



Expressão e caracterização de α -amilase de *Bacillus licheniformis* DSM13 em levedura *Pichia pastoris*

Helber Abellini Astolpho¹, Edson Júnior do Carmo², Spartaco Astolfi-Filho^{3,*}

Submetido 19/06/2017 – Aceito 27/07/2017 – Publicado on-line 30/07/2017

Resumo

A manipulação genética de micro-organismos permite a produção de enzimas com alto valor biotecnológico com aplicação em vários processos industriais. A enzima α -amilase de *Bacillus licheniformis* é amplamente utilizada nas indústrias de álcool, açúcar, cerveja e panificação para a hidrólise do amido inicial, clivando as ligações glicosídicas α -(1,4). Deste modo, sistemas de expressão de proteínas heterólogas tem sido utilizado com sucesso, sendo um exemplo o sistema da levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. O objetivo deste trabalho foi clonar e expressar o gene que codifica a α -amilase de *B. licheniformis* DSM13 na levedura metilotrófica *P. pastoris* e após analisar a proteína recombinante secretada. Desta forma, o gene foi inserido no genoma da levedura utilizando o vetor pPIC9 e a enzima foi então produzida e secretada. A atividade enzimática máxima foi observada no sobrenadante do clone B8 (345,4 U/mL). Houve variação quanto ao peso molecular da enzima entre os clones analisados por gel SDS-PAGE. A enzima apresentou temperatura ótima de atividade de 70 °C, considerável estabilidade na presença de cálcio, pH ótimo de 7,0 e também se manteve estável por um período de dois meses quando incubada a 4 °C. Os valores de Km e Vmáx aparentes calculado para o extrato bruto do clone A7 foram de 10,74 mg/mL e 416,66 U/mL respectivamente.

Palavras-Chave: Expressão heteróloga; enzima recombinante; caracterização enzimática; etanol.

Expression and characterization of α -amylase from *Bacillus licheniformis* DSM13 in yeast *Pichia pastoris*. Genetic manipulation of microorganisms allows the production of enzymes with high biotechnological value with application in various industrial processes. The enzyme α -amylase from *Bacillus licheniformis* is widely used in industries to produce alcohol, sugar and beer, and its activity involves hydrolysis of starch cleaving the glycosidic bonds α -(1,4). Thus, heterologous protein expression systems have been used successfully, one example being the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The purpose of this study was to clone and to express the gene encoding α -amylase from *B. licheniformis* DSM13 in the methylotrophic yeast *P. pastoris* and also to analyze the recombinant protein secreted. In this way, the gene was inserted into the yeast genome using the pPIC9 vector and the enzyme was then produced and secreted. The maximum enzyme activity was observed in the supernatant of the clone B8 (345,4 U/mL). Variations in molecular weight of the enzymes among the clones were detected by SDS-PAGE gel analysis. The enzyme showed optimum activity at 70 °C, pH optimum of 7.0 and its activity remained stable for a period of two months when maintained at 4 °C. The Km and Vmáx apparent values calculated for the crude extract clone A7 were 10.74 mg/mL and 416.66 U/mL, respectively.

Keywords: Heterologous expression; recombinant enzyme; enzyme characterization; ethanol.

¹ Biólogo, Doutor em Biotecnologia, Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Departamento Centro de Apoio Multidisciplinar - Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Coroado II, Manaus, Amazonas, Brasil, correspondência: hastolpho@gmail.com

² Professor Adjunto, Departamento de Ciências Fisiológicas/ICB, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil. E-mail: edsonjuniorbio@yahoo.com.br

³ Professor Titular de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Diretor do Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil. E-mail: spartaco.biotec@gmail.com



1. Introdução

Amilases são enzimas responsáveis pela degradação da molécula de amido e estão amplamente distribuídas na natureza. Elas apresentam grande importância industrial, correspondendo a aproximadamente 25% da produção de enzimas do mundo (YAN e WU, 2017; LI et al., 2012). A hidrólise do amido gera diversos produtos incluindo dextrinas e polímeros menores compostos por unidades de glicose. Três domínios distintos caracterizam a estrutura geral dessas enzimas, que são divididas em grupos de acordo com suas respectivas atividades catalíticas (LI et al., 2016; ASGHARI et al., 2004). As α -amilases clivam as ligações glicosídicas α -(1,4) presentes nas cadeias de amilose ou amilopectina da molécula de amido. Estas apresentam vasta aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, têxtil, panificação, bem como em processos envolvidos na liquefação do amido para a produção de xaropes de frutose e na produção de etanol combustível (MAGALHÃES e SOUZA, 2010; ZHU et al., 2017). Ao longo das últimas décadas, pesquisas têm sido desenvolvidas com α -amilases produzidas por uma grande variedade de microrganismos (fungos, leveduras, bactérias e actinomicetos). A principal vantagem é a capacidade de produção econômica em massa e a fácil manipulação para obtenção de enzimas com características desejáveis (PANDEY et al., 2000; SINDHU et al., 2017).

A α -amilase da bactéria *Bacillus licheniformis* é amplamente utilizada nas indústrias de álcool, açúcar e cerveja para a hidrólise do amido. Sua estrutura possui três domínios: o domínio A é formado por uma típica estrutura em barril (β/α)₈; o domínio B se estabelece como uma protrusão a partir do domínio A; e o domínio C-terminal possui o sítio ativo da enzima e conservados sítios de ligação para o cálcio (NAZMI et al., 2006).

Devido muitos microrganismos secretar quantidades limitadas de enzimas ou outras proteínas e peptídeos, a expressão heteróloga em outras células hospedeiras tem sido empregada para potencializar a obtenção desses produtos de interesse biotecnológico. Neste sentido, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é um modelo de sucesso para a

expressão de produtos heterólogos. A produção de proteínas heterólogas em altos níveis, as modificações pós-traducionais como glicosilação, formação de pontes de dissulfeto, o processamento proteolítico e a viabilidade do sistema de expressão como *Kit* comercialmente disponível, contribuíram para o sucesso dessa levedura como sistema de expressão (CEREGHINO e CREGG, 2000; HUANG et al., 2017). Neste estudo, expressamos o gene que codifica a enzima α -amilase de *B. licheniformis* (linhagem DSM13) em *P. pastoris* e analisamos o produto recombinante secretado.

2. Material e Métodos

2.1 Linhagens de micro-organismos e vetores moleculares utilizados

Microorganismos: *Escherichia coli* DH10B™ (Invitrogen) genótipo: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU* *galK* λ - *rpsL* *nupG*. *Escherichia coli* TOP10™ (Invitrogen) genótipo: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*. *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen®) genótipo: *his4*. Vetores moleculares: pPIC9 (Invitrogen™); pCR®2.1-TOPO (Invitrogen™).

2.2 Estratégias de clonagem e subclonagem

O DNA genômico de *B. licheniformis* (DSM13) foi cedido pelo Instituto de Genética da Universidade de Bayreuth-Alemanha. O gene correspondente a α -amilase foi amplificado por PCR utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores *Ramy* e *Famy* (*Ramy*: 5'CGGCGGCCCGCCTATCTTTGAAC ATAAATTGAAAC3'/*Famy*:5'CGGAATTCA ATCTTAAAGGGACGCTGATG 3'). Nas extremidades 5' destes, foram inseridos as sequências correspondentes às enzimas de restrição *NotI* e *EcoRI* (New England Biolabs), respectivamente. A termociclagem consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C, por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C, por 35 segundos, 60°C, por 40 segundos e 58°C, por 1,5 minutos. A extensão final foi de 58°C, por 5 minutos. O produto da PCR (amplicon) foi



clonado no vetor pCR®2.1-TOPO® e inserido por transformação química nas células TOP10™ (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante. A construção do vetor de clonagem TOPO-*amy* foi confirmada por PCR, utilizando-se DNA plasmidial extraído.

Para a expressão da enzima α -amilase na levedura *Pichia pastoris*, foi utilizado o vetor pPIC9 (Invitrogen™). 100 ng de DNA dos vetores TOPO-*amy* e pPIC9 foram digeridos com 1U/ μ g das enzimas *EcoRI* e *NotI*. Após a digestão, o inserto liberado e o vetor de expressão linearizado foram purificados em gel de agarose (Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification - GE Healthcare). A reação de ligação ocorreu em volume reacional final de 15 μ L, contendo 260 ng/ μ L de Inserto, 500 ng/ μ L do vetor, T4 DNA ligase 400 U/ μ g (New England Biolabs) e 1,5 μ L de tampão 10X. O vetor de expressão construído (pPIC-*amy*) foi precipitado com acetato de amônia 7,5M 1/10 v/v e etanol absoluto gelado 2,5 v/v sendo, em seguida, inserido em células DH10B™ (Invitrogen), por transformação eletrocompetente. A construção do plasmídeo recombinante foi confirmada por análise de restrição.

2.3 Seleção dos clones recombinantes

A recombinação homóloga para integração do cassete de expressão no genoma da hospedeira pode ocorrer no *locus his4* ou no *locus AOX1* por eventos de *crossing over* entre regiões do vetor e genoma. Para que esse processo ocorra é necessário a linearização do plasmídeo recombinante. Deste modo, o plasmídeo pPIC-*amy* foi linearizado utilizando a endonuclease de restrição *BglII* (New England Biolabs). O plasmídeo, precipitado com acetato de amônia 7,5M 1/10 v/v e etanol 100% gelado 2,5 v/v, foi inserido nas leveduras GS115 por eletroporação (1500 V). As células transformadas foram semeadas no meio de cultivo MD e incubadas a 30°C durante três dias. Os clones recombinantes foram selecionados no meio mínimo MD por meio de seleção auxotrófica anti-histidina.

2.4 Seleção dos clones produtores de α -amilase

A primeira etapa de seleção consistiu na transferência de 96 clones recombinantes do meio de cultivo MD para o meio de cultivo BMG-Y. Esses clones foram incubados por dois dias a 30 °C para o aumento do crescimento celular. Após essa etapa os clones foram transferidos para o meio de cultivo indutor BMM-Y. Estes foram incubados por mais três dias na mesma temperatura. Para induzir a expressão da enzima, foi adicionado metanol (concentração de 0,5%) nas tampas das placas por três dias a cada 24 horas. A última etapa consistiu na seleção dos clones produtores por meio da coloração de vapor de iodo. Esta coloração permite visualizar halos translúcidos ao redor das colônias que tiveram a α -amilase expressa. Após a seleção, foi calculado o índice de amilólise (Ia). Este índice é o resultado da relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia e foi calculado pela fórmula: $Ia = (dh^2/dc^2)$ (dh = diâmetro do halo e dc = diâmetro da colônia).

2.5 Produção de α -amilase em meio líquido

Nove clones recombinantes foram selecionados para a produção da enzima α -amilase em meio líquido. Estes clones foram transferidos para o meio BMG-Y (30 mL) e incubados a 30 °C sob agitação (200 rpm/min) até atingir uma transmitância de $\lambda 600$ de 0,6 medido em espectrofotômetro. Em seguida, os meios foram centrifugados por 15 minutos a 4 °C (4000 rpm). O *pellet* de cada cultura foi ressuscitado em 150 mL do meio indutor BMM-Y em frascos de 1L. A indução da expressão enzimática teve o início com a adição de metanol 0,5% v/v. O tempo de produção da enzima teve duração de 120 horas sendo adicionado metanol a cada 24 horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em triplicata nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 120 horas e armazenadas em microtubos de 1,5 mL. Todas as alíquotas retiradas foram centrifugadas a 12000 rpm a 4 °C e os sobrenadantes foram recuperados e estocados a -20 °C. Estas alíquotas foram utilizadas para a realização dos ensaios enzimáticos, análise da expressão proteica e para a construção da curva de crescimento dos clones induzidos. O

crescimento celular obtido foi convertido para g/L utilizando a fórmula $(g/L)=0,22 \times D.O.$ 600 nm (Nakano et al., 2006).

A análise da proteína recombinante secretada pela levedura foi feita por meio de eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) conforme descrito por Sambrook et al., (1989) e as amostras foram coradas com a solução de Azul Brillante de *Coomassie* G250.

2.6 Determinação da atividade enzimática

A quantificação das dextrinas liberadas pela enzima α -amilase foi determinada de acordo como descrito por Fuwa (1954). Os nove clones tiveram sua atividade enzimática dosada. Para o cálculo dos valores da atividade enzimática, construiu-se a curva padrão de amido. A leitura das absorvâncias das diferentes concentrações de amido (0,025 a 1%) gerou uma equação da reta ($R = 0,993$), utilizada para fazer os cálculos da atividade enzimática. Uma unidade de atividade dextrinizante foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto.

2.7 Ensaios enzimáticos

Os ensaios enzimáticos para determinar o pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade térmica e estabilidade em relação ao tempo de estocagem da enzima, também foram realizados de acordo com o método de Fuwa (1954). Todos os ensaios foram realizados com os extratos enzimáticos dos clones A5, B8 e D14. Para determinar o pH ótimo da enzima, foi preparada uma solução de glicina 50 mM; ácido acético 50 mM e fosfato de sódio dibásico 50 mM que permitiu variar o pH entre as faixas de 2,0 a 12,0. Para definir a temperatura ótima, os extratos enzimáticos foram analisados em diferentes temperaturas (40 a 100 °C). Para avaliar a estabilidade térmica da enzima em relação à temperatura, o extrato do clone B8 foi pré-incubado por 60 minutos nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C no pH ótimo pré-estabelecido. A cada 15 minutos foram coletados uma alíquota para proceder à dosagem da atividade enzimática. Foram acrescentados na reação $CaCl_2$ (5 mM), conforme descrito por Hmidet et al., 2008. A estabilidade

da enzima em relação ao tempo de estocagem também foi medida. A enzima foi estocada por um período de 60 dias a 4 °C e sua atividade enzimática foi avaliada a cada 10 dias durante este período. Os parâmetros cinéticos aparentes do extrato enzimático foram determinados nas condições pré-estabelecidas de pH e temperatura ótima. Para avaliar esses parâmetros, o extrato foi incubado em diferentes concentrações de amido (5 a 90 mg/mL). Os dados obtidos foram utilizados para construir um gráfico com os valores reais de K_m e $V_{máx}$ da enzima.

3. Resultados

3.1 Construção dos vetores de clonagem e expressão

O *amplicon* do gene α -amilase gerado após a PCR foi de aproximadamente 1500 pares de bases. Após a amplificação, foi realizado a ligação do gene no vetor de clonagem pCR®2.1-TOPO® (3,9 kb). O vetor construído (TOPO-*amy*) foi digerido com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* e o fragmento liberado foi purificado do gel de agarose (Figura 1).

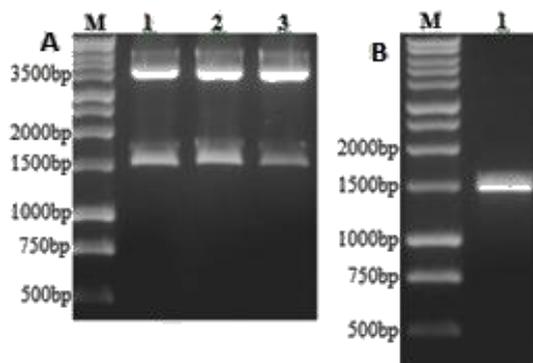


Figura 1 - Figura-A: perfil dos plasmídeos recombinantes TOPO-*amy* após restrição com *EcoRI* e *NotI*. Figura-B: Perfil do gene α -amilase purificado. M – marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas).

Na Figura 2 visualizamos a construção do vetor de expressão pPIC-*amy*. A ligação do fragmento gênico foi realizada após a sequência promotora do gene AOX1. A subclonagem foi confirmada por análise de restrição

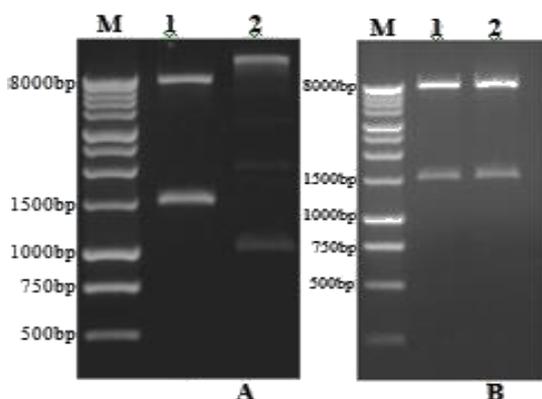


Figure 2 - Figura-A: ligação do gene ao vetor de expressão. Coluna 1 - sistema sem enzima ligase. Coluna 2 - Sistema contendo a enzima T4 DNA ligase. Figura-B: Análise de restrição do vetor de expressão pPIC-amy (coluna 1 e 2). M - Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas).

3.2 Expressão de α -amilase em meio sólido

Após a transformação das leveduras *P. pastoris* (GS115), noventa e seis transformantes foram previamente selecionados. 80,2 % dos clones foram considerados produtores. Os 96 clones foram divididos em quatro placas e após o período de indução com metanol, foi feita a análise da expressão proteica. Na figura 3, observamos uma placa de Petri contendo clones considerados produtores de α -amilase recombinante, clones não produtores e o controle positivo de expressão de α -amilase de *Bacillus subtilis*.

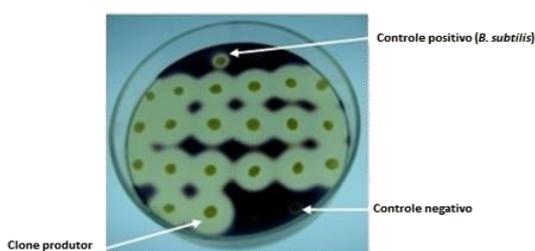


Figura 3 - Revelação com vapor de iodo dos clones produtores da enzima recombinante. Visualização dos halos formados após indução das leveduras *P. pastoris*.

Foram escolhidos nove clones que apresentaram os maiores índices de amilólise para a expressão da enzima recombinante em meio líquido. Os índices de amilólise dos nove

clones selecionados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Índice de amilólise dos nove clones utilizados nos testes de cinética enzimática e produção da enzima em meio líquido

Clone	Índice de amilólise (dh ² /dc ²)
A5	10,75
A7	10,04
B8	12,67
B20	11,98
C13	10,79
C22	10,07
D10	10,36
D14	11,74
D17	11,81

Observamos que o maior índice apresentado foi correspondente ao clone B8, enquanto que o menor foi aferido do clone A7. Após o cálculo dos índices de amilólise, os nove clones selecionados foram então utilizados na indução da enzima recombinante em meio líquido.

3.3 Produção de α -amilase em meio líquido e cinética de indução

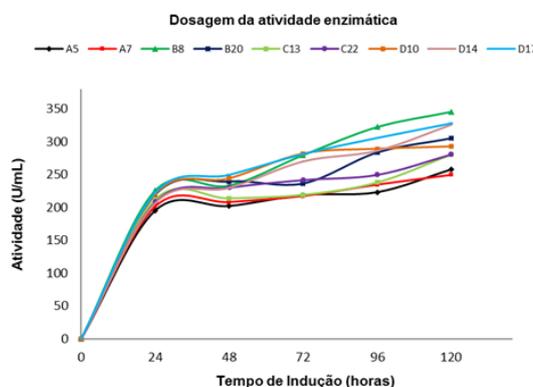


Figura 4 - Cinética de indução enzimática com os nove clones produtores da enzima recombinante.

Os dados obtidos após a indução da enzima podem ser observados na Figura 4. Observamos um aumento progressivo da atividade enzimática em relação ao tempo de indução dos nove clones. A α -amilase recombinante apresentou maior atividade enzimática ao final das 120 horas de indução, porém foi observada uma variação da atividade nos sobrenadantes dos clones testados. De acordo com os dados obtidos, o clone B8 foi o

que exibiu a maior atividade enzimática entre os sobrenadantes testados (345,4 U/mL), enquanto que o clone A7 obteve o menor valor de atividade enzimática (248,9 U/mL) (Figura 4).

3.4 Análise em gel SDS-PAGE da enzima recombinante secretada

Foi possível visualizar duas bandas correspondentes à enzima α -amilase (Figura 5-A). O perfil de bandas dos clones analisados no presente trabalho teve variações quanto ao peso molecular. Esta variação foi de 65 a 74

kDa aproximadamente. Os resultados da cinética de expressão com o clone B8 mostraram a máxima expressão de α -amilase recombinante no tempo de 120 horas de indução. Observamos também que o controle negativo da expressão (clone GS115) apresentou várias bandas correspondentes às proteínas endógenas da levedura *P. pastoris*. Essas bandas não são visualizadas nos clones recombinantes, que passam a ter sua maquinaria genética voltada para transcrição da proteína heteróloga (Figura 5-B).

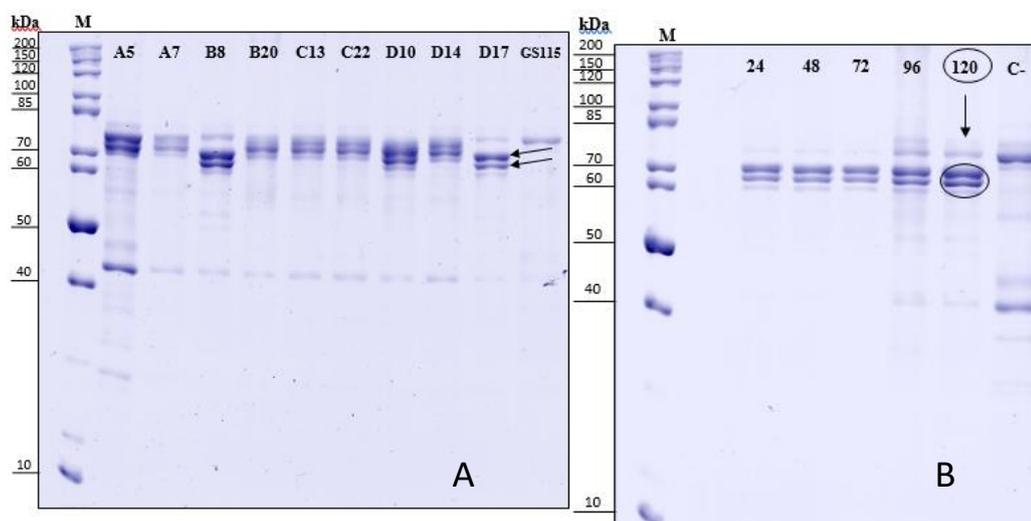


Figura 5 - A.: Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE da enzima recombinante secretada pelos nove clones. Clone GS115 controle negativo da expressão. Setas indicam as bandas correspondentes à enzima secretada. **B.:** Cinética de expressão do clone B8 nos diferentes tempos de indução (24, 48, 72, 96 e 120 horas). C-: Controle negativo da expressão. M – Marcador de massa molecular (10-200 kDa).

3.5 Caracterização enzimática

Os dados mostram que a enzima secretada apresentou melhor funcionalidade em pH neutro, mantendo alta atividade relativa na faixa que vai de 7,0 a 8,0, e tendo o máximo de atividade enzimática em pH 7,0 para os 3 clones analisados (Figura 6).

A temperatura ótima em que a enzima obtém a máxima atividade hidrolisante foi de 70 °C. No entanto podemos observar que na temperatura de 80 °C, a enzima reteve cerca de 80% de sua atividade relativa para os clones A5 e D14 e 89,74% para o clone B8. Na temperatura

de 90 °C sua atividade foi aferida em aproximadamente 75% para os clones B8 e D14 e 71,97% para o clone A5 (Figura 7-A).

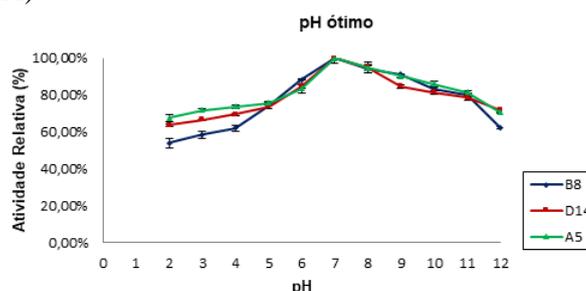


Figura 6 - Efeito do pH sobre a atividade de α -amilase produzida pelos clones A5, B8 e D14.

Os testes de termoestabilidade com o clone B8 demonstraram que na temperatura de 60 °C com a presença de 5 mM de CaCl₂, a enzima manteve 100% de sua atividade após uma hora de incubação. Na temperatura de 70 °C após os 60 minutos de incubação, notamos que sem a presença de cálcio a enzima reteve

47,4% de sua atividade, enquanto que na presença do íon, a enzima reteve 81,8% de sua atividade. Já na temperatura de 80 °C com a presença do íon, a enzima teve 42,6% de sua atividade relativa retida após o período de incubação (Figura 7-B)

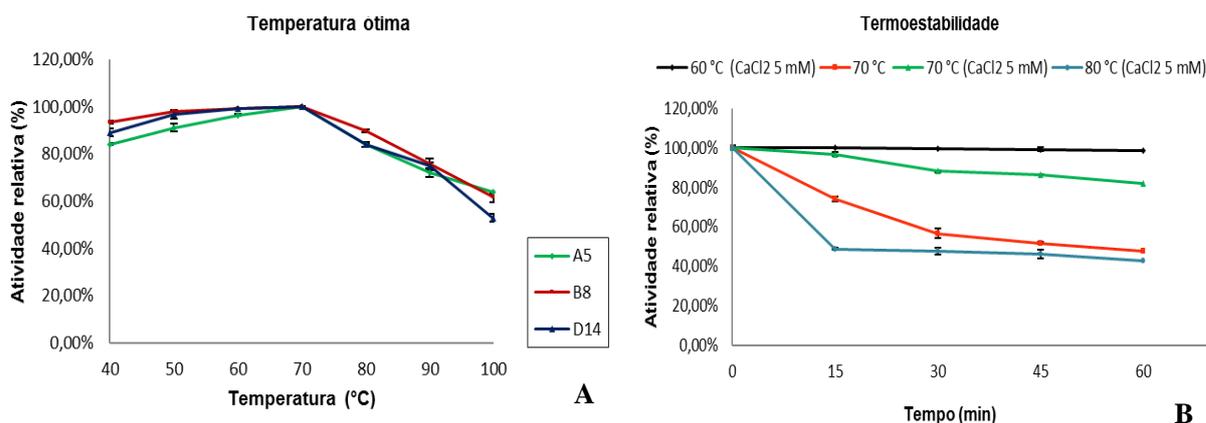


Figura 7 - A - Efeito da temperatura sob a atividade relativa da α -amilase. B - Termoestabilidade da enzima α -amilase incubada por 60 minutos nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C com presença ou ausência do íon cálcio.

A análise dos dados quanto a estabilidade da enzima na temperatura de 4 °C, demonstrou que após um período de 60 dias de estocagem, a enzima teve apenas 5% de perda da sua atividade catalítica. Essa perda se iniciou a partir dos 30 dias de armazenagem. A atividade relativa máxima medida no último dia de incubação foi de 95,83%.

3.6 Parâmetros cinéticos da enzima recombinante (K_m and V_{max})

Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram calculados a partir da construção de um gráfico do duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. Esse tipo de gráfico é resultado da relação dos valores inversos dos eixos velocidade inicial (V_0) e concentração do substrato $[S]$. A linha terá inclinação K_m/V_{max} na qual a intercepção será $1/V_{max}$ no eixo de $1/V_0$ e intercepção de $-1/K_m$ no eixo de $1/[S]$, permitindo determinar com mais precisão a V_{max} . O sobrenadante avaliado apresentou K_m aparente no valor de 10,74 mg/mL e V_{max} igual a 416,66 U/mL.

4. Discussão

O tamanho do *amplicon* gerado é consistente com o apresentado por Ivanova e colaboradores (1993), indicando que o gene da α -amilase foi totalmente amplificado.

A linearização do vetor de expressão permitiu a sua integração no genoma da levedura *Pichia pastoris*. O sítio de restrição escolhido referente à enzima *Bgl*II, permitiu uma estratégia de integração por adição ou substituição gênica por eventos de simples ou duplo *crossing-over* entre as regiões do vetor e do genoma. Isto pode resultar na obtenção de dois fenótipos diferentes da levedura *P. pastoris* (Mut+ ou MutS). Segundo Roohvand e colaboradores (2017), a levedura metilotrófica *P. pastoris* linhagem GS115 não apresenta em seu material genético vetores episomais. Com isso, para que ocorra a expressão de genes exógenos na levedura, é fundamental a integração do material genético no seu genoma. De acordo com Daly e Hearn (2005) a integração do cassete de expressão ocorre em *locus* específicos no genoma da



levedura o que gera transformantes geneticamente estáveis.

De acordo com Astolfi-Filho e colaboradores (1986), a α -amilase produzida tem a capacidade de clivar o amido que ao ser corado com vapor de iodo revela a formação de halos translúcidos ao redor das colônias em meio de cultivo sólido. As regiões circundantes dos clones que não produzem a enzima coram-se de roxo. A pequena diferença no tamanho dos halos apresentados na figura 3 pode estar relacionada com a variação do número de cópias do cassete de expressão contendo o gene da α -amilase integrado por adição no cromossomo da levedura, o que gera também diferenças nos índices de amilólise que foram apresentados na Tabela 1 (KATO et al., 2001).

Os resultados da atividade enzimática dextrinizante obtido com o clone B8 (345,4 U/mL) (Figura 4) são superiores aos demonstrados por autores que utilizaram outros micro-organismos para a expressão da enzima α -amilase, utilizando cultura em frascos com agitação. Zhang e colaboradores (2001) expressaram α -amilase em *Saccharomyces cerevisiae* utilizando o promotor *SUC2*. A atividade relativa máxima obtida em 35 horas de produção foi de 11,8 U/mL. Outros trabalhos também contextualizam a menor atividade obtida em relação ao presente estudo. Os autores Hmidet et al., (2008) clonaram, expressaram e purificaram a enzima α -amilase de *Bacillus licheniformis* na hospedaria *E.coli*, obtendo uma atividade máxima de 178,5 U/mg após sua purificação.

Em outros estudos também podemos observar à análise das atividades relativas e específicas da enzima recombinante. A atividade da α -amilase de *Pyrococcus furiosus* expressa em *E.coli* teve sua atividade específica relatada a 3,9 U mg⁻¹ a 98 °C (DONG et al., 1997). Shiina e colaboradores (2007) relataram a expressão da α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* em *E.coli* transformada com o vetor pHI301A. Segundo

esses autores a maior atividade enzimática obtida foi de 8,2 U/mL em 13 horas de indução. Os autores Shahhoseini e Ghaemi (2003) analisaram a atividade da α -amilase de *Bacillus licheniformis* transformando *E. coli* BL21 com o vetor de expressão pMSH320. Após 15 horas de indução foi descrito uma atividade específica de 2,35 μ mol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína no sobrenadante e 4,31 μ mol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína na fração intracelular.

A variação no perfil da atividade enzimática obtida nos sobrenadantes dos nove clones do presente estudo pode ser explicada por diversos fatores que estão relacionados com a produção de proteínas pelo sistema de expressão heterólogo, assim como pela simples composição do meio de cultivo, fisiologia e viabilidade genética das células. Dentre estes também podemos citar a sequencia sinal que é responsável pela secreção do produto expresso (PAIFER et al., 1994).

O peso molecular da enzima recombinante de *B. licheniformis* observado no presente estudo difere de trabalhos reportados com a mesma enzima. Kim e colaboradores (1992) isolaram e clonaram o gene correspondente a mesma enzima no vetor pBR322 e expressaram em *E. coli*, eles reportaram que o peso molecular da α -amilase foi de 64 kDa. Hmidet e colaboradores (2008), também expressaram o gene que codifica para enzima α -amilase de *B. licheniformis* linhagem NH1 na hospedeira *E.coli* BL21. Eles reportaram um peso molecular de 58 kDa da enzima purificada. No presente estudo, a diferença observada nos pesos moleculares das bandas dos clones analisados (65 a 74 kDa) pode ser explicada pela glicosilação efetuada pela levedura durante o amadurecimento proteico (Figura 5-A). A glicosilação é a modificação pós-traducional mais comum que precede a secreção de proteínas e ocorre no lúmen do retículo endoplasmático. A levedura *P. pastoris* é capaz de realizar ambos os tipos de glicosilação (O- e N-Linked) (DALY e HEARN, 2004; ROOHVAND et al., 2017).



A variação de pH ótimo para a atividade relativa da enzima α -amilase de *B. licheniformis* tem sido citado na literatura. Morgan e Priest (1981) caracterizaram uma α -amilase termoestável da cepa de *B. Licheniformis* NCIB 6346 e verificaram que a sua atividade era estável entre o pH 7,0 e 10,0, tendo seu pH ótimo em 7,0. Hmidet e colaboradores (2008) relataram que a α -amilase do mesmo microrganismo expressa em *E. Coli* teve seu pH ótimo aferido em 6,5. Outros estudos realizados com a caracterização da α -amilase de duas linhagens de *B. Licheniformis*, sendo uma mutante e outra selvagem, revelaram um pH ótimo para a atividade enzimática igual a 6,0 (LEE et al., 2006). No presente estudo, a enzima também mostrou-se ativa em pHs alcalinos nos três clones analisados, retendo cerca de mais de 80% de sua atividade nos pHs 9,0 e 10,0 (Figura 6). Em algumas indústrias, como por exemplo, a de detergentes, α -amilases com atividade em pHs alcalinos são muito utilizadas (GUPTA, 2003).

Alguns trabalhos relatados na literatura mostram diferentes temperaturas em que a enzima α -amilase de *B. licheniformis* age no substrato, sendo que algumas destas são caracterizadas como termoresistentes. Tomazic e Klibanov (1988) demonstram que uma α -amilase caracterizada teve sua temperatura ótima em 90 °C. Hmidet e colaboradores (2008) relataram a temperatura ótima de 90 °C para enzima. Morgan e Priest (1981) relataram que a enzima da cepa NCIB 6346 obteve a máxima atividade na temperatura de 70 °C, assim como a temperatura descrita no presente trabalho como é mostrado na (Figura 7-A).

São reportados também trabalhos relacionados com a termoestabilidade da enzima α -amilase. Ivanova e colaboradores (1993) incubaram a enzima na presença de 1,0 mM e 5,0 mM do íon Ca^{2+} . Segundo os autores, os dados para a atividade residual após a incubação da enzima a 85 °C em tampões contendo diferentes concentrações de CaCl_2 ,

mostraram que o cálcio é um estabilizador da enzima. Como se observa nos resultados do presente trabalho (Figura 7-B), a variação da atividade relativa em diferentes temperaturas ou a estabilidade térmica da enzima recombinante também está relacionada com a presença do íon Ca^{2+} .

O valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) é muito importante na caracterização da cinética enzimática indicando a quantidade necessária de substrato para saturar a enzima. Müller (2008) caracterizando alfa-amilase de *Bacillus subtilis* produzida em *P. pastoris* observou diferentes valores de K_m para enzima quando presente no sobrenadante. Para o extrato bruto do clone S2 os valores de K_m foi de 10,2 mg/mL e a velocidade máxima foi de 526,3 U/mL. Ivanova e colaboradores (2003) analisaram um K_m de 0,9 mg/mL e um $V_{m\acute{a}x}$ de 62,5 U/mL para a enzima alfa-amilase de *B. licheniformis*.

5. Conclusões

Os experimentos demonstraram que o fragmento codificante da α -amilase de *B. licheniformis* foi isolado e clonado eficientemente nos vetores de clonagem e expressão e os clones recombinantes de *P. pastoris* foram capazes de expressar e secretar a enzima α -amilase ativa, sendo que sua maior produção foi observada após 120 horas de indução com a maior atividade da proteína em pH neutro. A enzima recombinante apresentou considerável estabilidade em sua temperatura ótima e aumentou sua estabilidade na presença do íon cálcio. A enzima também se manteve estável por dois meses quando armazenada a 4 °C.

Os resultados obtidos com a cinética enzimática neste estudo indicam que o sobrenadante do extrato bruto se apresenta como uma boa alternativa para utilização na hidrólise do amido, reduzindo os custos de produção e possibilitando a flexibilidade nas condições de uso para determinados processos



industriais. Além disto, estudos como este proporcionam avanços nas pesquisas nacionais de caráter biotecnológico.

Agradecimentos

A Petrobrás pelo financiamento deste trabalho, ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo apoio institucional e ao Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas por toda estrutura física e suporte técnico laboratorial.

Divulgação

Este artigo é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

ASGHARI, M.S., KHAJEH, K., MORADIAN, F., RANJBAR, B., NADERI-MANESH, H. Acid-induced conformational changes in *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase: appearance of a molten globule like state. **Enzyme and microbial Technology**, v. 35, p. 51-57, 2004.

doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.006

ASTOLFI-FILHO, S., GALEMBECK, E.V., FARIA, J.B., SCHEMBERG, A.C.F. Stable yeast transformants that secrete functional α -amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. **Nature Biotechnology**, v.4, p.311-315, 1986. [doi:10.1038/nbt0486-311](https://doi.org/10.1038/nbt0486-311)

CEREGHINO, G.P.L., CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p. 45-66, 2000. doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x

CREGG, J.M., VEDVICK, T.S., RASCHKE, W.C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Bio/Technology**, v.11, p. 905-910, 1993. [doi:10.1038/nbt0893-905](https://doi.org/10.1038/nbt0893-905)

DALY, R., HEARN, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v.18, p. 119-138, 2005. [doi: 10.1002/jmr.687](https://doi.org/10.1002/jmr.687)

DONG, G., VIEILLE, C., SAVCHENKA, A., ZEIKUS, G.J. Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Encoding Extracellular α -Amylase from *Pyrococcus furiosus* and Biochemical Characterization of the Recombinant Enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p. 3569-3576, 1997.

FUWA, H.A. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v.41, p. 583-603, 1954.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K., CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1599-1616, 2003.

HMIDET, N., BAYOUDH, A., BERRIN, G.J., KANOUN, S., et al. Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v.43, p. 499-510, 2008. [doi:10.1016/j.procbio.2008.01.017](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.017)

HUANG, M., GAO, Y., ZHOU, X., ZHANG, Y., CAI, M. Regulating unfolded protein response activator HAC1p for production of thermostable raw-starch hydrolyzing α -amylase in *Pichia pastoris*. **Bioprocess Biosyst Eng**, v.40, n.3, p.341-350, 2017. [doi: 10.1007/s00449-016-1701-y](https://doi.org/10.1007/s00449-016-1701-y)

VANOVA, N.V., DOBREVA, E.P., EMANUILOVA, E.I. Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 277-289, 1993. [doi:10.1016/0168-1656\(93\)90176-N](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90176-N)

KATO, S., ISHIBASHI, M., TATSUDA, D., et al. Efficient expression, purification and characterization of mouse salivary α -amylase secreted from methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Yeast**, v.18, p. 643-655, 2001. [doi:10.1002/yea.714](https://doi.org/10.1002/yea.714)



- KIM, I.C., CHA, J.H., KIM, J.R., et al. Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. **J. Biol. Chem.**, v.267, p. 22108–22114, 1992.
- LEE, S., ONEDA, H., MINODA, M., et al. Comparison of Starch Hydrolysis Activity and Thermal Stability of Two *Bacillus licheniformis* α -Amylases and Insights into Engineering α -Amylase Variants Active under Acidic Conditions. **J. Biochem.** v.139, p. 997–1005, 2006. [doi: 10.1093/jb/mvj113](https://doi.org/10.1093/jb/mvj113)
- LI, S., YANG, X., YANG, S., et al. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2:e201209017., 2012. [doi:10.5936/csbj.201209017](https://doi.org/10.5936/csbj.201209017)
- LI, Z., DUAN, X., WU, J. Improving the thermostability and enhancing the Ca(2+) binding of the maltohexaose-forming α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. **J. Biotechnol.**, v. 20, n.222, p. 65-72, 2016. [doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.013](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.013)
- MAGALHÃES, O.P., SOUZA, M.P. Application of Microbial Amylase in Industry – A Review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p. 850-861, 2010. doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004
- MORGAN, F.J., PRIEST, F.G. Characterization of a Thermostable α -Amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. **Journal of Applied Microbiology**, v.50, p. 107–114, 1981. [doi: 10.1111/j.1365-2672.1981.tb00875.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1981.tb00875.x)
- MULLER, G. Clonagem e Expressão do gene da α -amilase de *Bacillus subtilis* variedade D2 na levedura *Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Amazonas**, Manaus, Amazonas. 2008, 110pp.
- NAKANO, A., LEE, C.Y., YOSHIDA, A., MATSUMOTO, T., et al. Effects of methanol feeding methods on chimeric alpha-amylase expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 227-231, 2006. [doi:10.1263/jbb.101.227](https://doi.org/10.1263/jbb.101.227)
- NAZMI, A.R., REINISCH, T., HINZ, J.H. Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α -amylase (BLA). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.453, p. 18–25, 2006. doi.org/10.1016/j.abb.2006.04.004
- PAIFER, E., MARGOLLES, E., CREMATA, J., et al. Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. **Yeast**, v.10, p. 1415–1419, 1994. [doi:10.1002/yea.320101104](https://doi.org/10.1002/yea.320101104)
- PANDEY, A., NIGAMI, P., SOCCOL, C.R.A., et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.31, p. 135–152, 2000. doi.org/10.1042/BA19990073
- ROOHVAND, F., SHOKRI, M., ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH, M., EHSANI, P. Biomedical applications of yeast- a patent view, part one: yeasts as workhorses for the production of therapeutics and vaccines. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.27, n.8, p. 929-951, 2017. [doi: 10.1080/13543776.2017.1339789](https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1339789)
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, 1659pp.
- SHAHHOSEINI, M., ZIAEE, A., GHAEMI, N. Expression and secretion of an α -amylase gene from a native strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 promoter and putative signal peptide of the gene. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p. 1250–1254, 2003. [doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02082.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02082.x)
- SHIINA, S., OHSHIMA, T., SATO, M. Extracellular production of α -amylase during fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* using pulsed electric field. **Journal of Electrostatics**, v.65, p. 30–36, 2007. [doi: 10.1016/j.elstat.2005.03.093](https://doi.org/10.1016/j.elstat.2005.03.093)
- SINDHU, R., BINOD, P., MADHAVAN, A., BEEVI, U.S., MATHEW, A.K., ABRAHAM, A., PANDEY, A., KUMAR, V. Molecular improvements in microbial α -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. **Bioresource Technology**, v.17, p.1-40, 2017. [doi:10.1016/j.biortech.2017.04.098](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.098)
- TOMAZIC, J.S., KLIBANOV, M.A. Why Is One *Bacillus* α -Amylase More Resistant against Irreversible Thermoinactivation Than Another? **The journal of Biological Chemistry**, v.7, n.263, p. 3092-3096, 1988.
- YAN, S., WU, G. Bottleneck in secretion of α -amylase in *Bacillus subtilis*. **Microbial Cell**



Factories, v. 16, p. 124-132, 2017. [doi: 10.1186/s12934-017-0738-1](https://doi.org/10.1186/s12934-017-0738-1)

ZHANG, X., ZHAOJIE, X., ZHAO, B., CEN, P. Enhancement of production of cloned α -amylase by lactic acid feeding from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using a *SUC2* promoter. **Biotechnology Letters**,

v.23, p. 259–262, 2001. [doi:10.1023/A:1005641926474](https://doi.org/10.1023/A:1005641926474)

ZHU, H., REYNOLDS, L.B., MENASSA, R. A hyper-thermostable α -amylase from *Pyrococcus furiosus* accumulates in *Nicotiana tabacum* as functional aggregates. **BMC Biotechnol.**, v.17, n.53, p. 1-11, 2017. doi.org/10.1186/s12896-017-0372-3