTIN, P.K.; LAGENAUR, L.A.; SCHOOLNOK, G.K.; HO, D.D.; HILLIER, S.L.; HOLODNIY, M.; LEWICKI, J.A. AND LEE, P.P.** (2003). Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sc USA*. 100:11672-11677.

**CHATEL, J.M.; LANGELLA, P.; ADEL-PATIENT, K.; COMMISSAIRE, J.; WAL, J.M. AND CORTHER, G.** (2001). Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin Diagn Lab Immunol*. 8:545-551.

**CHEN, G.F.T. AND INOUE, M.** (1994). Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli*. *Genes Dev*. 8:2641–2652

**CHIARUTTINI, C. AND MILLET, M.** (1993). Gene organization, primary structure and RNA processing analysis of a ribosomal operon in *Lactococcus lactis*. *J Mol Biol*. 230:57-76.

**CHITPINITYOL, S. AND CRABBE, M.J.C.** (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem*. 61:395-418.

**CHISTI, Y.** (1998). Strategies in downstream processing. In: Subramanian G, editor. Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook, vol. 2. New York: Wiley-VCH, pp. 3–30.

**DANLEY, D. E. AND GEOGHEGAN, K. F.** (1988). Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C. *J B C*. 263:9785–9789.

**DE LEEUW, A.; SWINKELS, B.W.** (1993) Production of chymosin by the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Voedingsmiddelen Teehnol*. 26 (16-17) 9-12.

**DE RUYTER, P.G.; KUIPERS, O.P. AND DE VOS, W.M.** (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol.* 62:3662-3667.

**DE VOS, W.M.** (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2:289-295.

**DE VOS, W.M. AND SIMONS, G.** (1994). Gene cloning and expression systems in lactococci, pp. 52–105. in Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Gasson, M.J. and de Vos, W.M. (eds.) Chapman and Hall, London.

**DESMAZEAUD, M.J. AND GRIPON, J.-C.** (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening, *Milchwissenschaft.* 32:731-734.

**DICKELY, F.; NILSSON, D.; HANSEN, E.B. AND JOHANSEN, E.** (1995). Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector. *Mol Microbiol.* 15:839-847.

**DIEYE, Y.; USAI, S.; CLIER, F.; GRUSS, A. AND PIARD, J.C.** (2001). Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 183:4157- 4166.

**DJORDJEVIC, G.M. AND KLAENHAMMER, T.R.** (1998). Inducible gene expression systems in *Lactococcus lactis*. *Mol Biotechnol.* 9:127-139.

**DONNELLY, W. J.; CARROLL, D. P.; O'CALLAGHAN, D. M. AND WALLS, D.** (1986). Genetic polymorphism of bovine chymosin. *J Dairy Res.* 53:657–664.

**DONNELLY, W. J.; O'CALLAGHAN, D.M. AND CARROLL, D. P.** (1984). Multiple forms of calf prochymosin and chymosin. *Biochem Soc Trans.* 12:440–441.

**DROUAULT, S.; CORTIER, G.; EHRlich, S.D. AND RENAULT, P.** (2000). Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 66:588-598.

**DROUAULT, S.; JUSTE, C.; MARTEAU, P.; RENAULT, P. AND CORTIER, G.** (2002). Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl Environ Microbiol.* 68:3166-3168.

**DUNN-COLEMAN, N.S.; BLOEBAUM, P.; BERKA, R.M.; ROBINSON, N.; ARMSTRONG, G.; WARD, M.; PRZETAK, M.; CARTER, G.I.; LA-COSTA, R.** (1991). Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Biotech (NY)*. 10:976–81.

**DUWAT, P.; HAMMER, K.; BOLOTIN, A. AND GRUSS, A.** (2000). Genetics of Lactococci. In *Gram-positive pathogens* ed. Fischetti, V.A. pp. 295-306. Washington DC: ASM.

**ECK, A.** (1987). O queijo. Lisboa: Editora Europa-America LTDA, 336 p.

**EICHENBAUM, Z.; FEDERLE, M.J.; MARRA, D.; DE VOS, W.M.; KUIPERS, O.P.; KLEEREBEZEM, M. AND SCOTT, J.R.** (1998). Use of the lactococcal nisA promoter to regulate gene expression in gram-positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. *Appl Environ Microbiol.* 64:2763-2769.

**EMMONS, D.B.; BINNS, M.R.** (1991). Milk clotting enzymes. IV. Proteolysis during Cheddar cheesemaking in relation to estimated losses of basic yield using chymosin derived by fermentation (*A. niger*) and modified enzyme from *M. miehei*. *Milchwissenschaft.* 46:343-347.

**EMTAGE, J.S.; ANGAL, S.; DOEL, M.T.; HARRIS, T.J.R.; JENKINS, B.; LILLEY, G.; LOWE, P.A.** (1983). Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 80:3671-3675.

**FIAT, A. M. AND JOLLES, P.** (1989). Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. *Mol Cell Biochem.* 87:5–30.

**FISCHETTI, V.A.; PANCHOLI, V. AND SCHNEEWIND, O.** (1990). Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface protein of gram-positive cocci. *Mol Microbiol.* 4:1603-1605.

**FOLTMANN, B.** (1964). Studies on rennin. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg: On the limited proteolysis of A-rennin and the proteolytic activity of chromatographically purified fractions of rennin*, 34:319–325.

**FOLTMANN, B.; PEDERSEN, V.B.; JACOBSEN, H.; KAUFFMAN, D. AND WYBRANDT, G.** (1977). The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74:2321–2324.

**FOLTMAN, B.; PEDERSON, V.B.; KAUFFMAN, D.; WYBRANT G.** (1979). The primary structure of calf chymosin. *J Biol Chem.* 254:8447–56.

**FOLTMAN, B.** (1987). General and molecular aspects of rennets. In: Fox PF, editor. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1. London: Elsevier, pp. 37–68.

**FOLTMANN, B.** (1992). Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 210 (Suppl.), 65–79.

**FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T.** (1990). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Elsevier Science Publishing CO., INC., 1-70.

**FOX, PF.** (1988). Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biotechnol. Appl Biochem.* 10:522–35.

**FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H.** (1999). Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. Em: *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Ed. Law, B. A. Blackie Academic & Professional. London pp.1-49.

**FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H.; COGAN, T.M.; GUINEE, T.P.** (2004). *Chesse – Chemistry, Physics and Microbiology, Third Edition, Volume 1 - General Aspects*.

**FULLER, R. AND GIBSON, G.R.** (1997). Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol.* 222:28-31.

**GINSBERG, A.M.** (2000). A proposed national strategy for tuberculosis vaccine development. *Clin Infect Dis.* 30:S233-S242.

**GODON, J.J.; JURY, K.; SHEARMAN, C.A. AND GASSON, M.J.** (1994). The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation gene *cluA*. *Mol Microbiol.* 12:655-663.

**GOFF, C.G.; MOIR, D.T.; GRAVINS, T.C.; SMITH, R.S.; YAMASAKI, E.; TAUNTON-RIGBY, A.** (1984). Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 27:35–46.

**GOUY, M. AND GAUTIER, C.** (1982). Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acid Res.* 10:7055-7074.

**GRANGETTE, C.; MULLER-ALOUF, H.; GOUDERCOURT, D.; GEOFFROY, M.C.; TURNER, M. AND MERCENIER, A.** (2001). Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun.* 69:1547-1553.

**GRANTHAM, R.; GAUTIER, C.; GOUY, M.; JACOBZONE, M. AND MERCIER, R.** (1981). Codon catalogue usage is a genome strategy for genome expressivity. *Nucleic Acids Res.* 9:r43-r75.

**GROVES, M.R.; DHANARAJ, V.; BADASSO, M.; NUGENT, P.; PITTS, J.E.; HOOVER, D.J. AND BLUNDELL, T.L.** (1998). A 2.3 Å resolution structure of chymosin complexed with a reduced bond inhibitor show that the active site beta-hairpin flap is rearranged when compared with the native crystal structure. *Protein Eng.* 10:833-40.

**GUEDON, G.; BOURGOIN, F.; PEBAY, M.; ROUSSEL, Y.; COLMIN, C.; SIMONET, J.M. AND DECARIS, B.** (1995). Characterization and distribution of two insertion

sequences, IS1191 and iso-IS981, in *Streptococcus thermophilus*: does intergeneric transfer of insertion sequences occur in lactic acid bacteria co-cultures? *Mol Microbiol.* 16:69-78.

**GUIGOZ, Y. AND SOLMS, J.** (1976). Bitter peptides, occurrence and structure. *Chemical Senses and Flavours.* 2:71-84.

**HALFHIDE, B.** (1992). A new generation of coagulant. *Dairy Ind Int.* 57(6):45.

**HARBOE, M.K.** (1992). Chymogen, a chymosin rennet manufactured by fermentation of *Aspergillus niger*. *Bull Int Dairy Fed.* 269:3-7.

**HARRIS, T.J.R.; LOWE, P.A.; LYONS, A.; THOMAS, P.G.; EATON, M.A.W.; MILLICAN, T.A.; PATEL, T.P.; BOSE, C.C.; CAREY, N.H.; DOEL, M.T.** (1982). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin. *Nucleic Acids Res.* 10:2177-2187.

**HIDAKA, M.; SASAKI, K.; UOZUMI, T.; BEPPU, T.** (1986). Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. *Gene.* 43:197–203.

**HO, S.N.; HUNT, H.D.; HORTON, R.M.; PULLEN, J.K.; PEASE, L.R.** (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* 77:51–59.

**IWAKI, M.; OKAHASHI, N.; TAKAHASHI, I.; KANAMOTO, T.; SUGITA KONISHI, Y.; AIBARA, K. AND KOGA, T.** (1990). Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun.* 58:2929-2934.

**JANA, S. AND DEB, J. K.** (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67:289-298.

**JANNIÈRE, L.; GRUSS, A. AND EHRLICH, D.** (1993). Plasmids. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics* ed. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. pp. 625-644. Washington DC: ASM.

**JOHNSON, M.E. AND LUCEY, J.A.** (2006). Major technological advances and trends in cheese. *J Dairy Sci.* 89 (4):1174–1178.

**KARLIN, S.; MRAZEK, J. AND CAMPBELL, A.M.** (1998). Codon usages in different classes of the *Escherichia coli* genome. *Mol Microbiol.* 29:1341-55.

**KLEEREBEZEM, M.; BEERTHUYZEN, M.M.; VAUGHAN, E.E.; DE VOS, W.M. AND KUIPERS, O.P.** (1997). Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol.* 63:4581-4584.

**KLESSEN, C.; SCHMIDT, K.H.; GUMPERT, J.; GROSSE, H.H.; MALKE, H.** (1989). Complete secretion of active bovine prochymosin by genetically engineered L-forms of *Proteus mirabilis*. *Appl Env Microbiol.* 55:1009–15.

**KOK, J.; VAN DER VOSSEN, J.M. AND VENEMA, G.** (1984). Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 48:726-731.

**KOLMER, M.; ORD, T. AND ULMANE, I.** (1991). Expression of recombinant calf chymosin in mammalian cell culture. *J Biotechnol.* 20:131-140.

**KUIPERS, O.P.; BEERTHUYSEN, M.M.; SIEZEN, R.J. AND DE VOS, W.M.** (1993). Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur J Biochem.* 216:281-291.

**KUIPERS, O.P.; DE RUYTER, P.G.; KLEEREBEZEM, M. AND DE VOS, W.M.** (1997). Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* 15:135-140.

**KUIPERS, O.P.; DE RUYTER, P.G.; KLEEREBEZEM, M. AND DE VOS, W.M.** (1998). Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnology (NY)*. 64:15-21.

**LANGELLA, P. AND LE LOIR, Y.** (1999). Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Braz J Med Biol Res*. 32:191-198.

**LE BOURGEOIS, P.; LAUTIER, M.; VAN DEN BERGHE, L.; GASSON, M.J. AND RITZENTHALER, P.** (1995). Physical and genetic map of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome: comparison with that of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403 reveals a large genome inversion. *J Bacteriol*. 177:2840-2850.

**LE LOIR, Y.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S.C.; FREITAS, D.A.; MIYOSHI, A.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G.; NOUAILLE, S.; RIBEIRO, L.A.; LECLERCQ, S.; GABRIEL, J.E.; GUIMARAES, V.D.; OLIVEIRA, M.N.; CHARLIER, C.; GAUTIER, M. AND LANGELLA, P.** (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis* : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact*. 4:2.

**LE LOIR, Y.; GRUSS, A.; EHRLICH, S.D. AND LANGELLA, P.** (1994). Direct screening of recombinants in Gram-positive bacteria using the secreted Staphylococcal nuclease as a reporter. *J Bacteriol*. 176:5135-5139.

**LE LOIR, Y.; GRUSS, A.; EHRLICH, S.D. AND LANGELLA, P.** (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*. 180:1895-1903.

**LE LOIR, Y.; NOUAILLE, S.; COMMISSAIRE, J.; BRETIGNY, L.; GRUSS, A. AND LANGELLA, P.** (2001). Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*. 67:4119-4127.

**LEE, S.F.** (2003). Oral colonization and immune responses to *Streptococcus gordonii*: Potencial use as a vector to induce antibodies against respiratory pathogens. *Curr Opin Infect Dis.* 16:231-235.

**LEMIEUX, L.; SIMARD, R. E.** (1991). Bitter flavour in dairy products I. A review of the factors likely to influence its development mainly in cheese manufacture. *Lait.*, v. 71, p. 599-636.

**LYNCH, E.P.** (1994). Chymosine produite par fermentation: développement, production et application. *RevENIL.* 176 :13-15.

**MAHAUT, M.; JEANTET, R.; BRULÉ, G.** (2000). Initiation à la Technologie Fromagère. Editions Tec & Doc.

**MANTAFOUNIS, D.; PITTS, J.** (1990). Protein engineering of chymosin: Modification of the optimum pH of enzyme analysis. *Protein Eng.* 3(7):605–9.

**MARSTON, F.A.O. AND ANGAL, S.** (1985). White S, Lowe PA. Solubilization and activation of recombinant calf prochymosin from *E. coli*. *Biochim Soc Trans.* 13(6):1035.

**MARTH, E.H.; STEELE, J.L.** (2001). Applied Dairy Microbiology. 2ed. Dekker. New York.

**MATHUR, M.P. AND DUTTA, R.D.** (1983). Rennet from living calves. Dairy Guide 5(12):39–47.

**MCCAMAN, M.T.** (1989). Fragments of prochymosin produced in *E. coli* from insoluble inclusion bodies. *J Bacteriol.* 171:1225–7.

**MCGUIRE, J.** (1986). Cloning, expression, purification and testing of chymosin. Bio-expo-86 Proceedings 121–41.

**MCMURRAY, D.N.; CARLOMAGNO, M.A.; MINTZER, C.L. AND TETZLAFF, C.L.** (1985). *Mycobacterium bovis* BCG vaccine fails to protect protein-deficient guinea pigs against respiratory challenge with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 50:555-559.

**MEDAGLINI, D.; RUSH, C.M.; SESTINI, P. AND POZZI, G.** (1997). Commensal bacteria as vectors for mucosal vaccines against sexually transmitted diseases: vaginal colonization with recombinant streptococci induces local and systemic antibodies in mice. *Vaccine.* 15:1330-1337.

**MEDINA, E. AND GUZMÁN, C.A.** (2001). Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine.* 19:1573-1580.

**MELLOR, J.; DOBSON, M.J.; ROBERTS, N.A.** (1983). Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 24:1-14.

**MERCENIER, A.** (1999). Lactic Acid Bacteria as live vaccines. In *Probiotics: A critical review* ed. Tannock, G. pp. 113-127. Wymondham: Horizon Scientific Press.

**MIERAU, I.** (1996). Peptide degradation in *Lactococcus lactis in vivo*: a first exploration. Ph.D. dissertation. University of Groningen, Groningen, The Netherlands.

**MIYOSHI, A.; JAMET, E.; COMMISSAIRE, J.; RENAULT, P.; LANGELLA, P. AND AZEVEDO, V.** (2004). A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 239:205-212.

**MIYOSHI, A.; BERMUDEZ, L.; AZEVEDO, M. S. P.; LANGELLA, P.; AZEVEDO, V. A. C.** (2009). Lactic Acid Bacteria as live vectors: Heterologous protein production and delivery systems In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*.

**MOHAMADZADEH, M.; DUONG, T.; HOOVER, T. AND KLAENHAMMER, T.R.** (2008). Targeting mucosal dendritic cells with microbial antigens from probiotic lactic acid bacteria. *Expert Rev Vaccines.* 7:163-174.

**MOHANTY, A.K.; MUKHOPADHYAY, U.K.; GROVER, S.; BATISH, V.K.** (1999). Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology advances*. 17:205-217.

**MOIR, D.; MAO, T.; SCHUMM, J.W.; VOVIS, G.F.; ALFORD, B.L.; TAUNTON-RIGBY, A.** (1982). Molecular cloning and characterization of double stranded cDNA coding for bovine chymosin. *Gene*. 19:127–38.

**NAUTA, A.; VAN SINDEREN, D.; KARSENS, H.; SMIT, E.; VENEMA, G. AND KOK, J.** (1996). Inducible gene expression mediated by a repressor-operator system isolated from *Lactococcus lactis* bacteriophage r1t. *Mol Microbiol*. 19:1331-1341.

**NICOLAU, E.S.** (2008). Produção de queijos no Brasil. Apostila. Goiânia-GO, UFG.

**NISHIMORI, K.; KAWAGUCHI, Y.; HIDAKA, M.; UOZUMI, T.; BEPPU, T.** (1982). Expression of cloned calf prochymosin gene sequence in *E. coli*. *Gene*.19:337–44.

**NORTON, P.M.; LE PAGE, R.W. AND WELLS, J.M.** (1995). Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol* (Praha). 40:225-230.

**NOUAILLE, S.; RIBEIRO, L.A.; MIYOSHI, A.; PONTES, D.; LE LOIR, Y.; OLIVEIRA, S.C.; LANGELLA, P. AND AZEVEDO, V.** (2003). Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res*. 2:102-111.

**O'SULLIVAN, D.J.; WALKER, S.A.; WEST, S.G. AND KLAENHAMMER, T.R.** (1996). Development of an expression strategy using a lytic phage to trigger explosive plasmid amplification and gene expression. *Biotechnology (NY)*. 14:82-87.

**OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S. AND ISOLAURI, E.** (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82:279-289.

**PARENTE, D.; FERRA, F.; GALLI, G.; GRANDI, G.** (1990). Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Lett.* 77:243-249.

**PAVAN, S.; HOLS, P.; DELCOUR, J.; GEOFFROY, M.C.; GRANGETTE, C.; KLEEREBEZEM, M. AND MERCENIER, A.** (2000). Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. *Appl Environ Microbiol.* 66:4427-4432.

**PEDERSEN, V.B.; CHRISTENSEN, K.A.; FOLTMAN, B.** (1979). Investigations on the activation of bovine prochymosin. *Eur J Biochem.* 94:573–80.

**PIARD, J.C.; HAUTEFORT, I.; FISCHETTI, V.A.; EHRLICH, S.D.; FONS, M. AND GRUSS A.** (1997). Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 179:3068-3072.

**POQUET, I.; SAINT, V.; SEZNEC, E.; SIMOES, N.; BOLOTIN, A. AND GRUSS, A.** (2000). HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol Microbiol.* 35:1042-1051.

**POUWELS, P.H.; LEER, R.J. AND BOERSMA, W.J.A.** (1996). The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: Development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *J Biotechnol.* 44:183-192.

**PRAANING-VAN DALEN, D.P.** (1992). Application and regulatory position of Maxiren. *BullInt Dairy Fed.* 269:8-12.

**RAMPILLI, M.; LARSEN, R.; HARBOE, M.** (2005). Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *International Dairy Journal.* 15:1130-1137.

**REVENEAU, N.; GEOFFROY, M.C.; LOCHT, C.; CHAGNAUD, P. AND MERCENIER, A.** (2002). Comparison of the immune responses induced by local

immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine*. 20:1769-1777.

**ROBERFROID, M.B.** (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr*. 71:1682-1687.

**ROBINSON, K.; CHAMBERLAIN, L.M.; LOPEZ, M.C.; RUSH, C.M.; MARCOTTE, H.; LE PAGE, R.W. AND WELLS, J.M.** (2004). Mucosal and cellular immune responses elicited by recombinant *Lactococcus lactis* strains expressing tetanus toxin fragment C. *Infect Immun*. 72:2753-27561.

**ROBINSON, K.; CHAMBERLAIN, L.M.; SCHOFIELD, K.M.; WELLS, J.M. AND LE PAGE, R.W.** (1997). Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol*. 15:653-657.

**RUSH, C.M.; HAFNER, L.M. AND TIMMS, P.** (1994). Genetic modification of a vaginal strain of *Lactobacillus fermentum* and its maintenance within the reproductive tract after intravaginal administration. *J Med Microbiol*. 41:272-278.

**SAIER, M.H. JR.** (1995). Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? *FEBS Lett*. 362:1–4

**SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; DE VOS, W.M.; FONDEN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.E. AND MATTILA-SANDHOLM, T.** (1998). Demonstration of safety of probiotics – a review. *Int J Food Microbiol*. 44:93-106.

**SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W.** (2001). *Molecular Cloning – A laboratory Manual*. ed. Cold Spring Harbor, New York.

**SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSO, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.74:5463-5467.

**SECADES, P, AND GUIJARRO, J.A.** (1999). Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl Environ Microbiol.* 65:3969–3975.

**SEEGERS, J.F.** (2002). Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol.* 20:508-515.

**SHARP, P.M.; AND LI, W.H.** (1987). The codon adaptation index – a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* 15:1281-1295.

**SHEEHAN, A.; CUINN, G.O.; FITZGERALD, R.J. AND WILKINSON, M.G.** (2006). Proteolytic enzyme activities in Cheddar cheese juice made using lactococcal starters of differing autolytic properties. *J Appl Microbiol.* 100:893–901.

**SHORTLE, D.** (1983). A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. *Gene.* 22:181-189.

**SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S.B.; GALLI, V.; LUERCE, T.D.; HARTWIG, D.D.; MOREIRA, A. N.; DELLAGOSTIN, O.A.** (2009). Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods.* 79:101-105.

**SIMON, D. AND CHOPIN, A.** (1988). Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie.* 70:559-566.

**SIMONEN, M. AND PALVA, I.** (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol Rev.* 57:109-137.

**STADHOUDERS, J. AND HUP, G.** (1975). *Neth Milk Dairy J.* 29:335.

**STAHL, S.; SAMUELSON, P.; HANSSON, M.; ANDRÉONI, C.; GOETSCH, L.; LIBON, C.; LILJEQVIST, S.; GUNNERIUSSON, E.; BINZ, H.; NGUYEN, T.N. AND UHLÉN, M.** (1997). Development of non-pathogenic staphylococci as vaccine

delivery vehicles. In *Recombinant Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization* ed. Wells, J.M. and Pozzi, G. pp. 61-81. New York: R. G. Landes Biomedical Publishers, Springer-Verlag.

**STEELE, J.L.; AND UNLU, G.** (1992). Steele and G. Unlu, Impact of lactic acid bacteria on cheese flavor development, *Food Technol.* 46:128–135.

**STEIDLER, L.; ROBINSON, K.; CHAMBERLAIN, L.; SCHOFIELD, K.M.; REMAUT, E.; LE PAGE, R.W. AND WELLS, J.M.** (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun.* 66:3183-3189.

**STILES, M.E. AND HOLZAPFEL, W.H.** (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* 36:1-29.

**SUZUKI, A.; MIZUMOTO, A.; SARR, M.G. AND DIMAGNO, E.P.** (1997). Bacterial lipase and high-fat diets in canine exocrine pancreatic insufficiency: a new therapy of steatorrhea? *Gastroenterology.* 112 :2048-2055.

**TAILLIEZ, P.** (2001). Mini-revue: les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait.* 81:1-11.

**TANG, J.; JAMES, M.N.G.; HSU, I.H.; JENKINS, J.A.; BLUNDELL** (1978). Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteinases. *Nature.* 1978:271:618–21.

**TEUBER, M.** (1990). Production of chymosin (EC 3.4.23.4) by microorganisms and its use for cheesemaking. *BullInt Dairy Fed.* 251:3-15.

**TON-THAT, H.; LIU, G.; MAZMANIAN, S.K.; FAULL, K.F. AND SCHNEEWIND, O.** (1999). Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:12424-12429.

**UCHIYAMA, H.; UOZUMI, T.; BEPPU, T.; ARIMA, K.** (1980). Purification of prorennin mRNA and its translation in vitro. *Agric Biol Chem.* 44:1373–81.

**USTUNOL, Z. AND HICKS, C.L.** (1990). Effect of calcium addition on yield of cheese manufactured with *Endothia parasitica* protease. *J Dairy Sci.* v. 73, n. 1, p. 17-25.

**VALLEJO, J.A.; AGEITOS, J.M.; POZA, M. AND VILLA, T.G.** (2008). Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem.* 56:10606–10610.

**VAN ASSELDONK, M.; RUTTEN, G.; OTEMAN, M.; SIEZEN, R.J.; DE VOS, W.M. AND SIMONS, G.** (1990). Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene.* 95:155-160.

**VAN DE GUCHTE, M.; EHRLICH, S.D. AND MAGUIN, E.** (2001). Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol.* 91:147-153.

**VAN DE GUCHTE, M.; KOK, J. AND VENEMA, G.** (1992). Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev.* 88:73-92.

**VAN DEN BERG, G.** (1992). Fermentation-produced chymosin; technological aspects of its use for cheese making. *Bull Int Dairy Fed.* 269:13-17.

**VAN-DEN-BERG, J.A.; VAN-DER-LAKEN, K.J.; VEM-DOYEN, A.J.; RENNERS, T.C.** (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology (NY).* 8(2):135–9.

**VAN DER VOSSSEN, J.M.B.M.; VAN DER LELIE, D. AND VENEMA, G.** (1987). Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl Environ Microbiol.* 53:2452-2457.

**VAN DIJCK, P. W. M.** (1999). Chymosin and Phytase. Made by genetic engineering, *J Biotechnol.* 67:77-80.

**VAN ROOIJEN, R.J.; GASSON, M.J. AND DE VOS, W.M.** (1992). Characterization of the *Lactococcus lactis* lactose operon promoter: contribution of flanking sequences and LacR repressor to its activity. *J Bacteriol.* 174:2273-2280.

**VEGA-HERNÁNDEZ, M.C.; GÓMEZ-COELHO, A.; VILLAR, J.; CLAVERIE-MARTÍN, C.** (2004). Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. *J Biotechnol.* 114:69-79.

**VEISSEYRE, R.** (1998). *Lactologia técnica*. 1a Ed. Zaragoza: Acribia, cap. 12, p.374.

**WELLS, J.M. AND MERCENIER, A.** (2008). Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 14:1-14.

**WELLS, J.M.; WILSON, P.W.; NORTON, P.M. AND LE PAGE, R.W.** (1993a). A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 59:3954-3959.

**WELLS, J.M.; WILSON, P.W.; NORTON, P.M.; GASSON, M.J. AND LE PAGE, R.W.** (1993b). *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol.* 8:1155-1162.

**WU, C.M. AND CHUNG, T.C.** (2007). Mice protected by oral immunization with *Lactobacillus reuteri* secreting fusion protein of *Escherichia coli* enterotoxin subunit protein. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 50:354-365.

**XIN, K.Q.; HOSHINO, Y.; TODA, Y.; IGIMI, S.; KOJIMA, Y.; JOUNAI, N.; OHBA, K.; KUSHIRO, A.; KIWAKI, M.; HAMAJIMA, K.; KLINMAN, D. AND OKUDA, K.** (2003). Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. *Blood.* 102:223-228.

**YIGANG, X.U. AND YIJING, L.I.** (2008). Construction of recombinant *Lactobacillus casei* efficiently surface displayed and secreted porcine parvovirus VP2 protein and comparison of the immune responses induced by oral immunization. *Immunology.* 124:68-75.

**YU, P.L.** (1994). Production of chymosin for the dairy industry by recombinant DNA technology, *Australas Biotechnol.* 4:19-23.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)