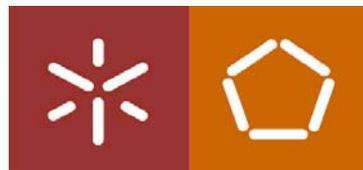


**CARLA CRISTINA MARQUES DE OLIVEIRA**

Produção de  $\beta$ -galactosidase por Levedura Recombinante –  
Desenvolvimento de um Sistema de Produção Estável

**Dissertação para obtenção do  
grau de mestre em Biotecnologia**



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia  
Departamento de Engenharia Biológica  
2005

# **Agradecimentos**

Em primeiro lugar desejo agradecer ao Professor José Teixeira por um dia me ter desafiado a colaborar em trabalhos de investigação no Departamento de Engenharia Biológica. Este desafio despertou em mim o interesse pela área de investigação e foi fundamental para a frequência do Mestrado em Biotecnologia, por isso mesmo agradeço a oportunidade e o voto de confiança.

De seguida desejo expressar o meu especial agradecimento à minha orientadora Doutora Lucília Domingues pela orientação e ensinamentos na área de Biologia Molecular. Agradeço toda a atenção que me tem dispensado, a disponibilidade em ensinar e a confiança que depositou em mim ao aceitar-me como sua orientanda.

Agradeço também ao Professor Nelson Lima pelas sugestões dadas em momentos importantes deste trabalho e a disponibilidade e simpatia com que sempre me recebeu.

A todos os colegas de laboratório por terem proporcionado um excelente ambiente de trabalho, pelas sugestões e companheirismo.

A todos os outros colegas do Departamento de Engenharia Biológica que me apoiaram ao longo deste trabalho, em especial à Nelma pela sua incansável ajuda e pela sua amizade.

Finalmente, ao Carlos e à minha família, em especial à minha Mãe, agradeço a compreensão demonstrada durante as longas horas extra que este trabalho me ocupou.

# Índice

<b>Índice de figuras</b> .....	<b>i</b>
<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>iv</b>
<b>Sumário</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Enquadramento e objectivo do trabalho .....	2
1.2 A importância biotecnológica da enzima $\beta$ -galactosidase .....	4
1.3 Produção de $\beta$ -galactosidase extracelular de <i>A. niger</i> em <i>S. cerevisiae</i> .....	7
1.4 Produção de proteínas heterólogas em <i>S. cerevisiae</i> - Sistemas de integração nas sequências $\delta$ .....	11
<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>19</b>
2.1 Esterilização de material, soluções e meios de cultura .....	20
2.2 Estirpes utilizadas .....	20
2.3 Vectores utilizados.....	20
2.4 Meios de cultura e condições de crescimento .....	21
2.4.1 Crescimento de bactérias .....	21
2.4.2 Crescimento de leveduras .....	22
2.5 Armazenamento de microrganismos.....	23
2.6 Transformação de <i>E. coli</i> .....	23
2.6.1 Preparação de células electrocompetentes .....	23
2.6.2 Electroporação .....	24
2.7 Isolamento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	25
2.8 Precipitação de DNA .....	26
2.9 Quantificação de DNA.....	26
2.9.1 Método espectrofotométrico .....	26
2.9.2 Método das placas de brometo de etídio .....	26
2.10 Armazenamento de DNA.....	27
2.11 Modificação enzimática de DNA.....	27
2.11.1 Hidrólise com enzimas de restrição.....	27
2.11.2 Transformação de extremidades coesivas em extremidades cegas .....	27
2.11.3 Desfosforilação de DNA plasmídico.....	27
2.11.4 Ligação vector-linker .....	28
2.11.5 Ligação vector-cassete de expressão .....	28
2.12 Electroforese de DNA.....	28
2.12.1 Padrões de DNA.....	29
2.12.2 Extracção de DNA do gel de agarose.....	29

2.13	Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
2.13.1	Preparação de células electrocompetentes.....	30
2.13.2	Electroporação.....	31
2.13.3	Seleção de transformantes.....	31
2.14	Isolamento de DNA genómico de levedura.....	32
2.15	Hibridação Southern.....	33
2.15.1	Construção de uma sonda de DNA.....	33
2.15.2	Transferência de DNA do gel de agarose para a membrana de nylon e fixação de DNA à membrana.....	33
2.15.3	Hibridação da sonda.....	34
2.15.4	Detecção imunológica.....	35
2.16	Estudo da estabilidade dos genes integrados.....	36
2.17	Ensaio de fermentação descontínua em balões Erlenmeyer.....	36
2.17.1	Quantificação de biomassa.....	36
2.17.2	Doseamento de açúcares redutores.....	37
<b>3.</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>38</b>
3.1	Construção dos vectores integrativos pCO1 e pCO2 para integração do gene que codifica para a $\beta$ -galactosidase de <i>A. niger</i> no genoma de <i>S. cerevisiae</i> .....	39
3.1.1	Estratégia de construção do vector integrativo pCO1.....	39
3.1.2	Estratégia de construção do vector integrativo pCO2.....	43
3.2	Construção de estirpes floculantes de <i>S. cerevisiae</i> produtoras de $\beta$ -galactosidase de <i>A. niger</i> .....	46
3.2.1	Transformação de <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt com o vector pCO1.....	46
3.2.2	Transformação de <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3 com o vector pCO2.....	57
3.2.3	Metabolismo da glucose e da lactose e expressão de $\beta$ -galactosidase, comparação com <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3/pVK1.1.....	65
<b>4.</b>	<b>Conclusões e perspectivas de trabalho futuro.....</b>	<b>70</b>
<b>5.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>74</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>.....</b>	<b>79</b>
Anexo A	– Sequências de genes e vectores.....	80
Anexo B	– Locais de restrição de genes e vectores.....	87
Anexo C	– Curvas de calibração.....	99

# Índice de figuras

Figura 1.1: Reacção de hidrólise da lactose pela $\beta$ -galactosidase.....	4
Figura 1.2: Esquema representativo do vector p $\delta$ -neo linearizado, construído por Wang <i>et al.</i> (1996), e exemplificação de integração de uma cópia do vector no DNA genómico.....	14
Figura 1.3: Esquema representativo do vector integrativo p $\delta$ -UB construído por Lee e Da Silva (1997b). .....	17
Figura 2.1: Mapas de restrição dos vectores integrativos p $\delta$ -neo e p $\delta$ -UB com indicação de alguns dos locais de restrição únicos. ....	21
Figura 3.1: Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das digestões efectuadas ao vector p $\delta$ -neo modificado. Legenda: $\lambda$ <i>HindIII</i> - padrão de pesos moleculares de DNA $\lambda$ digerido com <i>HindIII</i> ; 1- p $\delta$ -neo modificado sem digestão; 2- p $\delta$ -neo modificado digerido com <i>AccI</i> ; 3- p $\delta$ -neo modificado digerido com <i>BglII</i> ; 4- p $\delta$ -neo modificado digerido com <i>SacI</i> ; 5- p $\delta$ -neo modificado digerido com <i>SphI</i> . ....	40
Figura 3.2: Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) referente à extracção da cassette de expressão que contém o gene <i>lacA</i> do vector pVK1.1. Legenda: $\lambda$ <i>HindIII</i> - padrão de pesos moleculares de DNA $\lambda$ digerido com <i>HindIII</i> ; 1- pVK1.1 digerido com <i>SphI</i> . ....	41
Figura 3.3: Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das digestões efectuadas ao vector pCO1. Legenda: $\lambda$ <i>HindIII</i> - padrão de pesos moleculares de DNA $\lambda$ digerido com <i>HindIII</i> ; 1- pCO1 sem digestão; 2- pCO1 digerido com <i>BglII</i> ; 3- pCO1 digerido com <i>SphI</i> ; 4- pCO1 digerido com <i>HindIII</i> ; 5- pCO1 digerido com <i>SacII</i> . ....	42
Figura 3.4: Esquema representativo dos locais de restrição do vector pCO1 para as digestões efectuadas com as enzimas <i>BglII</i> , <i>SphI</i> , <i>HindIII</i> e <i>SacII</i> (elaborado a partir do Anexo B). ....	43
Figura 3.5: Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das digestões efectuadas ao vector pCO2. Legenda: $\lambda$ <i>HindIII</i> - padrão de pesos moleculares de DNA $\lambda$ digerido com <i>HindIII</i> ; 1- pCO2 sem digestão; 2- pCO2 digerido com <i>XhoI</i> ; 3- pCO2 digerido com <i>SphI</i> ; 4- pCO2 digerido com <i>SacII</i> ; 5- pCO2 digerido com <i>HindIII</i> . ....	44
Figura 3.6: Esquema representativo dos locais de restrição do vector pCO2 para as digestões efectuadas com as enzimas <i>XhoI</i> , <i>SphI</i> , <i>SacII</i> e <i>HindIII</i> (elaborado a partir do Anexo B). ....	45
Figura 3.7: Resposta fenotípica de dois dos clones que apresentaram maior actividade enzimática em ensaios padrão de $\beta$ -galactosidase: o clone número 38 seleccionado em placas YPD com 0,2 g/l de G418 e o clone número 7 seleccionado em placas YPD com 1,5 g/l de G418, comparação com a estirpe <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3/pVK1.1. À esquerda, crescimento em placas de meio YPD com X-gal e à direita crescimento em placas de meio mínimo com X-gal. ....	48
Figura 3.8: Fotografias após ensaios padrão de $\beta$ -galactosidase dos tubos de ensaio referentes aos clones número 38, seleccionado em placas YPD com 0,2 g/l de G418, e número 7, seleccionado em placas YPD com 1,5 g/l de G418. À esquerda, crescimento em meio YPD e comparação com <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt e à direita em meio SS lactose e comparação com <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3/pVK1.1. ....	49

Figura 3.9: Placa de meio YPD com 1,5 g/l de G418 e X-gal obtida após ensaio de estabilidade efectuado ao clone número 7 (seleccionado anteriormente em placas idênticas).....	50
Figura 3.10: Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) da digestão do vector pVK1.1 com a enzima <i>EcoRI</i> para construção da sonda <i>lacA</i> . Legenda: $\lambda$ <i>HindIII</i> - padrão de pesos moleculares de DNA $\lambda$ digerido com <i>HindIII</i> ; 1- pVK1.1 digerido com <i>EcoRI</i> . .....	51
Figura 3.11: Esquema representativo de possíveis padrões de integração do vector pCO1 no genoma da levedura. Legenda: A- Integração de uma única cópia; B- Integração de duas cópias seguidas.....	52
Figura 3.12: Membrana obtida por hibridação Southern. A hibridação foi efectuada com a sonda <i>lacA</i> e foram utilizados 5 $\mu$ g de DNA genómico digerido com <i>XbaI</i> de alguns dos clones obtidos por transformação da estirpe <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt com o vector integrativo pCO1. Legenda: A- clone 38; B- clone 19; C- clone 36; D- clone 9; E- clone 43; F- clone 52; G- clone 44; H- clone 61; I- clone 7; J- clone 10; L- clone 12; M- clone 5; N- clone 2; O- clone 6; P- clone 8; Q-clone 7; R- clone 1; S- clone 8; T- clone 9; U- clone 11; V- clone 7; X- clone 14.....	53
Figura 3.13: Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) da digestão do vector YIp5 com a enzima <i>AccI</i> para construção da sonda <i>URA3</i> . Legenda: $\lambda$ <i>HindIII</i> - padrão de pesos moleculares de DNA $\lambda$ digerido com <i>HindIII</i> ; 1- YIp5 digerido com <i>AccI</i> .....	54
Figura 3.14: Membrana obtida por hibridação Southern. A hibridação foi efectuada com a sonda <i>lacA</i> conjuntamente com a sonda <i>URA3</i> e foram utilizados 2,5 $\mu$ g de DNA genómico digerido com <i>XbaI</i> de alguns dos clones obtidos por transformação da estirpe <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt com o vector integrativo pCO1. Legenda: 1- padrão de pesos moleculares de DNA $\lambda$ digerido com <i>HindIII Dig Labeled</i> ; 2- DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt digerido com <i>XbaI</i> ; A- clone 38; B- clone 19; C- clone 36; D- clone 9; E- clone 43; F- clone 52; G- clone 44; H- clone 61; I- clone 7; J- clone 10; L- clone 12; M- clone 5; N- clone 2; O- clone 6; P- clone 8; Q-clone 7; R- clone 1; T- clone 9; V- clone 7; X- clone 14. ....	54
Figura 3.15: Membrana obtida por hibridação Southern referente aos ensaios de estabilidade. A hibridação foi efectuada com a sonda <i>lacA</i> e foram utilizados 1,5 $\mu$ g de DNA genómico digerido com <i>XbaI</i> . Legenda: 1- padrão de pesos moleculares de DNA $\lambda$ digerido com <i>HindIII Dig Labeled</i> ; 2- DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt digerido com <i>XbaI</i> ; V- clone 7 inicial; V <sup>1</sup> - clone 7 após 6 repicagens em YPD; V <sup>2</sup> , V <sup>3</sup> e V <sup>4</sup> - colónias do clone 7 após ensaios de estabilidade; A- clone 38 inicial; A <sup>1</sup> - clone 38 após 6 repicagens em YPD; A <sup>1</sup> , A <sup>2</sup> e A <sup>3</sup> - colónias do clone 38 após ensaios de estabilidade; F- clone 52 inicial; F <sup>1</sup> - clone 52 após 6 repicagens em YPD; R- clone 1 inicial; R <sup>1</sup> - clone 1 após 6 repicagens em YPD; T- clone 9 inicial; T <sup>1</sup> - clone 9 após 6 repicagens em YPD; E- clone 43 inicial; E <sup>1</sup> - clone 43 após 6 repicagens em YPD.....	56
Figura 3.16: Diagrama de fluxo de todos os passos envolvidos em cada ronda de transformação efectuada com o sistema baseado no vector p $\delta$ -UB. ....	58
Figura 3.17: Resposta fenotípica obtida em placas de meio mínimo com uracilo e X-gal de 3 clones provenientes da segunda ronda de transformações após terem passado por placas 5-FOA. ....	59
Figura 3.18: Fotografias após ensaios padrão de $\beta$ -galactosidase dos tubos de ensaio referentes ao clone número 7 da terceira ronda de transformações antes e após passagem por 5-FOA. Crescimento em meio SSlactose e comparação com <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3/pVK1.1. ....	61

Figura 3.19: Membrana obtida por hibridação Southern. A hibridação foi efectuada com a sonda <i>lacA</i> e foram utilizados 1,5 µg de DNA genómico digerido com a enzima <i>XbaI</i> de alguns dos clones obtidos por transformação da estirpe <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3 com o vector integrativo pCO2. Legenda: M- padrão de pesos moleculares de DNA λ digerido com <i>HindIII</i> Dig Labeled; 1- DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3 digerido com <i>XbaI</i> ; os números sobre a figura correspondem ao número de cada clone dentro da respectiva ronda de transformação; 1º R- primeira ronda de transformação; 2º R- segunda ronda de transformação; 3º R- terceira ronda de transformação.....	62
Figura 3.20: Relação entre o número de cópias do gene <i>lacA</i> integradas no genoma e a actividade de β-galactosidase em ensaios padrão.....	64
Figura 3.21: Perfis de crescimento obtidos em fermentações descontínuas em meio YPD com 10 g/l de glucose inicial para os clones número 38 e número 7 e para a estirpe <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt.	65
Figura 3.22: Perfis de consumo de açúcares redutores e produção de β-galactosidase obtidos em fermentações descontínuas em meio YPD com 10 g/l de glucose inicial. Legenda: A- <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3/pVK1.1; B- Clone número 38; C- Clone número 7.....	66
Figura 3.23: Fotografias após fermentações descontínuas das estirpes em estudo em meio YPD com 10 g/l de glucose inicial, comparação do nível de floculação.....	67
Figura 3.24: Perfis de consumo de açúcares redutores e produção de β-galactosidase obtidos em fermentações descontínuas em meio SSLactose com 50 g/l de lactose inicial. Legenda: A- <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3/pVK1.1; B- Clone número 38; C- Clone número 7.....	68
Figura 3.25: Fotografias após fermentações descontínuas das estirpes em estudo em meio SSLactose com 50 g/l de lactose inicial, comparação do nível de floculação. A fotografia de baixo tem um desfasamento de tempo de 10 segundos relativamente à de cima.....	69
Figura A1: Sequência do vector pδ-neo.....	81
Figura A2: Sequência do <i>linker</i> <i>BglII</i> .....	81
Figura A3: Sequência do <i>linker</i> <i>SphI</i> .....	81
Figura A4: Sequência do vector pδ-UB.....	84
Figura A5: Sequência do gene <i>lacA</i> (a vermelho encontra-se evidenciada a sonda <i>lacA</i> ).....	85
Figura A6: Sequência do promotor <i>ADH1</i> .....	85
Figura A7: Sequência do terminador <i>ADH1</i> .....	85
Figura A8: Sequência do gene <i>URA3</i> (a vermelho encontra-se evidenciada a sonda <i>URA3</i> ).....	86
Figura C1: Curva de calibração para a quantificação da biomassa.....	99
Figura C2: Curva de calibração para a quantificação da glucose.....	99
Figura C3: Curva de calibração para a quantificação da lactose.....	100
Figura C4: Curva de calibração para a quantificação da actividade de β-galactosidase.....	100

# Índice de tabelas

Tabela 1.1: Algumas das possíveis fontes de $\beta$ -galactosidase, respectivo pH e temperatura óptimos (modificado de Gekas e López-Leiva, 1985) .....	6
Tabela 1.2: Resumo das possíveis aplicações biotecnológicas da enzima $\beta$ -galactosidase .....	7
Tabela 1.3: Proteínas heterólogas integradas no genoma de <i>S. cerevisiae</i> usando sistemas de integração baseados no vector p $\delta$ -neo (Wang <i>et al.</i> 1996), respectivos autores e número máximo de cópias integradas .....	15
Tabela 2.1: Estirpes microbianas utilizadas ao longo deste trabalho .....	20
Tabela 2.2: Tamanhos dos fragmentos de DNA de $\lambda$ <i>HindIII</i> .....	29
Tabela 3.1: Valores médios máximos obtidos em ensaios padrão de $\beta$ -galactosidase (valores de actividade de $\beta$ -galactosidase $\pm$ intervalo com 95% de confiança), respectivos clones e placas de selecção, comparação com a estirpe <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3/pVK1.1 .....	48
Tabela 3.2: Número de cópias do gene <i>lacA</i> inseridas no genoma de alguns dos clones resultantes da transformação da estirpe <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt com o vector integrativo pCO1 .....	55
Tabela 3.3: Valores médios máximos obtidos em ensaios padrão de $\beta$ -galactosidase (valores de actividade de $\beta$ -galactosidase $\pm$ intervalo com 95% de confiança) para cada ronda de transformação efectuada e respectivos clones.....	60
Tabela 3.4: Taxas específicas de crescimento da estirpe <i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt e dos clones 38 e 7 em meio YPD (valores de taxa específica de crescimento $\pm$ intervalo com 95% de confiança).....	66
Tabela B1: Locais de restrição do vector p $\delta$ -neo .....	87
Tabela B2: Locais de restrição do vector p $\delta$ -UB .....	89
Tabela B3: Locais de restrição do gene <i>lacA</i> .....	91
Tabela B4: Locais de restrição do promotor <i>ADH1</i> .....	94
Tabela B5: Locais de restrição do terminador <i>ADH1</i> .....	95
Tabela B6: Locais de restrição do gene <i>URA</i> .....	96

## Sumário

A tecnologia do DNA recombinante é uma ferramenta muito utilizada na produção de proteínas em sistemas heterólogos, proteínas essas de elevado valor acrescentado que são, por natureza, produzidas em baixas quantidades.

Com este trabalho pretendeu-se construir estirpes floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentassem uma produção estável de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus niger* por integração do gene que codifica para a expressão desta enzima (*lacA*) nas sequências  $\delta$  do genoma desta levedura.

Foram utilizados dois sistemas de integração distintos. Um deles utiliza como marca de selecção dominante a resistência ao antibiótico G418 e permite a integração de cópias *tandem* enquanto que o outro sistema utiliza a marca *URA3* e a integração é efectuada em diferentes sítios, com uma única cópia em cada sítio. O gene *lacA*, ladeado pelo promotor e terminador *ADH1*, foi clonado em ambos os sistemas que foram seguidamente utilizados para transformar as estirpes *S. cerevisiae* NCYC869-wt (*MataFlo1*) e *S. cerevisiae* NCYC869-A3 (*MataFlo1ura3*), respectivamente. Para o primeiro sistema foram testadas concentrações de antibiótico de 0,2 a 1,5 g/l enquanto que para o segundo sistema foram efectuadas 3 rondas de transformação usando sempre a mesma marca de selecção uma vez que o gene *URA3* vai sendo eliminado por recombinação das sequências repetidas que o flanqueiam (*hisG*). Os transformantes foram seleccionados para estudos posteriores pela actividade de  $\beta$ -galactosidase devido à presença de X-gal nas placas selectivas, ou seja, foram seleccionados pela intensidade de cor azul.

Ambos os sistemas de transformação permitiram obter transformantes de *S. cerevisiae* utilizadores de lactose. Independentemente da marca de selecção utilizada, foram observados diferentes níveis de floclação e diferentes níveis de produção de  $\beta$ -galactosidase. Globalmente, os níveis de produção de  $\beta$ -galactosidase foram mais elevados para o primeiro sistema.

Os transformantes que susceptibilizaram maior interesse foram caracterizados geneticamente por hibridação Southern. Para o primeiro sistema, foram observados, no máximo, dois sítios de integração usados em simultâneo com cópias *tandem* e 8 cópias integradas no total, enquanto que para o segundo, após as 3 rondas de transformação e perda do gene *URA3*, observou-se apenas dois sítios de integração usados em simultâneo correspondentes a 2 cópias integradas.

O melhor transformante seleccionado, pertencente ao primeiro sistema (1,5 g/l de G418), apresenta actividade de  $\beta$ -galactosidase em glucose comparável ao sistema de referência, baseado em plasmídeo episomal (*S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1), e apresenta estabilidade das inserções após 8 culturas sequenciais com pelo menos 10 gerações cada. Apesar de crescer em lactose como única fonte de carbono e energia, a produção de  $\beta$ -galactosidase, o nível de floclação e a rapidez no consumo de lactose são inferiores à estirpe de referência.

# Abstract

Recombinant DNA technology is a widely used tool in the production of proteins in heterologous systems, namely for high value proteins that are, naturally, produced in low quantities.

This work aims to construct flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains with *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase stable production by using the repeated chromosomal  $\delta$  sequences of the yeast as target sites for the *lacA* gene (coding for *A. niger*  $\beta$ -galactosidase) integration.

Two different integration systems were used. One uses as dominant selection marker the G418 antibiotic resistance and allows for tandem integrations, while the other uses the *URA3* selection marker and integration occurs at different sites with one single copy of the gene at each site. The *lacA* gene, flanked by *ADH1* promoter and terminator, was cloned in both systems that were used in the transformation of *S. cerevisiae* NCYC869-wt (*MataFlo1*) and *S. cerevisiae* NCYC869-A3 (*MataFlo1ura3*) strains, respectively. In the first system different G418 concentrations were used ranging from 0.2 to 1.5 g/l while in the other system 3 rounds of transformation using the same selection marker were made, once the *URA3* gene is “pooped” out by recombination between flanking direct *hisG* repeats. In addition, transformants were selected for further studies based on the blue tonality of the colony. Due to the presence of X-gal in selective medium plates, a deeper blue colour of the colony indicated increased  $\beta$ -galactosidase activity.

Both integration systems resulted in recombinant *S. cerevisiae* strains that grow on lactose. Independently of the selection marker used, different flocculation and  $\beta$ -galactosidase expression levels were observed. Overall, transformants obtained from the first system presented higher  $\beta$ -galactosidase extracellular production.

The most interesting transformants were characterized genetically by Southern analyses. For the first system, one or two integration sites were observed, with *tandem* copies and 8 gene copies integrated in maximum, while for the second system, after 3 rounds of transformation and *URA3* gene loss, 2 different sites were used for integration, corresponding to 2 gene copies.

The best transformant obtained, belonging to the first system (selected with G418 1.5 g/l), has  $\beta$ -galactosidase activity in glucose comparable to the reference episomal based plasmid strain (*S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1) and reveals great integration stability after 8 sequential batch cultures with, at least, 10 generations each. Despite of growing on lactose as the only carbon and energy source,  $\beta$ -galactosidase expression level, flocculation level and lactose consumption time were lower than those obtained with the reference strain.

## **1. Introdução**

---

## 1.1 Enquadramento e objectivo do trabalho

Este trabalho tem como objectivo o desenvolvimento de um sistema de produção estável de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus niger* em *Saccharomyces cerevisiae* pela integração do gene que codifica para a expressão desta enzima nas sequências  $\delta$  do genoma desta levedura.

A enzima  $\beta$ -galactosidase apresenta diversas aplicações biotecnológicas mas a principal limitação da sua utilização prende-se com o seu elevado custo de produção e purificação. Uma das formas de diminuir o custo associado à produção desta enzima é a construção de estirpes floculantes de *S. cerevisiae* excretoras de  $\beta$ -galactosidase. Devido às vantagens associadas aos sistemas floculantes de elevada densidade celular e também ao facto da estirpe *S. cerevisiae* excretar naturalmente poucas proteínas, este sistema apresenta teoricamente grandes potencialidades. E ao utilizar lactose como substrato para sua produção, que se encontra disponível em grandes quantidades no efluente soro de queijo, os custos poderão ser ainda mais reduzidos. Para além disso, com a utilização do soro de queijo como meio de fermentação resolve-se o problema poluente que este apresenta.

Em trabalhos anteriores, o vector pVK1.1 (Kumar *et al.* 1992), que contém o gene *lacA* (que codifica para a  $\beta$ -galactosidase de *A. niger*), foi clonado na estirpe floculante *S. cerevisiae* NCYC869-A3, tendo-se obtido uma estirpe com elevados níveis de produção de enzima (Domingues *et al.* 2002). No entanto, quando se operou em contínuo observaram-se alguns problemas de estabilidade do plasmídeo o que levou à diminuição da produção de  $\beta$ -galactosidase (Domingues *et al.* 2005).

Para melhorar a estabilidade deste sistema era conveniente integrar este gene no genoma da levedura. No entanto, com a integração deste gene num único sítio alvo do genoma (gene *URA3*) da mesma estirpe de levedura, utilizando para esse efeito o vector integrativo pAV1, que contém o gene *lacA* retirado de pVK1.1, foram obtidas estirpes com níveis de produção de enzima muito baixos e crescimento em lactose muito lento (Velho, 2003).

Para aumentar o nível de expressão e assim obter estirpes recombinantes de *S. cerevisiae* excretoras de  $\beta$ -galactosidase de *A. niger* que ultrapassem as limitações das estirpes anteriormente construídas, torna-se fundamental integrar o gene *lacA* nos cromossomas da levedura em múltiplas cópias.

Em suma, com este trabalho pretende-se construir estirpes floculantes de *S. cerevisiae* que apresentem pelo menos o mesmo nível de produção de  $\beta$ -galactosidase

do que a obtida com a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1 (Domingues *et al.* 2002), mas com estabilidade de produção melhorada, usando as sequências repetidas  $\delta$  do genoma desta levedura como sítios alvos de integração do gene *lacA* de *A. niger* que codifica para produção e excreção desta enzima. Para esse efeito, utilizou-se dois sistemas de integração distintos: um deles tem por base o vector p $\delta$ -neo que utiliza como marca de selecção dominante a resistência ao antibiótico G418 e o outro tem por base o vector p $\delta$ -UB que utiliza como marca de selecção o gene *URA3*. Enquanto que no primeiro sistema a integração de múltiplas cópias do gene de interesse é permitida, no segundo sistema pretende-se obter a integração de cópias únicas desse gene em diferentes sítios do genoma.

Tendo em conta o objectivo proposto foi elaborada a seguinte estratégia:

1- Construir vectores integrativos de expressão e secreção de  $\beta$ -galactosidase: o gene *lacA* de *A. niger*, ladeado pelo promotor e terminador *ADH1*, foi retirado do vector pVK1.1 e clonado nos vectores integrativos p $\delta$ -neo e p $\delta$ -UB;

2- Transformar as estirpes de levedura *S. cerevisiae* NCYC869-wt com o vector integrativo construído baseado no vector p $\delta$ -neo e *S. cerevisiae* NCYC869-A3 com o vector integrativo construído baseado no vector p $\delta$ -UB;

3- Seleccionar as estirpes transformantes de interesse;

4- Confirmar e caracterizar as integrações por hibridação Southern;

5- Estudar a estabilidade das integrações;

6- Estudar os perfis de produção de  $\beta$ -galactosidase e a capacidade de fermentar a lactose, comparando com a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1.

## 1.2 A importância biotecnológica da enzima $\beta$ -galactosidase

A  $\beta$ -D-galactosídeo galactohidrolase, E.C. 3.2.1.23, designada usualmente por  $\beta$ -galactosidase ou lactase, é uma enzima que catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose a  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-glucose (Figura 1.1).

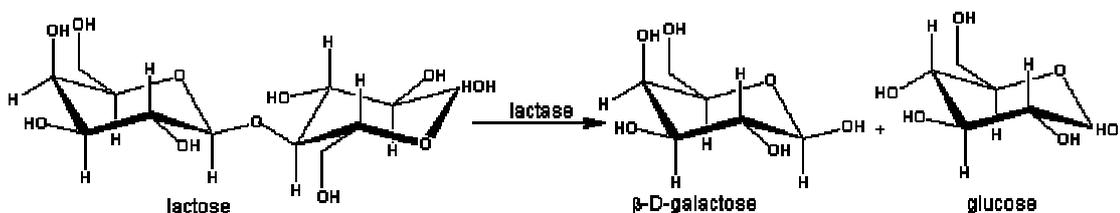


Figura 1.1: Reação de hidrólise da lactose pela  $\beta$ -galactosidase.

Esta enzima deve a sua importância industrial aos problemas tecnológicos, ambientais e de saúde relacionados com as propriedades da lactose, nomeadamente a sua baixa solubilidade, o seu baixo poder adoçante e a sua pobre digestibilidade e biodegradabilidade.

Em termos de saúde pública, a sua importância está relacionada com a intolerância à lactose apresentada por alguns indivíduos, ou grupos populacionais, devido à insuficiência intestinal de actividade de  $\beta$ -galactosidase, indicando os dados existentes que a população tolerante tende a diminuir. Logo, torna-se muito importante a redução do teor em lactose em leite e produtos lácteos.

Relativamente aos problemas tecnológicos, verifica-se que o elevado conteúdo de lactose em produtos não fermentáveis derivados do leite, tais como gelado e leite condensado, pode levar à cristalização da lactose com a consequente obtenção de produtos sem a textura adequada. A utilização da  $\beta$ -galactosidase elimina não só a cristalização como também permite obter produtos mais “doces”, mais cremosos e mais digeríveis, o que permite reduzir a adição de sacarose.

Os problemas ambientais estão relacionados com a carga poluente contida no soro de queijo. A produção de queijo, resultante da precipitação da caseína do leite, leva à formação de um sub-produto chamado soro de queijo ou soro de leite. O soro de queijo é um dos principais efluentes da indústria de laticínios uma vez que por cada 10 litros de leite é produzido 1 quilograma de queijo e obtidos 9 litros de soro. Este é constituído, essencialmente, pela fase aquosa do leite, incluindo o açúcar do leite (lactose), sais

minerais e proteínas. Cada litro de soro contém cerca de 50 gramas de lactose e 10 gramas de proteínas de elevado valor nutricional e funcional. Mas, apesar das suas reconhecidas qualidades, o soro de queijo é de facto um potencial poluente devido à sua elevada carga orgânica, que impossibilita a sua incorporação nos processos tradicionais de tratamento de efluentes, e à sua difícil biodegradabilidade (a carga poluente de 1000 litros de soro é equivalente à de 600 pessoas).

Até ao final dos anos 70, o soro era, quase na sua totalidade, espalhado nos campos ou lançado nos rios, causando graves problemas de poluição ambiental. Hoje em dia, com a produção nacional de cerca de 1 milhão de litros de soro de queijo por dia, e tendo em conta o rigor da actual legislação ambiental, a indústria de lacticínios depara-se com uma enorme pressão para encontrar alternativas legais para a sua “eliminação” ou aproveitamento e que não acarretem prejuízos. Para resolver este problema várias novas tecnologias foram sendo desenvolvidas, nomeadamente sistemas de membranas de ultrafiltração e microfiltração. A utilização destas tecnologias permitiu a produção de uma vasta gama de produtos de interesse comercial, como por exemplo, concentrados de proteínas de soro de queijo.

A aplicação dos processos membranares ao soro de queijo leva à produção de uma corrente rica em lactose – o permeado de queijo – que contém a maior parte da carga poluente do soro. Mais uma vez a enzima  $\beta$ -galactosidase pode ser aplicada, desta feita na hidrólise da lactose do permeado de queijo, resultando um xarope com elevado poder adoçante, que pode ser incorporado em gelados ou em sobremesas geladas. O aumento do poder adoçante é conferido pelos açúcares resultantes da hidrólise da lactose (glucose e galactose), já que, qualquer um deles apresenta um valor edulcorante superior ao da lactose.

Outra aplicação desta enzima é o fabrico de queijos tratados enzimaticamente que maturam mais rapidamente e, além disso, o soro obtido, com baixo teor em lactose, após concentração, pode ser usado como ingrediente alimentar.

A enzima  $\beta$ -galactosidase encontra-se espalhada pela natureza e pode ser isolada a partir de plantas (como por exemplo, pêssigo, alperce, amêndoas), órgãos de animais (como por exemplo, intestino, cérebro), bactérias, leveduras (enzima intracelular) e fungos (enzima extracelular). Na Tabela 1.1 estão apresentadas algumas das possíveis fontes de  $\beta$ -galactosidase e as suas principais propriedades.

**Tabela 1.1: Algumas das possíveis fontes de  $\beta$ -galactosidase, respectivo pH e temperatura ótimos (modificado de Gekas e López-Leiva, 1985)**

Fontes	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0-4,0	55-60
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	50-55
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	37
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9-7,3	35
<i>Escherichia coli</i>	7,2	40
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	60-65
<i>Bacillus sp</i>	6,8	65
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7,0	42-45
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2-7,1	55-57
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6,5-7,5	55
<i>Mucor pucillus</i>	4,5-6,0	60
<i>Thermus aquaticus</i>	4,5-5,5	80

A grande vantagem dos microrganismos relativamente às plantas é o facto de atingirem maiores produtividades, sendo a  $\beta$ -galactosidase de origem fúngica a mais utilizada em aplicações tecnológicas.

As propriedades da enzima  $\beta$ -galactosidase dependem consideravelmente da sua origem, nomeadamente o peso molecular, glicolisação, termoestabilidade, se é ou não excretada e o pH óptimo. Geralmente, as enzimas de origem fúngica apresentam um pH óptimo ácido (2,5-4,0) enquanto que as obtidas de leveduras e bactérias têm um pH óptimo na região neutra (6,0-7,0 e 6,6-7,5, respectivamente).

São várias as preparações comerciais de  $\beta$ -galactosidase de diferentes origens microbianas existentes no mercado, como por exemplo, com origem bacteriana, a  $\beta$ -galactosidase de *Bacillus circulans*, denominada Biolacta, comercializada pela Daiwa Kasei (Osaka, Japão) e com origem em levedura, a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*, comercializada pela Sigma Aldrich (EUA).

Estas preparações são utilizadas no processamento dos produtos da indústria de laticínios e, para reduzir os sintomas da intolerância da lactose, algumas preparações têm sido usadas para hidrólise da lactose do leite antes do seu consumo ou ingeridas sob a forma de comprimidos.

A enzima  $\beta$ -galactosidase apresenta diversas potencialidades de utilização, as quais se encontram sintetizadas na Tabela 1.2. Como a principal limitação da sua aplicação prende-se com o seu elevado custo de produção e purificação, torna-se

necessário construir estirpes microbianas produtoras de  $\beta$ -galactosidase que sejam aplicáveis a nível industrial e que permitam reduzir esses custos.

**Tabela 1.2: Resumo das possíveis aplicações biotecnológicas da enzima  $\beta$ -galactosidase**

Aplicações biotecnológicas da enzima $\beta$ -galactosidase
Produção de leite sem lactose
Obtenção de produtos derivados do leite com baixa concentração de lactose
Produção de iogurtes adoçados
Incorporação em medicamentos para combater a intolerância à lactose
Obtenção de concentrados para gelados com baixa concentração de lactose
Produção de xaropes alimentares
Tratamento enzimático na produção de queijo
Processamento da lactose contida no soro e permeado de soro

### 1.3 Produção de $\beta$ -galactosidase extracelular de *A. niger* em *S. cerevisiae*

Existem várias razões para a utilização da levedura *S. cerevisiae* em processos biotecnológicos. A tecnologia de fermentação em larga escala está bem desenvolvida e revela que esta levedura é capaz de crescer facilmente e com baixos custos. É largamente utilizada nas indústrias alimentar e farmacêutica uma vez que possui o estatuto de GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), EUA.

Esta levedura possui a capacidade de fermentar uma vasta gama de açúcares mas não é capaz de metabolizar a lactose. No entanto, consegue crescer neste açúcar após tratamento prévio do mesmo, enzimaticamente ou quimicamente, uma vez que a hidrólise da lactose dá origem à glucose e à galactose, dois monossacarídeos metabolizáveis por esta levedura. Excreta naturalmente poucas proteínas e produz etanol como produto final do seu metabolismo energético.

Adicionalmente, as técnicas de biologia molecular aplicadas a esta levedura estão actualmente optimizadas, os conhecimentos sobre a sua genética são hoje mais avançados do que para qualquer eucariota (a sequência total do seu genoma tornou-se conhecida em Abril de 1996), podendo ser manipulada quase tão facilmente como a bactéria *Escherichia coli*. Como organismo eucariota, apresenta diversas vantagens comparativamente à *E. coli* na expressão de proteínas de eucariotas, nomeadamente no processamento pós-traducional destas proteínas.

Assim sendo, a levedura *S. cerevisiae* apresenta diversas propriedades que levam à sua implementação como uma importante ferramenta na expressão de proteínas heterólogas de valor acrescentado seja para fins de investigação, industriais ou médicos.

A enzima  $\beta$ -galactosidase é produzida extracelularmente pelo fungo filamentoso *A. niger*. O gene que codifica esta proteína (*lacA*) torna-se por isso mesmo um potencial candidato para a clonagem em *S. cerevisiae* tendo em vista a produção extracelular da referida enzima. O facto desta  $\beta$ -galactosidase ser extracelular faz com que a sua separação, após fermentação, seja facilitada visto não ser necessário efectuar a sua extracção do interior das células e torna desnecessário um sistema de transporte de lactose para o interior da célula.

O pH óptimo da actividade catalítica da enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. niger* está compreendido entre 3,0 e 4,0 o que a torna apropriada para processar produtos ácidos da indústria de lacticínios, nomeadamente o soro de queijo ácido e o seu permeado. O facto de apresentar um pH óptimo ácido faz ainda com que esta enzima seja adequada para ser usada em ambiente gástrico, isto é, no estômago humano, para aliviar os sintomas da intolerância à lactose (Corazza *et al.* 1992). Outra vantagem da  $\beta$ -galactosidase de *A. niger* é que apresenta uma boa termoestabilidade e actividade catalítica a 60-65°C. A sua utilização a temperaturas tão altas como estas minimiza os riscos de contaminação no processo.

Kumar *et al.* (1992) construíram o plasmídeo pVK1.1 (11,06 Kb) por clonagem de uma cassette do gene *lacA* e promotor e terminador *ADH1*, truncados no sítio de restrição *SphI*, no sítio de restrição único *SphI* de um vector baseado no 2 $\mu$ m que contém os genes bacterianos de resistência à ampicilina e de origem de replicação e o gene de levedura *URA3*. Com este vector transformaram uma estirpe de *S. cerevisiae* mas a obtenção de transformantes de *S. cerevisiae* excretadores de  $\beta$ -galactosidase não foi muito bem sucedida, tendo estes apresentado um crescimento muito lento.

Posteriormente, Ramakrishnan e Hartley (1993) transformaram estirpes de levedura industriais com o mesmo vector. Obtiveram estirpes excretoras de  $\beta$ -galactosidase, mas apesar destas terem apresentado um bom crescimento, a estabilidade do plasmídeo era muito baixa (10%).

As estirpes construídas apresentam algumas limitações para a sua aplicação biotecnológica, mas ficou demonstrada a viabilidade de excreção de  $\beta$ -galactosidase de *A. niger* por estirpes recombinantes de *S. cerevisiae*.

A utilização de estirpes floculantes modificadas geneticamente em culturas de alta densidade celular é uma forma bastante atraente para aumentar a produtividade global dos processos fermentativos. Logo, uma das possibilidades de diminuir o custo associado à produção de  $\beta$ -galactosidase, seria construir estirpes floculantes de *S. cerevisiae* excretoras de  $\beta$ -galactosidase.

As culturas de alta densidade celular baseiam-se na retenção dos microrganismos no interior de um biorreactor pela imobilização dos microrganismos em suportes ou pela utilização de estirpes floculantes.

A floculação de leveduras é definida como sendo a agregação espontânea e não sexual das células que levam à formação de flocos macroscópicos que sedimentam rapidamente no meio de cultura (Domingues, 2001). É um mecanismo simples e económico de imobilizar as células que não necessita de procedimentos complexos nem de suportes. Este fenómeno tem sido apenas utilizado quase exclusivamente na indústria cervejeira, na fermentação primária da cerveja, na qual se apresenta de elevada importância, não como sistema contínuo de células imobilizadas mas como sistema de separação.

Os biorreactores de alta densidade celular, quando operados continuamente, beneficiam das propriedades de sedimentação rápida das células floculadas para reterem a sua biomassa no interior. Ao manterem concentrações celulares tão elevadas, atingem produtividades e concentrações de produto muito superiores às obtidas com os sistemas convencionais.

Estes sistemas apresentam-se como técnicas muito interessantes devido à sua simplicidade e ao seu baixo custo (o suporte está associado ao maior custo neste tipo de técnicas) e os requerimentos energéticos são também menores do que os requeridos pelos sistemas convencionais.

Ainda, a utilização de células floculantes melhora significativamente os processos de separação após fermentação. Além de permitirem técnicas de separação menos agressivas, conseguem uma redução nos custos de produção uma vez que a quantidade de células a separar por centrifugação ou filtração é fortemente reduzida.

Estes sistemas são ainda mais estáveis a longo termo do que os sistemas convencionais e apresentam menores riscos de contaminação (Domingues *et al.* 2000a).

Domingues *et al.* (2000b) construíram estirpes cervejeiras floculantes e não floculantes de *S. cerevisiae*, excretoras de  $\beta$ -galactosidase de *A. niger*, utilizando o plasmídeo pLD1. Este plasmídeo foi construído por clonagem do gene *lacA*, ladeado

pelo promotor e terminador *ADH1*, contidos no pVK1.1 (Kumar *et al.* 1992), no plasmídeo pET13.1 (Henderson *et al.* 1985). Compararam o desempenho da estirpe floculante com a não floculante quanto à produção de  $\beta$ -galactosidase extracelular e verificaram que não haviam diferenças significativas. Apesar das estirpes cervejeiras recombinantes obtidas apresentarem algumas limitações, tais como crescimento lento e limitação na quantidade de lactose metabolizada, ficou comprovada a viabilidade da excreção de  $\beta$ -galactosidase por células floculantes.

Em 2002, Domingues *et al.* transformaram a estirpe floculante auxotrófica *S. cerevisiae* NCYC869-A3 (mutada para ura<sup>-</sup> por Lima, 1993) com o vector pVK1.1 (Kumar *et al.* 1992). Obtiveram uma estirpe com níveis de produção de  $\beta$ -galactosidase superiores aos obtidos por células recombinantes de *S. cerevisiae* de trabalhos anteriormente publicados (Kumar *et al.* 1992; Ramakrishnan and Hartley 1993; Domingues *et al.* 2000b). A nova estirpe apresentou um bom crescimento em lactose e uma produção extracelular muito superior às estirpes cervejeiras anteriormente construídas. Apresentou ainda um desempenho claramente superior ao descrito para a estirpe construída por Kumar *et al.* (1992) e semelhante ao descrito para as estirpes construídas por Ramakrishnan e Hartley (1993), em termos de crescimento em lactose, mas superior em termos de estabilidade do plasmídeo e produção de  $\beta$ -galactosidase extracelular. A actividade enzimática produzida é comparável com o fungo *A. niger* mas com maior pureza, minimizando os passos de purificação. E como as células são floculantes têm a vantagem de poderem ser implementadas em sistemas contínuos de alta densidade celular (Domingues *et al.* 2005), com o intuito de aumentar os níveis de produção de enzima.

A continuidade deste trabalho comprovou a viabilidade da utilização de sistemas contínuos de elevada densidade celular na produção de  $\beta$ -galactosidase, tendo sido obtida uma produtividade máxima, com 50 gramas de lactose por litro de meio semi-sintético, para a taxa de diluição de  $0,24 \text{ h}^{-1}$ , valor esse 11 vezes superior ao obtido em sistema descontínuo (Domingues *et al.* 2005). Mas apesar do seu elevado desempenho, apresenta uma limitação que é a estabilidade plasmídica. Quando se operou com 100 gramas de lactose por litro desse meio, a uma taxa de diluição de  $0,18 \text{ h}^{-1}$ , apenas 35% da cultura manteve capacidade de produzir  $\beta$ -galactosidase, mesmo assim com uma produtividade quatro vezes superior à encontrada em sistemas descontínuos com o mesmo meio (Domingues *et al.* 2005). Em fermentação descontínua verifica-se que mais de 70% da população retém o plasmídeo (Domingues *et al.* 2004).

A utilização do permeado de soro de queijo como substrato para a produção de  $\beta$ -galactosidase extracelular em descontínuo permitiu obter a mesma produção de enzima do que a obtida em meio semi-sintético com 50 gramas de lactose iniciais (Domingues, 2001). Na produção de enzimas o custo com o substrato pode corresponder a 25-35% do custo total de produção, logo a viabilidade de utilizar substratos baratos deve ser considerada.

Para tentar resolver o problema de instabilidade plasmídica, Velho (2003) transformou a mesma estirpe de levedura com o vector integrativo pAV1, resultante da clonagem do gene *lacA*, ladeado pelo promotor e terminador *ADH1*, retirado do vector pVK1.1, no vector YIp5 (Stratagene). As estirpes obtidas apresentaram níveis de produção de  $\beta$ -galactosidase muito baixos e um crescimento muito lento em lactose, impedindo a sua fermentação em tempo útil.

Para a expressão estável e de elevado nível de  $\beta$ -galactosidase, é necessário elaborar uma estratégia que permita a integração do gene *lacA* nos cromossomas da levedura em múltiplas cópias, na qual o crescimento celular, a estabilidade das integrações e a manutenção da capacidade de floculação têm de ser extensivamente estudados.

#### **1.4 Produção de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae* - Sistemas de integração nas sequências $\delta$**

A escolha do vector é um factor determinante no nível de expressão do gene clonado e no desempenho da estirpe transformada uma vez que o número de cópias controla a dosagem do gene e a estabilidade do mesmo afecta o desempenho da população celular.

Os vectores de levedura podem ser divididos em duas categorias: vectores integrativos e vectores autónomos. De um modo geral, os vectores autónomos tendem a ser instáveis enquanto que os vectores integrativos são dotados de maior estabilidade.

Os vectores autónomos baseiam-se em plasmídeos que contêm sequências de replicação autónoma em levedura (*ARS*) que funcionam como origens de replicação (*YRp-Yeast replicative plasmid*), ou no plasmídeo nativo 2 $\mu$ m de *Saccharomyces* (*YEp-Yeast episomal plasmid*).

Os vectores de expressão mais utilizados em *S. cerevisiae* são baseados nos vectores de clonagem bacteriana e de levedura (*shuttle vectors*) baseados no 2 $\mu$ m. O

vector 2 $\mu$ m tem 6,3 Kb e encontra-se presente em muitas estirpes de *Saccharomyces* em 30-100 cópias por célula, possuindo um sistema de amplificação do número de cópias (Romanos *et al.* 1992; Hadfield *et al.* 1993).

A instabilidade plasmídica tem sido um problema inerente aos sistemas recombinantes de *S. cerevisiae* (Romanos *et al.* 1992), mas apesar disso, os plasmídeos baseados no 2 $\mu$ m têm sido largamente utilizados. Requerem pressão selectiva para a sua manutenção e podem também ser instáveis durante elevados níveis de expressão até mesmo sob condições selectivas (Romanos *et al.* 1992).

Dado que os plasmídeos de elevado número de cópias baseados no plasmídeo episomal são por vezes instáveis, a integração directa de um gene no genoma das células hospedeiras é um método efectivo para tentar circunscrever este problema (Chung *et al.* 2002). A instabilidade segregativa dos plasmídeos é eliminada e, para inserções estruturalmente estáveis, o número de cópias pode ser mantido no seu valor óptimo (Lee e Da Silva, 1997a).

Os vectores integrativos (*YIp-Yeast integrative plasmid*), tal como o nome indica, são vectores que são integrados no genoma do hospedeiro por recombinação homóloga, em uma ou múltiplas cópias dependendo do sítio alvo de integração, isto é, do local de homologia. Não sofrem replicação autónoma em levedura quando estão isolados, pelo que a marca de selecção só é expressa se o vector ou o gene marcador for integrado nos cromossomas das células hospedeiras.

Os vectores YIp que usam marcas auxotróficas, como por exemplo *URA3* ou *TRP1*, como local único de recombinação homóloga não são os mais adequados para se obter elevados níveis de expressão dos genes clonados, especialmente nos casos em que os níveis de expressão são largamente dependentes do número de cópias (Chung *et al.* 2002). Isto porque o número de cópias integradas é muito baixa, apenas uma ou duas cópias por célula (Romanos *et al.* 1992).

Para se aumentar o número de cópias integradas, e consequentemente, os níveis de expressão do gene integrado, outras marcas de selecção e outros sítios alvo de integração têm de ser utilizados. Para isso, a integração direccionada para sequências repetidas de DNA cromossomal de *S. cerevisiae* tem sido largamente utilizada, nomeadamente, o DNA ribossomal, os elementos Ty e as sequências  $\delta$ .

O locus rDNA (DNA ribossomal) tem sido utilizado dado a existência aleatória de cerca 200 unidades de rDNA no cromossoma XII de *S. cerevisiae*, que possibilitou a integração de mais de 100 cópias de genes heterólogos (Nieto *et al.* 1999, citado por

Kim *et al.* 2001). Outra forma de obter múltiplas cópias integradas é recorrendo a vectores baseados em elementos de transposição de levedura. Os elementos de transposição de levedura, Ty, são análogos aos retrovírus dos eucariotas superiores, permitindo a integração em sítios múltiplos do DNA, podendo resultar em 30-40 cópias integradas no genoma (Hadfield *et al.* 1993). A integração nestes elementos não interrompe sequências codificantes (Ji *et al.* 1993, citado por Lee e Da Silva, 1996).

As sequências  $\delta$  correspondem a regiões terminais repetidas (*Long Terminal Repeats – LTRs*) do retrotransposão Ty de *S. cerevisiae* (Romanos *et al.* 1992; Dujon, 1996). Existem cerca de 425 cópias destas sequências no genoma da levedura que podem ocorrer associadas aos elementos de retrotransposição ou podem ainda ocorrer como elementos isolados (Dujon, 1996). Este método de integração torna possível a inserção de um maior número de cópias de genes heterólogos nos cromossomas de levedura do que os sistemas de integração convencionais (Parekh *et al.* 1996; Lee e Da Silva 1997a).

Vários autores verificaram a viabilidade da empregabilidade das sequências  $\delta$  na inserção de genes heterólogos em *S. cerevisiae* (Jacobs *et al.* 1988; Sakai *et al.* 1990; Mochizuki *et al.* 1994; Parekh *et al.* 1996; Wang *et al.* 1996; Lee e Da Silva, 1997a; Lee e Da Silva, 1997b; Cho *et al.* 1999; Kim *et al.* 2001; Chung *et al.* 2002; entre outros).

Para seleccionar estirpes recombinantes de *S. cerevisiae* com elevado número de cópias, Wang *et al.* (1996) e Parekh *et al.* (1996), empregaram, como marca de selecção dominante, a resistência ao antibiótico G418 (geneticina), conferida pelo gene bacteriano *neo<sup>r</sup>*. Apesar de terem construído vectores integrativos diferentes (o primeiro contém uma sequência  $\delta$  do retrotransposão Ty1 enquanto que o segundo contém uma sequência  $\delta$  do retrotransposão Ty2), os resultados obtidos foram bastante semelhantes. Parekh *et al.* (1996) obtiveram, no máximo, 30 cópias integradas do gene *neo<sup>r</sup>*, maioritariamente sob a forma de cópias seguidas (*tandem*), num único sítio de integração. Também observaram cópias únicas e dois sítios de integração diferentes, o que totaliza três padrões distintos de integração. A estabilidade estrutural das integrações foi mantida após 50 gerações em meio não selectivo, uma vez que as análises Southern quantitativas, efectuadas após este ensaio de estabilidade a longo termo, não revelaram uma diminuição evidente do número de cópias integradas.

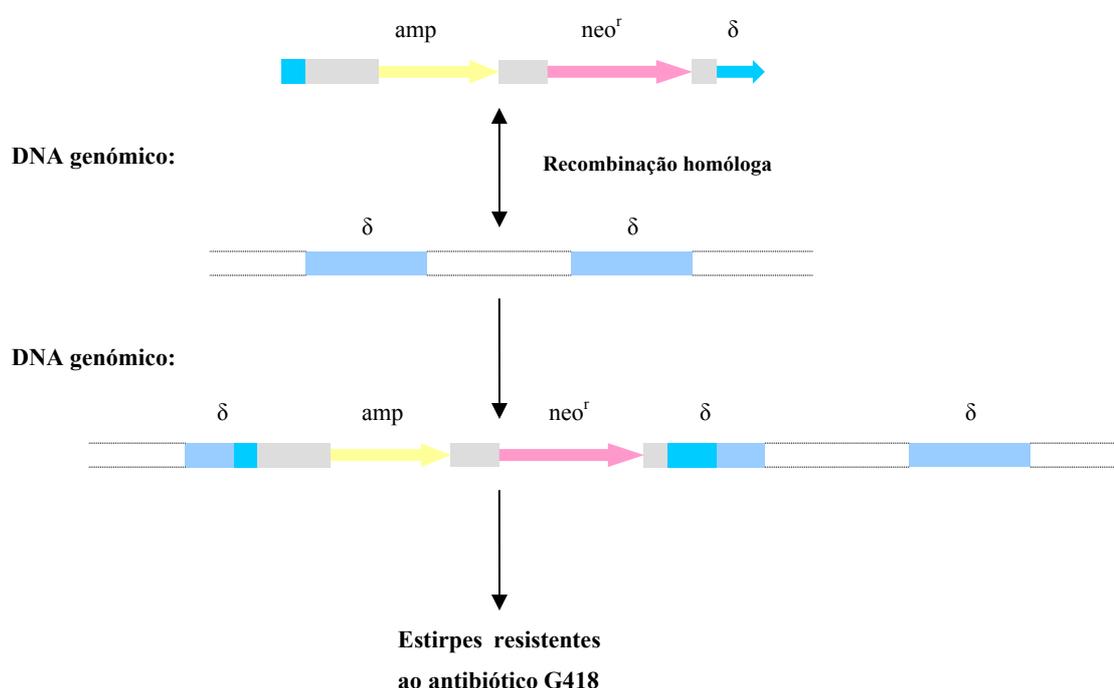
Wang *et al.* (1996) obtiveram mais de 40 cópias integradas deste gene por célula, que ocorreram, no máximo, em três sítios diferentes sob a forma de cópias *tandem*. A

estabilidade estrutural das integrações foi mantida por 70-100 gerações em meio não selectivo. Os rearranjos cromossomais, tais como a perda de cópias, perda do local de integração, alteração da localização das integrações, ocorreram apenas em 0,2% das células por geração, o que demonstra que este plasmídeo apresenta um melhor desempenho do que os plasmídeos baseados no 2 $\mu$ m que são perdidos em 1-3% das células por geração em condições não selectivas (Wang *et al.* 1996).

O uso da resistência ao antibiótico G418 como marca de selecção dominante permitiu em ambos os trabalhos obter estirpes com uma vasta variedade do número de cópias integradas, tendo, as estirpes analisadas, apresentado estabilidade estrutural das inserções.

O sistema de integração desenvolvido por Wang *et al.* (1996), que tem por base o vector p $\delta$ -neo (Figura 1.2), foi posteriormente utilizado na introdução de genes de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae* (Tabela 1.3).

Vector integrativo linearizado:



**Figura 1.2:** Esquema representativo do vector p $\delta$ -neo linearizado, construído por Wang *et al.* (1996), e exemplificação de integração de uma cópia do vector no DNA genómico.

**Tabela 1.3: Proteínas heterólogas integradas no genoma de *S. cerevisiae* usando sistemas de integração baseados no vector p $\delta$ -neo (Wang *et al.* 1996), respectivos autores e número máximo de cópias integradas**

Autores	Proteínas	Número máximo de cópias integradas no genoma
Wang <i>et al.</i> 1996	Invertase	20
Lee e Da Silva 1997a	$\beta$ -galactosidase ( <i>E. coli</i> )	9
Cho <i>et al.</i> 1999	endo/exo-glucanases e $\beta$ -glucosidase	44
Kim <i>et al.</i> 2001	Hirudina	10
Chung <i>et al.</i> 2002	Xilose Redutase	Não determinadas

O emprego deste novo sistema de integração permitiu a inserção de elevados números de cópias de genes de proteínas heterólogas de uma só vez. Cho *et al.* (1999), numa única ronda de transformações, obtiveram um máximo de 44 cópias de genes integrados. Estes autores utilizaram como método de transformação a electroporação, no qual a elevada voltagem aplicada a culturas de levedura frescas, ressuspensas em protector osmótico, promove a formação de pequenos poros na parede celular que permitem a entrada do DNA. Os restantes autores utilizaram métodos de transformação baseados no método do acetato de lítio (Ito *et al.* 1983) que, apesar de apresentar eficiências de transformação inferiores à electroporação, tem sido continuamente utilizado.

Em todos estes trabalhos, verificou-se que o número de transformantes diminuiu com o aumento da concentração do antibiótico no meio selectivo e também foi verificado que este número aumenta com a quantidade de DNA utilizada na transformação (Wang *et al.* 1996, Parekh *et al.* 1996, Lee e Da Silva, 1997a).

Este sistema de integração permitiu produções de proteína melhoradas relativamente a estirpes contendo plasmídeos baseados no 2 $\mu$ m, como por exemplo, produção de  $\beta$ -glucosidase e endo/exo-glucanases (Cho *et al.* 1999) e hirudina (Kim *et al.* 2001).

Parekh *et al.* (1996) implementaram um sistema de integração nas sequências  $\delta$  que utilizaram na produção de uma proteína heteróloga (BPTI). Os níveis de secreção de proteína obtidos foram melhorados 2 a 10 vezes relativamente a sistemas baseados em plasmídeo epissomal, que haviam construído previamente.

Como todas estas integrações ocorrem, predominantemente, sob a forma de longos *tandem arrays* (inserções de várias cópias sequenciais do gene de interesse num único sítio), a probabilidade de serem eliminadas por recombinação excisional é maior (Romanos *et al.* 1992) e a estabilidade das inserções tem de ser cuidadosamente estudada (Wang *et al.* 1996).

Lee e Da Silva (1997a) e Wang *et al.* (1996), utilizando o vector p $\delta$ -neo, obtiveram instabilidades estruturais significativas aquando da expressão das cassetes integradas (*CUP1p-lacZ* e *MFA1<sub>P/L</sub>-SUC2*, respectivamente). Os transformantes contendo 5 ou mais cópias da cassette *MFA1<sub>P/L</sub>-SUC2*, foram muito instáveis durante cultura não selectiva a longo termo, 20% a 75% perderam todos os genes integrados e o número de cópias diminuiu significativamente nas restantes. De referir que esta cassette de expressão se revelou instável mesmo em plasmídeo episomal, uma vez que 50% das células perdem o plasmídeo em meio selectivo.

Nem todos os autores comprovaram a manutenção do número de cópias após ensaios de estabilidade em meio não selectivo, como é o caso de Cho *et al.* (1999) e Kim *et al.* (2001). Estes autores apenas verificaram a manutenção da resistência ao antibiótico em placas selectivas, o que não significa que o mesmo número de cópias inicialmente conseguidas tenha sido mantido.

Este método de integração nas sequências  $\delta$  proporciona um método rápido e conveniente de integração múltipla de genes, mas a estabilidade das estirpes resultantes deve ser avaliada particularmente em condições de elevada expressão ou secreção.

Para melhorar a eficiência de transformação (e assim o número de cópias integradas) e a estabilidade das inserções nas sequências  $\delta$ , Lee e Da Silva (1997a) reduziram o tamanho do vector p $\delta$ -neo, contendo a cassette de expressão *CUP1p-lacZ*, eliminando a integração das sequências bacterianas desnecessárias, o que originou um *insert* 35% menor. Este sistema reduzido mostrou ser melhor do que o sistema não reduzido em vários aspectos: maior eficiência de transformação, maior variedade de padrões de integração e maiores níveis de actividade específica, o que equivale a um maior número de cópias integradas uma vez que estas duas grandezas apresentaram uma relação linear. O elevado número de integrações obtidas com o sistema reduzido não afectou o crescimento das estirpes resultantes, mesmo sob indução do gene clonado, e apresentou um número de cópias mais do dobro que o sistema original (18 cópias no máximo) e os níveis de produção de proteína ( $\beta$ -galactosidase de *E. coli*) foram superados relativamente ao sistema baseado em plasmídeo 2 $\mu$ m. As integrações do

sistema reduzido foram aparentemente mais estáveis em cultura sequencial a longo termo, embora em ambos os sistemas tenha havido uma redução na estabilidade estrutural com indução do gene clonado (*lacZ*). Este trabalho demonstrou que o tamanho do DNA de inserção pode ser um factor condicionante do número de cópias integradas no genoma.

Os métodos de integração por recombinação homóloga que usam a selecção por resistência a antibiótico, para além da possível instabilidade das inserções *tandem*, também não permitem controlar o número de inserções sequenciais porque, normalmente, apenas é possível fazer uma única ronda de transformações.

Lee e Da Silva (1997b), desenvolveram um novo método de recombinação homóloga que resulta em integrações sequenciais dispersas (não *tandem*) nas sequências  $\delta$  do genoma da levedura *S. cerevisiae*. Este método permite controlar o número de inserções de genes nos cromossomas da estirpe hospedeira, o que pode melhorar a estabilidade estrutural das integrações.

Para esse efeito construíram o vector integrativo p $\delta$ -UB (Figura 1.3), no qual clonaram o gene *CUP1-lacZ* para estudar o desempenho da cassette de selecção “reutilizável” que contém o gene *URA3*, ladeado por duas sequências bacterianas de histidina G (*hisG*), que permite a implementação deste novo método.

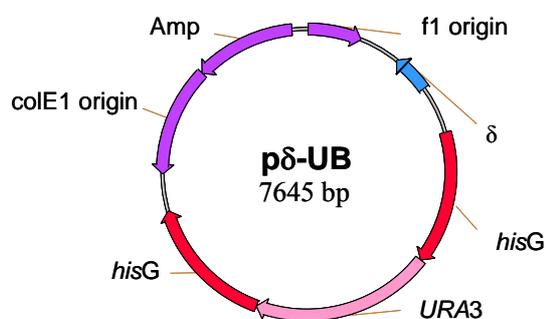


Figura 1.3: Esquema representativo do vector integrativo p $\delta$ -UB construído por Lee e Da Silva (1997b).

Os transformantes são seleccionados usando a marca de selecção *URA3* que vai sendo eliminada por recombinação das sequências repetidas que a flanqueiam (*hisG*). Esta recombinação faz com que apenas uma nova integração, num novo sítio,

permaneça após cada nova ronda de transformações, uma vez que inserções seguidas (*tandem*) são eliminadas, já que quaisquer sequências de *hisG* podem recombinar.

Os transformantes que perderam a marca de selecção *URA3* são seleccionados positivamente em placas 5-FOA (ácido 5-fluoro-orotico, Boeke *et al.* 1984) e usados numa nova transformação, o que permite efectuar várias rondas de transformações sequenciais.

Desta forma foi possível integrar sequencialmente, e em sítios diferentes, 5 cópias do gene de interesse no genoma da estirpe hospedeira após 5 rondas de transformação, ou seja, foi possível integrar uma cópia por cada ronda de transformação (Lee e Da Silva, 1997b). No entanto, foi necessário confirmar a aquisição de novas cópias e a manutenção da cópia adquirida na ronda anterior, ronda após ronda, por análise Southern. A estabilidade destas integrações mostrou ser dependente da sua localização, uma vez que foram perdidas sempre as mesmas 2 bandas, permanecendo apenas 3 bandas estáveis, após 50 gerações em meio não selectivo.

As integrações sequenciais “cegas”, sem análise Southern entre elas, apenas foram bem sucedidas para a inserção de um pequeno número de genes. Foi obtido o número máximo de 3 cópias integradas numa única célula após 5 e 10 rondas de transformação e selecção.

Este método mostrou sobretudo a sua potencialidade na integração sequencial de um mesmo gene, ou de diferentes genes, nos cromossomas de *S. cerevisiae*, o que possibilita a sua aplicação em estudos específicos, como por exemplo, em engenharia metabólica.

## **2. Material e Métodos**

---

## 2.1 Esterilização de material, soluções e meios de cultura

Todo o material, soluções e meios de cultura resistentes à temperatura foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

As soluções e meios de cultura termolábeis foram esterilizados por filtração com acrodiscos estéreis de 0,2µm.

## 2.2 Estirpes utilizadas

Na Tabela 2.1 estão apresentadas as estirpes microbianas utilizadas no decorrer deste trabalho.

**Tabela 2.1: Estirpes microbianas utilizadas ao longo deste trabalho**

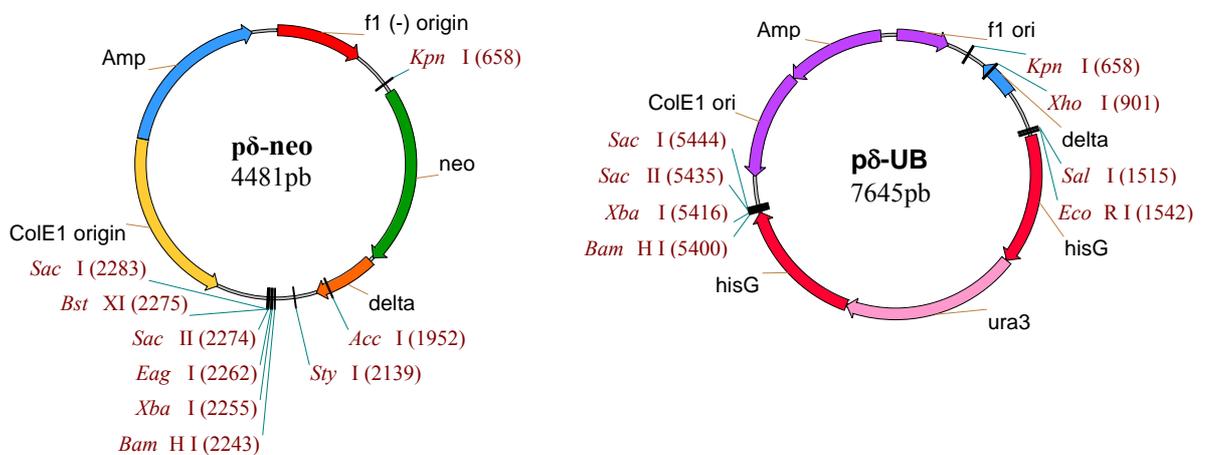
Estirpe	Genótipo	Fonte
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>+</sup> <i>recA1 endA1 thi-1 gyrA96</i> <i>hsdR17 supE44 relA1 φ89d lacZ</i> ΔM15 λ <sup>-</sup>	Bethesda Research Laboratories (BRL)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>rec<sup>-</sup>, end<sup>-</sup></i>	Stratagene
<i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt	<i>MataFLO1</i>	National Collection of Yeast Cultures (NCYC)
<i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3 (Lima, 1993)	<i>MataFLO1ura3</i>	Micoteca da Universidade do Minho (MUM)
<i>S. cerevisiae</i> NCYC869-A3/pVK1.1 (Domingues, 2001)	<i>MataFLO1ura3</i>	Micoteca da Universidade do Minho (MUM)

## 2.3 Vectores utilizados

Os vetores pδ-neo e pδ-UB (Figura 2.1) foram gentilmente cedidos pela Professora Nancy Da Silva, Universidade da Califórnia, Irvine, USA. Ambos os vetores são baseados no vector pBluescript II SK (Stratagene). Este vector é um vector bacteriano que tem origem de replicação CoLE1, origem de replicação f1 do fago filamentoso f1, gene de resistência à ampicilina e um local com 21 sítios únicos de restrição. O vector pδ-neo resultou da clonagem da sequência de levedura δ e do gene bacteriano neo<sup>r</sup>, que confere resistência ao antibiótico G418 (geneticina) em levedura, num desses locais de restrição. Esse local de múltiplos cortes foi também usado para

clonagem da sequência de levedura  $\delta$  e para clonagem do gene *URA3*, flanqueado por duas sequências de histidina G, na construção do vector p $\delta$ -UB.

Estes vectores foram utilizados como veículos de introdução da cassette de expressão que contem o gene *lacA* (de *A. niger*), sob acção do promotor e terminador *ADHI*, no genoma da levedura *S. cerevisiae*. Esta cassette de expressão foi retirada do vector pVK1.1 (Kumar *et al.* 1992) através de uma digestão com a enzima de restrição *SphI*. Este vector foi ainda utilizado para construção de uma sonda de DNA, tal como o vector YIp5 (Stratagene), para detectar o gene *lacA* e o gene *URA3*, respectivamente, por análise Southern (2.15).



**Figura 2.1:** Mapas de restrição dos vectores integrativos p $\delta$ -neo e p $\delta$ -UB com indicação de alguns dos locais de restrição únicos.

## 2.4 Meios de cultura e condições de crescimento

### 2.4.1 Crescimento de bactérias

O meio de cultura líquido utilizado para o crescimento de bactérias foi o meio LB (Luria-Bertani). Para seleccionar as estirpes com resistência à ampicilina utilizou-se o meio LB-amp. Para crescimento em meio sólido foi adicionado aos meios 2% (p/v) de agar. Os crescimentos efectuaram-se a 37°C e para crescimento em meio líquido utilizou-se ainda uma agitação de 300 rpm.

#### Meio LB

1,0% (p/v) Caseína  
 0,5% (p/v) Extracto de levedura  
 0,5% (p/v) NaCl  
 Acertar o pH a 7,5 com NaOH 10 N

Meio LB-amp

Meio LB

100 µg/ml Ampicilina

### 2.4.2 Crescimento de leveduras

Os meios de cultura líquidos utilizados para crescimento de leveduras foram o meio complexo YPD e o meio semi-sintético SSLactose. Os crescimentos efectuaram-se a 30°C com uma agitação de 150 rpm.

Os meios de cultura sólidos utilizados foram o meio YPD, o meio mínimo, o meio mínimo com uracilo e o meio mínimo com uracilo e 5-FOA (ácido 5-fluoro-orotico). Estes meios contêm 2% (p/v) de agar. Para seleccionar as estirpes produtoras de β-galactosidase adicionou-se 40 mg/ml de X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) às placas a partir de uma solução concentrada 500 vezes. Estas foram incubadas a 30°C.

Meio YPD

1% ou 2% (p/v) Glucose

2% (p/v) Peptona

1% (p/v) Extracto de levedura

Meio SSLactose

2% ou 5% (p/v) Lactose

0,5% (p/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0,2% (p/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>0,04% (p/v) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

0,2% (p/v) Extracto de levedura

Meio mínimo

2% (p/v) Glucose

0,67% (p/v) Bacto Yeast Nitrogen

Base without a.a

Meio mínimo com uracilo (150 ml)

150 ml Meio mínimo

750 µl de Solução uracilo

Solução uracilo

2,4 mg uracilo/ml NaHCO<sub>3</sub> 0,5% (p/v)

Meio mínimo com uracilo e 5-FOA (150 ml)

3 g glucose

0,67% (p/v) Bacto Yeast Nitrogen

Base without a.a

75 ml solução 5FOA+URA

Solução 5FOA+URA (500 ml)

1 g Ácido 5-Fluoro-orotico

5 ml de Solução uracilo

Perfazer volume com água

X-gal (500×)

1% (p/v) N,N-Dimetilformamida

## 2.5 Armazenamento de microrganismos

Os microrganismos foram conservados numa sala a 4°C em placas de agarose, contendo o meio de cultura apropriado, invertidas e seladas com papel *Parafilm*. Estes microrganismos foram repicados regularmente.

Simultaneamente foram conservados em culturas permanentes a -80°C. Para isso fez-se crescer cada microrganismo em meio de cultura líquido apropriado, incubando nas condições adequadas, durante um período de tempo de cerca 16 horas. Diluiu-se esta cultura 10 vezes em novo meio e incubou-se durante mais 6 horas. A cada mililitro desta cultura adicionou-se 0,3 ml de glicerol estéril, agitou-se no vórtex e incubou-se durante 10 minutos em gelo. De seguida, estes tubos, devidamente etiquetados, foram guardados a -80°C. Para a recuperação destas culturas, após descongelamento, estas foram crescidas em placas de agar com o meio de cultura apropriado e incubadas adequadamente.

## 2.6 Transformação de *E. coli*

O método de transformação de *E. coli* utilizado foi a electroporação (2.6.2) em aparelho *E. coli Pulser* (BioRad).

### 2.6.1 Preparação de células electrocompetentes

Inoculou-se uma colónia de *E. coli* em 5 ml de meio LB e colocou-se a crescer durante cerca de 16 horas a 37°C com uma agitação de 60 rpm. Adicionou-se 2,5 ml desta cultura a 500 ml de meio LB, contido num frasco de 2 litros, e deixou-se crescer a 37°C com uma agitação de 300 rpm, até a densidade óptica a 600 nm atingir um valor entre 0,5 e 0,6. Arrefeceu-se as células num banho de gelo durante 15 minutos e transferiu-se para tubos de centrífuga de 250 ml previamente arrefecidos. As células foram centrifugadas durante 20 minutos a 4200 rpm à temperatura de 2°C. Após a centrifugação, rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 5 ml de água ultrapura estéril gelada. Adicionou-se 500 ml de água ultrapura estéril gelada, misturou-se bem e voltou-se a centrifugar as células nas condições anteriores. Após a centrifugação, deitou-se fora o sobrenadante de imediato e ressuspendeu-se o *pellet* no líquido residual. Adicionou-se novamente 500 ml de água ultrapura estéril gelada, misturou-se bem e centrifugou-se as células nas mesmas condições. Deitou-se fora o sobrenadante imediatamente e ressuspendeu-se o *pellet* no líquido residual. Adicionou-

se 40 ml de uma solução de glicerol 10% (v/v), misturou-se bem e centrifugou-se num tubo de propileno de 50 ml durante 10 minutos a 4200 rpm à temperatura de 2°C. Estimou-se o volume de *pellet* (geralmente 500 µl de uma cultura de 500 ml) e adicionou-se igual volume de glicerol 10% (v/v) para o ressuspender. Dividiu-se as células em alíquotas de 40 µl em tubos previamente arrefecidos e conservou-se a -80°C. Todas as operações foram executadas em gelo.

### 2.6.2 Electroporação

As células electrocompetentes foram retiradas da arca a -80°C, colocadas imediatamente em gelo e descongeladas cuidadosamente. As cuvetes de electroporação e a câmara branca onde se coloca a cuvette de electroporação também foram colocadas em gelo.

Num tubo de propileno de 1,5 ml misturou-se 40 µl de células electrocompetentes com 1 a 2 µl de DNA plasmídico. Misturou-se cuidadosamente e deixou-se repousar no gelo durante cerca de 1 minuto. Transferiu-se esta mistura para a cuvette de electroporação fria, evitando a formação de bolhas de ar, e agitou-se de modo a que fosse para o fundo da mesma. Secou-se a cuvette cuidadosamente com papel, colocou-se na câmara branca, também previamente arrefecida, e efectuou-se a descarga carregando simultaneamente nos botões *pulse*. Utilizaram-se cuvetes de 0,1 cm (BioRad) e uma descarga de 1,8 KV. Removeu-se a cuvette da câmara e adicionou-se imediatamente 500 µl de meio SOC e ressuspenderam-se cuidadosamente as células. Transferiu-se a suspensão celular para um tubo de propileno de 1,5 ml e lavou-se a cuvette com 500 µl de SOC para transferir as células restantes.

Incubou-se a suspensão celular de 1 ml a 37°C durante 1 hora com uma agitação de 225 rpm e verificou-se a constante de tempo que deve estar compreendida entre 4 e 5 milisegundos.

Após o período de incubação, as células foram espalhadas em placas de meio selectivo LB-amp fazendo as diluições adequadas.

Meio SOC

2% (p/v) Caseína  
1% (p/v) Extracto de levedura  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM Glucose

## 2.7 Isolamento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para o isolamento rápido e em pequena escala de DNA plasmídico de *E. coli* foram utilizados 2 métodos diferentes: o método da fervura (Holmes e Quigley, 1981) e o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). Para a preparação de DNA plasmídico de *E. coli* em grande escala utilizaram-se outros dois métodos: o *Qiagen Plasmid Midi Kit* (QIAGEN) e o *Genopure Plasmid Maxi Kit* (Roche).

A extracção de DNA plasmídico através de kit foi efectuada de acordo com as instruções das marcas, descritas nas respectivas bulas. O método da fervura encontra-se descrito de seguida.

### Método da fervura

As placas LB-amp foram divididas em 8 partes iguais e, em cada uma das partes, repicou-se uma colónia de bactéria. Incubou-se a 37°C durante a noite. No dia seguinte, as células de cada clone foram ressuspensas em 50 µl de tampão STET em tubo de propileno de 1,5 ml. Adicionou-se 4 µl de uma solução de lisozima (10 mg/ml) preparada de fresco e incubou-se 10 minutos em gelo. De seguida, colocou-se o tubo num banho de água a ferver durante exactamente 40 segundos, sendo imediatamente repostos no gelo. Centrifugou-se o lisado bacteriano a 12000 g durante 10 minutos à temperatura ambiente e removeu-se o sedimento de fragmentos bacterianos com a ajuda de um palito estéril. Adicionou-se ao sobrenadante 40 µl de isopropanol frio, misturou-se no vortex e guardou-se o tubo durante 5 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12000 g durante 20 minutos a 4°C para recuperar os ácidos nucleicos. Removeu-se o sobrenadante e colocou-se o tubo em posição invertida sobre uma folha de papel para remover qualquer gota aderida às paredes do tubo. Adicionou-se 50 µl de etanol a 70% (v/v) e centrifugou-se novamente a 12000 g durante 2 minutos a 4°C. Removeu-se o sobrenadante como descrito anteriormente e manteve-se o tubo aberto à temperatura ambiente até o etanol ter evaporado e não ser visível líquido no tubo (2 a 5 minutos).

Ressuspendeu-se o *pellet* em 10-20 µl de tampão TE (2.10) e utilizou-se 3 a 5 µl para digestão enzimática (2.11.1).

Tampão STET

8% (p/v) Sacarose  
5% (p/v) Triton X-100  
50 mM EDTA pH 8,0  
50 mM Tris/HCl pH 8,0  
Esterilizar por filtração,  
armazenar a 4°C

## 2.8 Precipitação de DNA

Adicionou-se à solução de DNA 1/10 de volume de NaOAc 3 M pH 5,2, misturou-se e de seguida adicionou-se 2,0-2,5 volumes de etanol absoluto frio. Misturou-se bem e incubou-se durante 30 minutos a -20°C. Centrifugou-se a 13000 rpm durante 15 minutos e lavou-se o precipitado com 1 ml de etanol frio a 70% (v/v). Centrifugou-se brevemente nas condições anteriores e deixou-se secar o *pellet* ao ar. O *pellet* foi ressuspenso em água ultrapura estéril ou em tampão TE (2.10).

## 2.9 Quantificação de DNA

### 2.9.1 Método espectrofotométrico

A concentração de cada solução de DNA foi determinada a partir da medição da absorvância para o comprimento de onda de 260 nm. A determinação foi realizada em cuvetes de quartzo de 1 cm<sup>3</sup> de volume. A cada 1,0 unidade de A<sub>260nm</sub> da solução de cadeia dupla de DNA fez-se corresponder uma concentração de 50 µg/ml. A pureza da solução de DNA foi determinada através da razão entre a absorvância medida a 260 nm e 280 nm. Preparações de DNA puras apresentam razões na ordem de 1,8; razões abaixo deste valor indicam contaminação com proteínas e acima indicam contaminação com RNA.

### 2.9.2 Método das placas de brometo de etídio

Pequenas quantidades de DNA foram estimadas por comparação da fluorescência emitida sob luz ultravioleta (UV) da amostra de DNA de concentração desconhecida com a emitida pelos padrões de DNA de concentrações conhecidas, em placas de agarose contendo brometo de etídio (BrEt). Colocou-se na placa de agarose 1 µl de amostra de DNA e 1 µl de cada padrão de DNA de fago λ (5, 10, 20, 50, 75, 100 e 250 ng/µl) e incubou-se à temperatura ambiente, no escuro, durante cerca de 15 minutos.

Após o tempo de incubação, e sob luz UV determinou-se a concentração aproximada de DNA por comparação com os padrões de DNA.

Placas de agarose com BrEt

1% (p/v) Agarose  
0,5 µg/ml Brometo de etídio

## 2.10 Armazenamento de DNA

As soluções de DNA foram armazenadas em tampão TE ou em tampão EB a 4°C, ou em água ultrapura estéril a -20°C.

Tampão TE, pH 8,0

10 mM Tris/HCl pH 8,0  
1 mM EDTA

Tampão EB

10 mM Tris/HCl pH 8,5

## 2.11 Modificação enzimática de DNA

### 2.11.1 Hidrólise com enzimas de restrição

A hidrólise de DNA com enzimas de restrição (endonucleases) foi efectuada, normalmente, num volume total de 10 µl. O DNA foi misturado com 1 µl de tampão de reacção adequado 10× concentrado e com 1 unidade de enzima por cada µg de DNA. O volume final foi corrigido com água ultrapura estéril. As reacções de hidrólise decorreram de acordo com as instruções das marcas assim como a inactivação das mesmas.

### 2.11.2 Transformação de extremidades coesivas em extremidades cegas

A 0,1-4 µg de DNA digerido adicionou-se 4 dNTP mix (Fermentas) para uma concentração final de 0,05 mM, 2 µl de tampão de reacção 10× concentrado, 1-5 unidades de Klenow 10 U/µl (Fermentas) e fez-se o volume final a 20 µl com água ultrapura estéril. A mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos e a reacção foi inactivada por incubação a 70°C durante 10 minutos.

### 2.11.3 Desfosforilação de DNA plasmídico

A reacção de desfosforilação foi efectuada com a enzima fosfatase alcalina extraída de camarão (SAP), num volume total de 40 µl. Misturou-se o DNA linearizado

com 5 µl de tampão 10× concentrado e com 1 unidade de SAP (Fermentas) por cada 50 pmol de extremidades 5'. O volume final foi corrigido com água ultrapura estéril antes da adição da enzima. A mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos e inativada a 65°C durante 15 minutos.

#### **2.11.4 Ligação vector-linker**

A reacção de ligação efectuou-se geralmente num volume total de 10-20 µl com uma quantidade molar de DNA de inserção (*linker*) 50× superior à de DNA plasmídico de extremidades cegas desfosforiladas, para um total de 500 ng de DNA. Adicionou-se 1 µl de tampão de reacção 10× concentrado, 1 µl de T4 DNA ligase 1U/µl (Promega) e fez-se o volume final com água ultrapura estéril. A mistura de ligação foi incubada à temperatura ambiente durante 1 hora e de seguida colocada a 4°C para incubação durante a noite. A reacção foi inativada a 70°C durante 10 minutos. Conservou-se a mistura a -20°C e usou-se 2 µl para transformação de bactéria (2.6.2).

#### **2.11.5 Ligação vector-cassete de expressão**

A reacção de ligação efectuou-se geralmente num volume total de 10-20 µl com quantidades equimolares de DNA plasmídico desfosforilado e de inserção, ou com quantidades superiores de DNA de inserção (3×, 5× ou 10×), para um total de 300 ng de DNA. Adicionou-se 1 µl de tampão de reacção 10× concentrado, 1 µl de T4 DNA ligase 1U/µl (Promega) e fez-se o volume final com água ultrapura estéril. A mistura de ligação foi incubada à temperatura ambiente durante 1 hora e de seguida colocada a 4°C para incubação durante a noite. Conservou-se a mistura a -20°C e usou-se 2 µl para transformação de bactéria (2.6.2).

### **2.12 Electroforese de DNA**

Para análise de DNA utilizou-se gel de agarose normalmente a 0,8% (p/v) em tinas de electroforese horizontais. Adicionou-se brometo de etídio à agarose para uma concentração final de 0,5 µg/ml, a partir de uma solução *stock* de 1g/l. A cada amostra adicionou-se 1/6 do volume de solução marca 6× concentrada. As corridas de electroforese realizaram-se a 40-100 volts em tampão TAE (1×), e foram terminadas após a frente do corante azul de bromofenol ter corrido a distância desejada. O gel foi fotografado utilizando luz UV (366 nm) de um transiluminador *Gel Doc 2000* (BioRad).

Tampão TAE (50×)	2 M Tris-base 50 mM EDTA acertar pH 8,0 com ácido acético
0,5 M EDTA, pH 8,0	186,1 g/l Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O NaOH 10 M pH 8,0
Solução marca	50% (v/v) glicerol 0,05% (p/v) azul de bromofenol 0,05% (p/v) azul de xilenocianol

### 2.12.1 Padrões de DNA

Os padrões de DNA utilizados em gel de agarose foram os fragmentos de DNA do fago  $\lambda$  obtidos por digestão com a enzima *HindIII*. Os tamanhos dos fragmentos em pares de bases (pb) estão representados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2: Tamanhos dos fragmentos de DNA de  $\lambda$  *HindIII***

Fragmentos	$\lambda$ <i>HindIII</i> (pb)
1	23130
2	9416
3	6557
4	4361
5	2322
6	2027
7	564
8	125

### 2.12.2 Extração de DNA do gel de agarose

Após corrida de electroforese adequada (2.12), a extração de DNA do gel de agarose foi efectuada utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). O protocolo foi efectuado de acordo com as instruções da marca. No último passo, o DNA foi eluído da coluna com 30  $\mu$ l de tampão EB (2.10) e a quantidade de DNA obtida foi determinada em placas de agarose contendo brometo de etídio (2.9.2).

## 2.13 Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

O método de transformação de *S. cerevisiae* utilizado foi a electroporação em aparelho *Gene Pulse X-cell* (BioRad).

### 2.13.1 Preparação de células electrocompetentes

Dois dias antes da electroporação, inoculou-se uma única colónia de levedura a ser transformada para crescimento durante a noite a 30°C até à saturação.

Um dia antes da electroporação, inoculou-se um matraz de 1 l contendo 250 ml de meio YPD, com quantidade apropriada de cultura saturada e colocou-se a crescer durante a noite a 30°C, 250 rpm até uma densidade óptica de  $1 \times 10^8$  células/ml ( $DO_{600}$  (1:10)  $\approx$  0,3 a 0,35). Colocou-se as células num banho de gelo durante 15 minutos para parar o crescimento e depois centrifugou-se as células a 4000 g, 4°C durante 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante cuidadosamente e colocou-se os tubos de centrífuga com o *pellet* em gelo. Adicionou-se 250 ml de solução desfloculante de NaCl 15 g/l, pH 3,0 e agitou-se no vórtex de forma a desflocular as células. Centrifugou-se durante 10 minutos a 4000 g, 4°C, rejeitou-se o sobrenadante e repetiu-se este passo de desfloculação e centrifugação. Após a centrifugação, adicionou-se 40 ml de água ultrapura estéril e agitou-se no vórtex de forma a ressuspender o *pellet*.

Para aumentar a eficiência de transformação em mais de 5 vezes, adicionou-se 5 ml de TE 10 $\times$ , misturou-se, adicionou-se 5 ml de acetato de lítio, misturou-se e incubou-se durante 45 minutos a 30°C, 85 rpm. Depois adicionou-se 1,25 ml de DTT (ditiotretol) 1 M, misturou-se e incubou-se durante 15 minutos a 30°C, 85 rpm. Adicionou-se água ultrapura estéril até perfazer 250 ml e centrifugou-se as células a 4000 g durante 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação rejeitou-se o sobrenadante. Adicionou-se cerca de 25 ml de água ultrapura estéril gelada e ressuspenderam-se as células no vórtex. Adicionou-se água ultrapura estéril gelada até perfazer 250 ml e centrifugou-se novamente a 4000 g durante 5 minutos a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 12,5-15 ml de sorbitol 1M gelado e estéril. Transferiu-se para um tubo de 50 ml e centrifugou-se as células nas condições referidas anteriormente. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 0,25 ml de sorbitol 1M gelado e estéril. As células foram mantidas no gelo e usadas o mais rapidamente possível.

Tampão TE 10 $\times$

0,1 M Tris/HCl pH 7,5

1 mM EDTA pH 8,0

Acetato de lítio 10 $\times$

1 M acetato de lítio pH 8,0

### 2.13.2 Electroporação

A 50  $\mu$ l de células electrocompetentes, adicionaram-se 10  $\mu$ g de DNA plasmídico integrativo linearizado (3-6  $\mu$ l), misturou-se gentilmente e colocou-se no gelo durante cerca de 5 minutos. Transferiu-se as células com o DNA para a cuvette de electroporação de 0,2 cm (BioRad) fazendo com que descessem para o fundo da mesma e pulsou-se uma vez. Os parâmetros usados na electroporação foram os descritos para *S. cerevisiae*: voltagem de 1,5 volts, resistência de 200 ohms e capacitância de 25  $\mu$ F.

Imediatamente a seguir ao *pulse* adicionou-se à cuvette 1 ml de YPD gelado contendo sorbitol 1 M e transferiu-se o conteúdo da mesma para um tudo de propileno de 1,5 ml. As células foram incubadas de 3 a 16 horas, a 30°C e 85 rpm, antes de serem espalhadas em placas de meio selectivo. As placas foram incubadas a 30°C durante cerca de 5 dias.

### 2.13.3 Selecção de transformantes

Os transformantes cuja marca de selecção é a resistência ao antibiótico G418 (geneticina) foram seleccionados em placas contendo meio YPD com concentrações de G418 de 0,2; 0,5; 0,8; 1,0 e 1,5 g/l, sorbitol 1 M e X-gal 0,04 mg/l.

Os transformantes cuja marca de selecção é a marca *URA3* foram seleccionados em placas contendo meio mínimo glucose, sorbitol 1 M e X-gal 0,04 mg/l.

Os transformantes de interesse, seleccionados aleatoriamente pela cor azul, foram crescidos e mantidos em placas idênticas às de selecção. De seguida foram crescidos em tubos de ensaio de 13×160 mm com 5 ml de meio YPD contendo 20 g/l glucose ou 5 ml meio SSLactose contendo 20 g/l lactose, durante 24 horas a 30°C, 150 rpm. Após o tempo de incubação foram retiradas amostras para quantificação da actividade de  $\beta$ -galactosidase no sobrenadante (2.13.3.1).

#### 2.13.3.1 Determinação da actividade de $\beta$ -galactosidase

A quantificação de  $\beta$ -galactosidase foi efectuada em microplaca (Domingues *et al.* 1997). Colocou-se 180  $\mu$ l de solução de pNPG (p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) nos poços necessários de um microplaca e incubou-se a 65°C durante cerca 4 minutos. Adicionou-se 20  $\mu$ l de amostra, diluída em tampão acetato quando necessário, misturou-se e colocou-se a incubar a 65°C durante 10 minutos. Adicionou-se 100  $\mu$ l de reagente de paragem a cada poço para parar a reacção e misturou-se novamente. A leitura das absorvâncias foi efectuada a 405 nm incluindo um branco de tampão acetato. Para a

conversão em unidades de actividade, construiu-se uma curva de calibração da densidade óptica *versus* concentrações de pNP (p-nitrofenol) conhecidas e convertidas em actividade (U/ml) (Anexo C, Figura C4).

Uma unidade de actividade (U) é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de pNPG por minuto a 65°C.

Solução pNPG	1,7 mM pNPG 0,075 M tampão acetato Armazenar a 4°C
Tampão acetato	22,65 g ácido acético Acertar a pH 4,5 com NaOH 10 N Perfazer a 500 ml com água destilada
Reagente de paragem	1,0 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

### 2.13.3.2 Avaliação da capacidade de floculação

Os tubos de ensaio foram agitados no vortex durante 1 minuto para se verificar a presença de flóculos de células à vista desarmada e ao microscópio óptico composto.

## 2.14 Isolamento de DNA genómico de levedura

As placas YPD foram divididas em 8 partes iguais e, em cada uma das partes, repicou-se um transformante. Incubou-se durante 16 horas a 30°C. A biomassa de cada clone foi recolhida para um tubo de propileno de 1,5 ml que continha 0,5 ml de água ultrapura estéril. Ressuspenderam-se bem as células e centrifugou-se 5 segundos a 13200 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante e agitou-se o restante no vortex. Ressuspenderam-se as células em 200 µl de tampão de lise, adicionaram-se 200 µl de esferas de vidro previamente lavadas com ácido (0,45-0,52 mm) e igual quantidade de uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1 (v/v/v)). Esta mistura foi agitada no vortex, à velocidade máxima, durante 3 minutos. De seguida, adicionou-se 200 µl de tampão TE e agitou-se brevemente no vortex. Centrifugou-se durante 5 minutos a 13200 rpm e transferiu-se a fase aquosa (fase superior) para um novo tubo de propileno de 1,5 ml. Adicionou-se 1 ml de etanol 100% frio e misturou-se por inversão. Centrifugou-se, em seguida, a 13200 rpm durante 3 minutos e rejeitou-se o sobrenadante. O *pellet* foi ressuscitado em 400 µl de tampão TE contendo 10 µg/ml

de RNase A. Deixou-se actuar a enzima, incubando a mistura a 37°C durante cerca de 30 minutos.

No final procedeu-se à precipitação do DNA, adicionando 10 µl de acetato de amónio 4 M e 1 ml de etanol 100% frio, misturando por inversão. Centrifugou-se a mistura durante 3 minutos a 13200 rpm, rejeitou-se o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet* ao ar. O *pellet* foi ressuspendido em 50 µl de tampão TE (2.10).

Tampão de lise

2% (v/v) Triton X-100  
1% (p/v) de SDS  
100 mM de NaCl  
10 mM de Tris/HCl pH 8,0  
1 mM de EDTA pH 8,0

## 2.15 Hibridação Southern

A hibridação Southern teve por base o método *Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I* (Roche), nomeadamente os passos de construção da sonda, hibridação e detecção imunológica.

### 2.15.1 Construção de uma sonda de DNA

Depois de isolada a banda de DNA do gel de agarose (2.12.2), preparou-se 1 µg de DNA num volume total de 16 µl, diluindo em água ultrapura estéril se necessário. Seguidamente desnaturou-se o DNA num banho de água a 100°C durante 10 minutos e colocou-se rapidamente em gelo. Adicionou-se 4 µl de *Dig-High Prime*, misturou-se, centrifugou-se durante 5 segundos e incubou-se a mistura a 37°C durante a noite. Parou-se a reacção aquecendo a 65°C durante 10 minutos e conservou-se a -20°C.

### 2.15.2 Transferência de DNA do gel de agarose para a membrana de nylon e fixação de DNA à membrana

O DNA genómico de levedura foi hidrolisado com enzimas de restrição estratégicas e analisado em gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão TBE (0,5×). Após corrida a 22 Volts durante 18 a 20 horas, para geles de 200 cm<sup>2</sup>, o DNA foi transferido do gel para a membrana de nylon de carga positiva (Roche) por vácuo, utilizando o equipamento *Vacuum Blotter* (BioRad).

Os passos de preparação da transferência foram efectuados de acordo com as instruções do aparelho. A transferência foi efectuada durante 90 minutos a 5 polegadas de mercúrio em tampão 10× SSC.

Após a transferência e sem lavagens prévias, o DNA foi fixado à membrana por exposição desta aos raios UV, utilizando o equipamento *UV Cross Link* (BioRad) no programa *Southern Dry Membrane* (C2), que tem a duração de 50 segundos. Após a fixação, a membrana foi lavada em água ultrapura estéril e usada imediatamente e directamente na hibridização.

TBE (10×)	890 mM Tris 890 mM Ácido bórico 0,5 M EDTA pH 8,0
20× SSC	3 M NaCl 0,3 M Citrato de sódio Acertar a pH 7,0 com HCl concentrado
10× SSC	Diluir 2 vezes 20× SSC
2× SSC	Diluir 10 vezes 20× SSC

### 2.15.3 Hibridação da sonda

Pré-aqueceu-se 15 ml de *Dig Easy Hyb* no tubo de hibridação (Hybritube-20, BRL) à temperatura de hibridação (47°C). Para a sonda *lacA*, esta temperatura foi calculada da seguinte forma:

$$T_{\text{ópt}} = T_m - 20 \text{ a } 25^\circ\text{C} = 49,9 \text{ a } 44,9^\circ\text{C}$$

$$T_m = 49,82 + 0,41 \times (\%G+C) - (600/l), \text{ sendo } l \text{ o número de pares de bases da sonda.}$$

A membrana foi enrolada e colocada no interior do tubo e pré-hibridada durante 30 minutos, numa incubadora orbital a 47°C, 70 rpm.

Desnaturou-se a sonda previamente preparada (cerca de 25 ng por ml de *Dig Easy Hyb*) fervendo durante 5 minutos e rapidamente arrefecendo em gelo. Adicionou-se a sonda desnaturada a *Dig Easy Hyb* (3,5 ml/100 cm<sup>2</sup> membrana), também previamente aquecido à temperatura de hibridação, e misturou-se bem mas sem fazer espuma. Esta solução sonda foi armazenada a -20°C e reutilizada cerca de 5 vezes, sendo desnaturada de fresco a 68°C durante 10 minutos antes de cada uso.

Retirou-se a solução de pré-hibridação e adicionou-se imediatamente a solução sonda à membrana e incubou-se durante 16 horas a 47°C, 70 rpm.

Após a hibridação, a membrana foi lavada duas vezes à temperatura ambiente sob constante agitação durante 5 minutos com a solução 2× SSC + 0,1% (p/v) SDS e depois lavada duas vezes a 68°C sob constante agitação durante 15 minutos com a solução 0,5× SSC + 0,1% (p/v) SDS, previamente aquecida à temperatura de lavagem.

Após as lavagens, usou-se a membrana directamente na detecção ou armazenou-se a membrana seca a 4°C entre duas folhas de papel de filtro *Whatman* 3MM para posterior detecção.

#### 2.15.4 Detecção imunológica

Após hibridação e respectivas lavagens, procedeu-se à detecção imunológica. A membrana foi lavada durante 5 minutos em tampão de lavagem e de seguida incubada durante 30 minutos em 200 ml de solução *blocking*. Depois, foi incubada durante 30 minutos em 40 ml de solução *antibody* e após esta incubação lavou-se a membrana duas vezes durante 15 minutos com 100 ml de tampão de lavagem. Todas as incubações foram levadas a cabo à temperatura ambiente com agitação.

Por último, equilibrou-se a membrana em 40 ml de tampão de detecção e incubou-se durante 16 horas no escuro sem agitação em 20 ml de solução corante. Apesar do precipitado de cor iniciar a sua formação passados alguns minutos a reacção só fica completa passadas 16 horas. A membrana pode ser exposta à luz, por curtos períodos de tempo, apenas para controlar o desenvolvimento de cor.

Quando terminada a reacção de detecção, lavou-se a membrana durante 5 minutos com água ultrapura estéril, deixou-se secar ao ar e registou-se o resultado por digitalização.

Tampão ácido málico	0,1 M Ácido málico 0,15 M NaCl pH 7,5 (20°C)
Tampão de lavagem	0,3% (v/v) Tween 20 em tampão ácido málico
Tampão de detecção	0,1 M Tris/HCl 0,1 M NaCl pH 9,5 (20°C)

---

Solução <i>Blocking</i>	Diluir 10 vezes Solução <i>Blocking</i> 10× em tampão ácido málico
Solução <i>Antibody</i>	Diluir 1:5000 <i>Anti-Digoxigenin-AP</i> em Solução <i>blocking</i>
Solução corante	Adicionar 200 µl de NBT/BCIP a cada 10 ml de tampão de detecção

## 2.16 Estudo da estabilidade dos genes integrados

Efectuaram-se oito culturas sequenciais (com diluições intercalares de 10 vezes) em balões Erlenmeyer de 250 ml contendo 20 ml de meio não selectivo YPD (20 g/l de glucose) com cerca de 10 gerações por cultura, incubados a 30°C, 150 rpm. Da última cultura retiraram-se amostras que foram lavadas e diluídas adequadamente com uma solução de NaCl 15 g/l pH 3,0, espalhadas em placas YPD e incubadas a 30°C. Transferiram-se 50 colónias, escolhidas aleatoriamente, para placas de meio selectivo apropriado contendo X-gal 0,04 mg/ml. As colónias que apresentaram crescimento e cor azul foram contabilizadas. Algumas destas colónias foram crescidas em tubos de ensaio de 13×160 mm com 5 ml de meio YPD contendo 20 g/l glucose ou 5 ml de meio SSLactose contendo 20 g/l lactose, durante 24 horas a 30°C, 150 rpm, para quantificação da actividade de  $\beta$ -galactosidase (2.13.3.1).

## 2.17 Ensaio de fermentação descontínua em balões Erlenmeyer

Utilizaram-se balões Erlenmeyer de 500 ml com 100 ml de meio de cultura, incubados numa incubadora orbital a 30°C, 150 rpm. As amostras de 800 µl recolhidas ao longo da fermentação foram centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos. Quantificou-se a biomassa espectrofotometricamente a partir do sedimento celular (2.17.1), enquanto que o sobrenadante foi sujeito ao doseamento dos açúcares redutores (2.17.2) e à determinação da actividade de  $\beta$ -galactosidase (2.13.3.1). No final da fermentação quantificou-se a biomassa por peso seco (2.17.1).

### 2.17.1 Quantificação de biomassa

A quantificação de biomassa ao longo da fermentação foi estimada por turbidometria num espectrofotómetro para o comprimento de onda de 600 nm. Antes de cada leitura as amostras foram lavadas e diluídas adequadamente com a solução

desfloculante NaCl 15 g/l, pH 3,0. Para a conversão da densidade óptica em concentração de biomassa efectuou-se uma curva de calibração da densidade óptica (600 nm) *versus* biomassa seca (g/l) (Anexo C, Figura C1). Para isso, a partir de uma cultura de células concentrada efectuaram-se várias diluições com densidades ópticas situadas entre 0,1 e 1,0. Filtrou-se, em triplicado, 50 ml da cultura celular inicial, através de filtros de poliamida de 0,45µm de porosidade. Os filtros foram colocados a secar numa estufa a 107°C e arrefecidos em excicador. Por último foram pesados numa balança analítica e a biomassa seca foi determinada por diferença com o peso inicial do filtro seco depois de arrefecido em excicador. Calculou-se a concentração de biomassa (g/l) da suspensão celular inicial e dividiu-se este valor por todos os factores de diluição efectuados a partir da suspensão celular inicial. Deste modo, obtém-se a concentração de biomassa (g/l) correspondente às várias densidades ópticas obtidas a partir das várias diluições efectuadas.

A quantificação de biomassa no final da fermentação foi efectuada por peso seco. Para isso filtrou-se 10 ml de cultura em filtros de poliamida 0,45µm previamente secos a 107°C, arrefecidos em excicador e pesados. As membranas foram secas a 107°C, arrefecidas em excicador e pesadas novamente. A diferença de pesos a dividir pelo volume de amostra permite determinar a concentração de biomassa seca (g/l).

### **2.17.2 Doseamento de açúcares redutores**

Para o doseamento dos açúcares redutores foi utilizado o método DNS. A cada amostra de 500 µl, diluída com água destilada quando necessário, foram adicionados 500 µl de reagente DNS. Agitou-se no vortex e colocou-se num banho a 100°C durante 5 minutos. Depois de arrefecidas, adicionou-se 5 ml de água destilada e leu-se a densidade óptica a 540 nm. Para a conversão da densidade óptica em concentração de açúcares redutores, elaborou-se uma curva de calibração que relaciona estas duas grandezas tendo por base a leitura da densidade óptica a 540 nm de soluções de concentrações de açúcar conhecidas depois de submetidas ao método DNS (Anexo C, Figura C2 e Figura C3).

Reagente DNS

10 g/l ácido 3,5-dinitrosalicílico  
0,4 N NaOH  
300 g/l tartarato de sódio e potássio

### **3. Resultados e Discussão**

---

### 3.1 Construção dos vectores integrativos pCO1 e pCO2 para integração do gene que codifica para a $\beta$ -galactosidase de *A. niger* no genoma de *S. cerevisiae*

Para a integração do gene que codifica para a enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. niger* nas sequências  $\delta$  do genoma da levedura *S. cerevisiae* foram construídos os vectores integrativos pCO1 e pCO2 resultantes da ligação do gene *lacA*, ladeado pelo promotor e terminador *ADH1*, aos vectores p $\delta$ -neo e p $\delta$ -UB respectivamente. Esta cassette foi retirada do vector pVK1.1 (Kumar *et al.* 1992) com o intuito de dar continuidade aos trabalhos de Domingues (2001), Domingues *et al.* (2002) e Velho (2003).

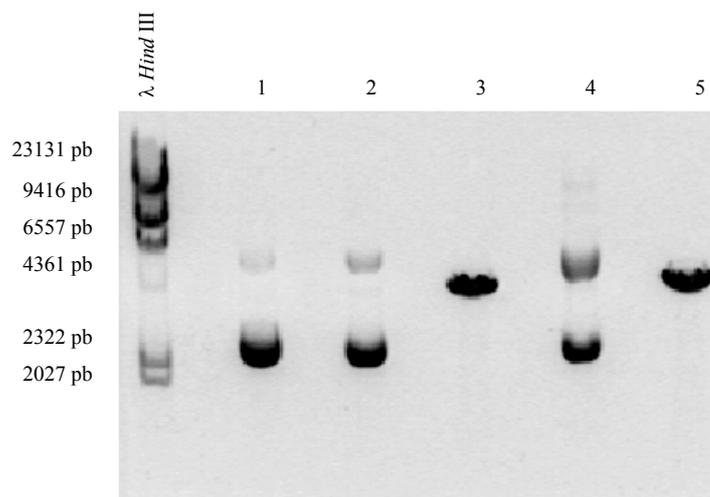
#### 3.1.1 Estratégia de construção do vector integrativo pCO1

O local de restrição único *AccI*, situado dentro da sequência  $\delta$  a 1952 pb da origem, é o local de linearização do vector p $\delta$ -neo para a sua introdução no genoma da levedura *S. cerevisiae*. Mas a cassette de expressão contendo o gene *lacA* contém vários locais de restrição *AccI* pelo que a digestão com esta enzima iria fragmentar o vector pCO1 e não linearizá-lo. Foi então necessário alterar este local de restrição, no vector original, para um local de restrição inexistente nele mesmo e simultaneamente inexistente na cassette de expressão. De entre as várias hipóteses optou-se pelo local de restrição *BglII* e para esse efeito adquiriu-se um *linker* fosforilado *BglII* (12 pb) da *New England BioLabs* (Anexo A, Figura A2).

Para isso, 4  $\mu$ g do vector p $\delta$ -neo foram digeridas com a enzima *AccI* (2.11.1), e como esta enzima origina extremidades coesivas, transformou-se estas extremidades em extremidades cegas (2.11.2) para posterior ligação ao *linker BglII*, igualmente de extremidades cegas. De seguida desfosforilou-se as extremidades do vector digerido para impedir a sua recirculação (2.11.3). Esta enzima remove o fósforo da extremidade 5' das moléculas do vector p $\delta$ -neo, evitando que estas se unam à extremidade 3'. Por outro lado, a extremidade 3' do vector tratado pode ligar-se eficientemente à extremidade 5' (grupo fosfato) das moléculas do *linker*. Após a reacção de ligação (2.11.4), utilizou-se 2  $\mu$ l de mistura de ligação para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  (2.6) e algumas das colónias resultantes foram crescidas em placas LB-amp para extracção rápida de DNA plasmídico (2.7). O DNA dos clones seleccionados foi digerido com as enzimas de restrição *AccI* e *BglII* (2.11.1) para confirmar a modificação em gel de electroforese (2.12). Um dos clones que apresentou a modificação foi utilizado para a extracção de DNA plasmídico em quantidade (2.7) que foi reservado.

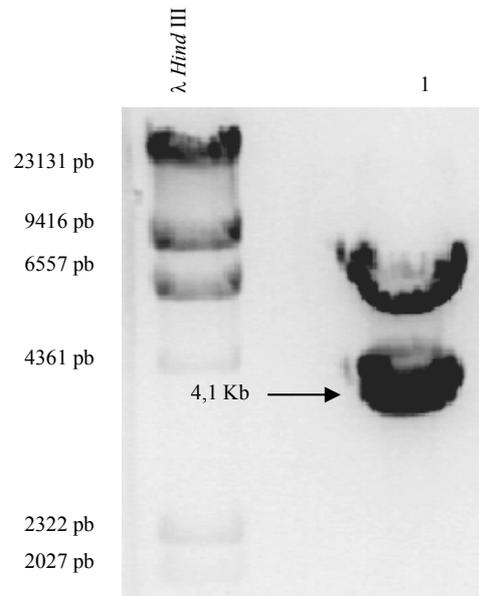
Para a clonagem da cassette de expressão contendo o gene *lacA* no vector p $\delta$ -neo optou-se por transformar um local de restrição único neste vector em local de restrição *SphI* uma vez que esta cassette é extraída do vector pVK1.1 unicamente com esta enzima. Deste modo pretende-se que a ligação seja facilitada relativamente a uma possível ligação com extremidades cegas, que era a segunda alternativa. O local escolhido para essa transformação, de entre as várias hipóteses, foi o local único de restrição *SacI*, situado a 2283 pb da origem, e para esse efeito adquiriu-se um *linker* fosforilado *SphI* (8 pb) da *New England BioLabs* (Anexo A, Figura A3). Foi ainda verificado previamente que a enzima *SphI* não corta o vector p $\delta$ -neo. O processo de alteração deste local foi igual ao descrito anteriormente partindo do vector p $\delta$ -neo já com o local de restrição *AccI* alterado para local de restrição *BglII*.

O vector p $\delta$ -neo modificado foi digerido com as enzimas *BglII*, *SphI*, *AccI* e *SacI* (2.11.1) e analisado em gel de agarose (2.12). A digestão com as enzimas *BglII* e *SphI* permite a sua linearização, originando uma banda do seu tamanho (4,5 Kb), enquanto que a digestão com as enzimas *AccI* e *SacI* origina o padrão de bandas correspondente ao vector não digerido (Figura 3.1). Após se ter confirmado as alterações pretendidas, efectuou-se cultura permanente da estirpe *E. coli* DH5 $\alpha$ /p $\delta$ -neo modificado (2.5) e extraiu-se DNA plasmídico em quantidade (2.7).



**Figura 3.1: Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das digestões efectuadas ao vector p $\delta$ -neo modificado.** Legenda:  $\lambda$  *HindIII*- padrão de pesos moleculares de DNA  $\lambda$  digerido com *HindIII*; 1- p $\delta$ -neo modificado sem digestão; 2- p $\delta$ -neo modificado digerido com *AccI*; 3- p $\delta$ -neo modificado digerido com *BglII*; 4- p $\delta$ -neo modificado digerido com *SacI*; 5- p $\delta$ -neo modificado digerido com *SphI*.

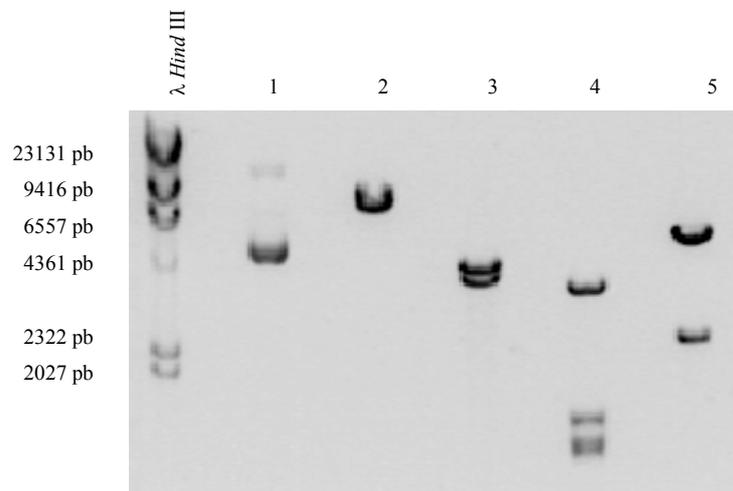
A cassette de expressão contendo o gene *lacA*, sob acção do promotor e terminador *ADHI*, foi extraída do vector pVK1.1 (11,06 Kb) por digestão com a enzima *SphI* (2.11.1), isolada a partir do gel de agarose (2.12.2), tal como se pode observar na Figura 3.2, e quantificada em placas de brometo de etídio (2.9.2). Esta cassette apresenta um tamanho de 4,1 Kb (Kumar *et al.* 1992) em que, segundo Domingues (2001), o gene *lacA* tem 3187 pb, o terminador *ADHI* aproximadamente 248 pb e o promotor *ADHI* 665 pb.



**Figura 3.2:** Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) referente à extração da cassette de expressão que contém o gene *lacA* do vector pVK1.1. Legenda:  $\lambda$  *HindIII*- padrão de pesos moleculares de DNA  $\lambda$  digerido com *HindIII*; 1- pVK1.1 digerido com *SphI*.

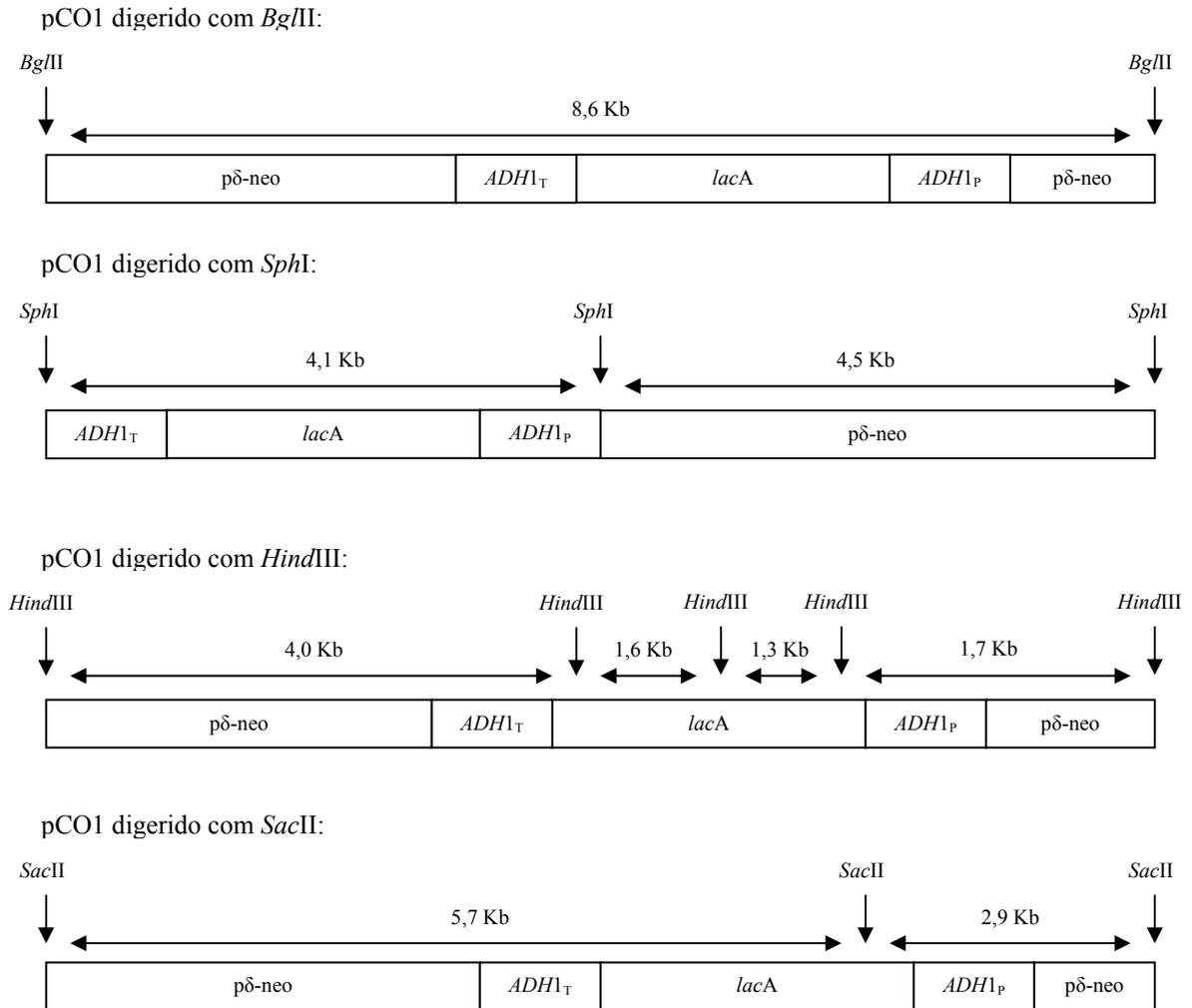
Para ligação do p $\delta$ -neo modificado à cassette de expressão que contém o gene *lacA*, previamente extraída do gel de agarose, 4  $\mu$ g deste vector foram digeridas com a enzima *SphI* (2.11.1), desfosforiladas (2.11.3), extraídas do gel de agarose (2.12.2) e quantificadas em placas de brometo de etídio (2.9.2). Como as extremidades geradas são complementares às extremidades da referida cassette de expressão a reacção de ligação não requereu mais nenhum tratamento prévio adicional. Após reacção de ligação (2.11.5), transformou-se *E. coli* DH5 $\alpha$  (2.6) com 2  $\mu$ l da mistura de ligação e algumas das colónias resultantes foram crescidas em placas LB-amp para extração rápida de DNA plasmídico (2.7). O DNA dos clones seleccionados foi corrido em gel de agarose (2.12) lado a lado com o vector p $\delta$ -neo modificado não digerido, para comparação dos padrões de bandas. Os clones cujos padrões de bandas apresentavam

maior tamanho do que os padrões obtidos para o vector p $\delta$ -neo modificado indicavam ter a ligação. Para confirmar a ligação, seleccionou-se um desses clones para serem efectuadas algumas digestões com diferentes enzimas cujos padrões a obter em gel de agarose eram conhecidos (Figura 3.3).



**Figura 3.3: Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das digestões efectuadas ao vector pCO1.** Legenda:  $\lambda$  HindIII- padrão de pesos moleculares de DNA  $\lambda$  digerido com HindIII; 1- pCO1 sem digestão; 2- pCO1 digerido com BglII; 3- pCO1 digerido com SphI; 4- pCO1 digerido com HindIII; 5- pCO1 digerido com SacII.

Na Figura 3.4 encontram-se esquematizados os locais de restrição gerados pelas referidas enzimas de restrição. A digestão com BglII corta o vector pCO1 unicamente uma vez na sequência  $\delta$  originando a sua linearização e dando origem a uma banda de 8,6 Kb (4,1 Kb correspondentes à cassette que contém o gene *lacA* mais 4,5 Kb correspondentes ao vector p $\delta$ -neo modificado). A digestão com SphI separa a cassette que contém o gene *lacA*, ladeado pelo promotor e terminador *ADH1*, do vector p $\delta$ -neo modificado dando origem a 2 bandas, uma de 4,1 Kb e outra de 4,5 Kb, respectivamente. A enzima HindIII corta o vector p $\delta$ -neo num único local (Anexo B, Tabela B1) e corta o gene *lacA* em três locais diferentes (Anexo B, Tabela B3), o que totaliza 4 cortes aos quais correspondem 4 bandas: 4,0 Kb, 1,6 Kb, 1,3 Kb e 1,7 Kb. A enzima SacII corta o vector p $\delta$ -neo num único local (Anexo B, Tabela B1) e corta o gene *lacA* igualmente num único local (Anexo B, Tabela B3), o que origina duas bandas, uma de 5,7 Kb e outra de 2,9 Kb.



**Figura 3.4:** Esquema representativo dos locais de restrição do vetor pCO1 para as digestões efectuadas com as enzimas *Bgl*III, *Sph*I, *Hind*III e *Sac*II (elaborado a partir do Anexo B).

A utilização das enzimas *Hind*III e *Sac*II permitiu também verificar a orientação de clonagem da cassette de expressão.

Confirmada a ligação, denominou-se o vector construído por pCO1. Por último, efectuou-se cultura permanente da estirpe *E. coli* DH5 $\alpha$ /pCO1 (2.5) e extraiu-se DNA plasmídico em quantidade (2.7).

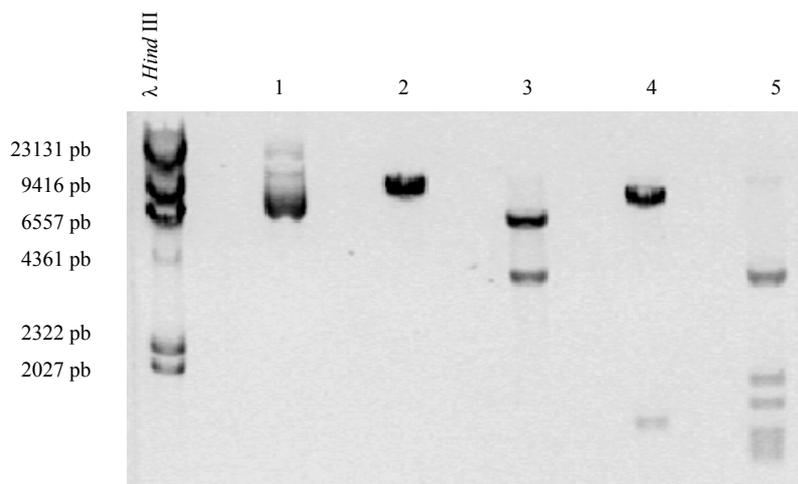
### 3.1.2 Estratégia de construção do vector integrativo pCO2

O local de restrição único *Xho*I, situado dentro da sequência  $\delta$  a 901 pb da origem, é o local de linearização do plasmideo p $\delta$ -UB para a sua introdução no genoma da levedura *S. cerevisiae*. Contrariamente ao que sucedeu na construção anterior, esta

enzima não corta a cassette de expressão contendo o gene *lacA* pelo que não foi necessário alterar este local de restrição.

A estratégia de ligação da cassette de expressão que contém o gene *lacA* ao vector p $\delta$ -UB foi igual à descrita para a ligação do vector p $\delta$ -neo a esta mesma cassette, incluindo o local de ligação do *linker SphI* (local *SacI* localizado a 5444 pb da origem). Foi ainda verificado previamente que a enzima *SphI* não corta o vector p $\delta$ -UB. A única divergência foi a utilização da estirpe hospedeira *E. coli* XL1-Blue uma vez que se verificou que a estirpe *E. coli* DH5 $\alpha$  promovia a alteração do vector.

Tal como descrito anteriormente, para confirmar a ligação, seleccionou-se um clone que, por comparação de padrões de bandas, indicava a existência de ligação para se efectuar algumas digestões com diferentes enzimas cujos padrões a obter em gel de agarose eram conhecidos (Figura 3.5).

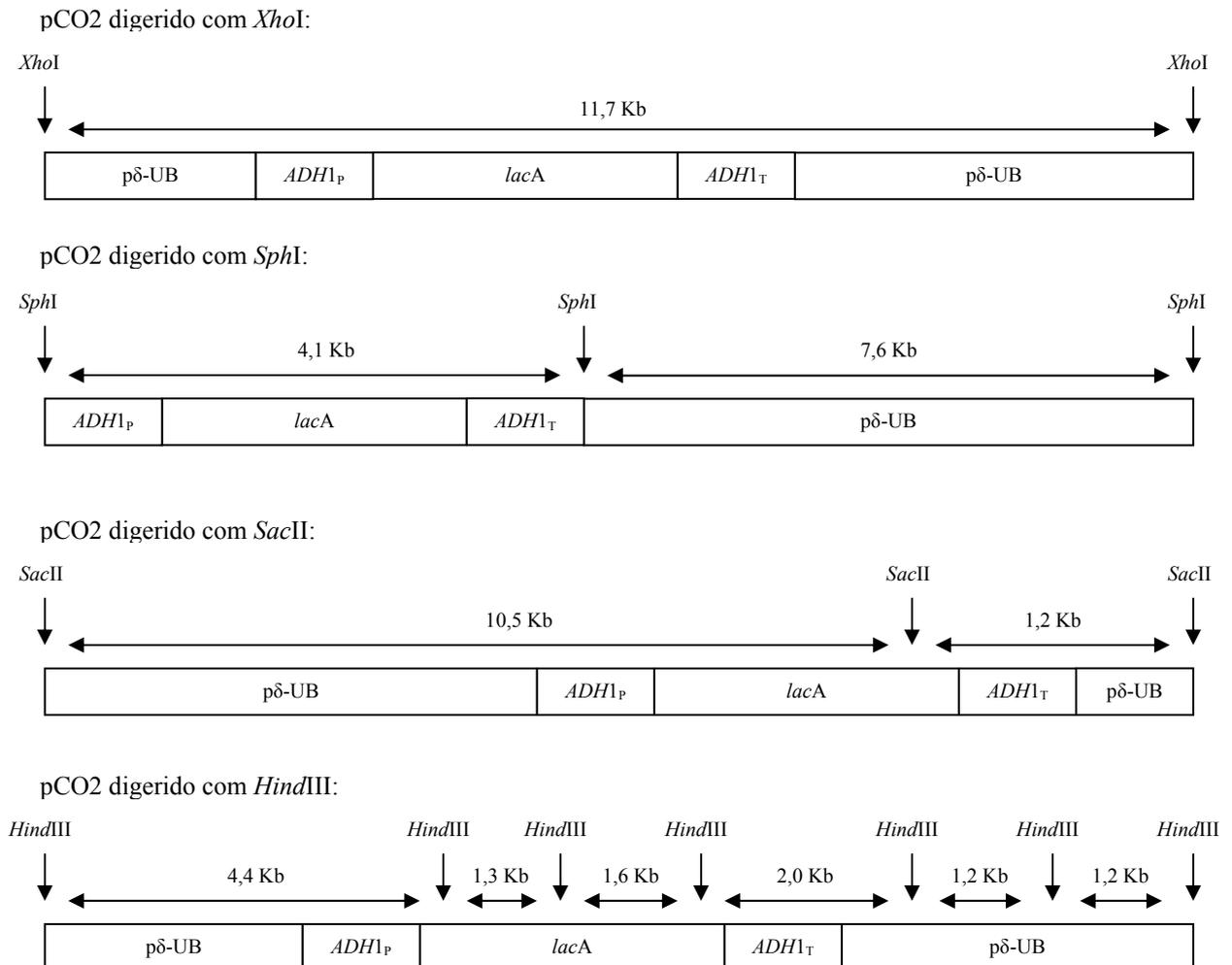


**Figura 3.5: Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das digestões efectuadas ao vector pCO2.**

Legenda:  $\lambda$  *HindIII*- padrão de pesos moleculares de DNA  $\lambda$  digerido com *HindIII*; 1- pCO2 sem digestão; 2- pCO2 digerido com *XhoI*; 3- pCO2 digerido com *SphI*; 4- pCO2 digerido com *SacII*; 5- pCO2 digerido com *HindIII*.

Na Figura 3.6 encontram-se esquematizados os locais de restrição gerados pelas referidas enzimas. A digestão com *XhoI* corta o vector pCO2 unicamente uma vez na sequência  $\delta$  originando a sua linearização e dando origem a uma banda de 11,7 Kb (4,1 Kb correspondentes à cassette que contém o gene *lacA* mais 7,6 Kb correspondentes ao vector p $\delta$ -UB modificado). A digestão com *SphI* separa a cassette de expressão que contém o gene *lacA* do vector p $\delta$ -UB modificado dando origem a 2 bandas, uma de 4,1

Kb e outra de 7,6 Kb, respectivamente. A enzima *Hind*III corta o vector p $\delta$ -UB em três locais (Anexo B, Tabela B1) e corta o gene *lacA* também em três locais diferentes (Anexo B, Tabela B3), o que totaliza 6 cortes aos quais correspondem 6 bandas: 4,4 Kb, 1,3 Kb, 1,6 Kb, 2,0 Kb, 1,2 Kb e 1,2 Kb. A enzima *Sac*II corta o vector p $\delta$ -UB num único local (Anexo B, Tabela B2) e corta o gene *lacA* igualmente num único local (Anexo B, Tabela B3), o que origina duas bandas, uma de 10,5 Kb e outra de 1,2 Kb.



**Figura 3.6:** Esquema representativo dos locais de restrição do vector pCO2 para as digestões efectuadas com as enzimas *Xho*I, *Sph*I, *Sac*II e *Hind*III (elaborado a partir do Anexo B).

A utilização das enzimas *Hind*III e *Sac*II permitiu também verificar a orientação de clonagem da cassette de expressão. Confirmada a ligação, denominou-se o vector construído por pCO2. Finalmente, efectuou-se cultura permanente da estirpe *E. coli* XL1-Blue/pCO2 (2.5) e extraiu-se DNA plasmídico em quantidade (2.7).

### 3.2 Construção de estirpes flocculantes de *S. cerevisiae* produtoras de $\beta$ -galactosidase de *A. niger*

Foram experimentados dois sistemas distintos de integração que utilizam as sequências  $\delta$  do genoma da levedura *S. cerevisiae* como sítios alvos de integração do gene que codifica para a  $\beta$ -galactosidase de *A. niger* (*lacA*). O sistema baseado no vector p $\delta$ -neo (pCO1) utiliza como marca de selecção a resistência ao antibiótico G418, conferida pelo gene bacteriano *neo<sup>r</sup>*, enquanto que o sistema baseado no vector p $\delta$ -UB (pCO2) utiliza como marca de selecção auxotrófica o gene *URA3*. No primeiro sistema é possível variar a concentração de antibiótico na selecção de transformantes, o que pode permitir seleccionar transformantes com elevado número de integrações, enquanto que no segundo sistema é possível efectuar várias rondas de transformação, o que permite a integração sequencial de genes utilizando sempre a mesma marca de selecção uma vez que o gene *URA3* vai sendo eliminado por recombinação homóloga entre as sequências que o flanqueiam (*hisG*).

Estes vectores não têm origem de replicação em levedura pelo que a respectiva marca de selecção só é expressa se o vector ou o gene marcador for integrado no genoma da levedura.

#### 3.2.1 Transformação de *S. cerevisiae* NCYC869-wt com o vector pCO1

##### 3.2.1.1 Selecção de transformantes

A estirpe utilizada para transformação com o vector pCO1 foi a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-wt que não apresenta resistência ao antibiótico G418 (verificado experimentalmente).

O método de transformação de levedura utilizado foi a electroporação (2.13) com 10  $\mu$ g de DNA plasmídico linearizado na sequência  $\delta$  com a enzima *Bgl*III. A eficiência de transformação por integração plasmídica é aumentada em uma a duas ordens de grandeza pela linearização do vector na região homóloga (Wang *et al.* 1996).

A electroporação foi o método escolhido para transformação de levedura uma vez que Cho *et al.* (1999) haviam obtido elevados números de cópias integradas (valor máximo de 44) utilizando este método de transformação e um sistema de integração baseado no vector p $\delta$ -neo. As tentativas de obter transformantes usando o protocolo descrito por estes autores não foram bem sucedidas, apesar dos vários pontos em comum tais como o sistema de integração, a quantidade de DNA, o aparelho de

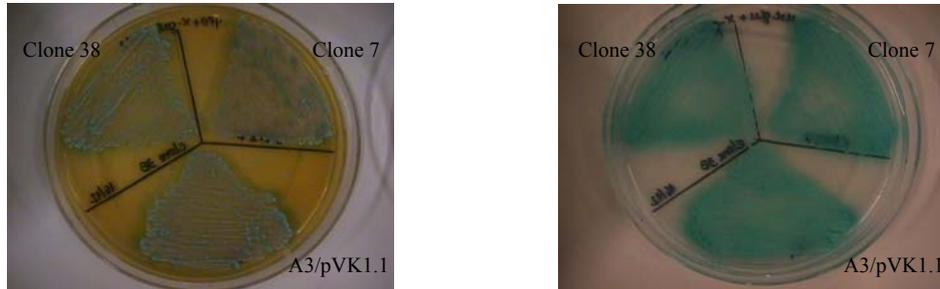
electroporação e o meio selectivo. As constantes de electroporação foram muito baixas (inferiores a 2 milisegundos), tais como as obtidas por estes autores, quando o recomendado pelo fabricante do aparelho é entre 4,0 e 5,0 milisegundos.

Optou-se por experimentar o protocolo de electroporação baseado no manual do próprio aparelho de electroporação, o qual foi imediatamente bem sucedido e com constantes de tempo de electroporação acima de 4,0 milisegundos. Os transformantes foram seleccionados em placas de meio YPD com diferentes concentrações de G418, sorbitol 1 M e X-gal 0,04 mg/ml. Foram testadas as concentrações de antibiótico de 0,2, 0,5, 0,8, 1,0 e 1,5 g/l e verificou-se que o número de transformantes, isto é, a eficiência de transformação, diminuía com o aumento da concentração de antibiótico, tal como verificado por Cho *et al.* (1999). Verificou-se ainda que o tempo de incubação das células após choque eléctrico em meio líquido não selectivo YPD, contendo sorbitol como protector osmótico, é um factor determinante na recuperação de transformantes, o que não foi levado em conta por estes autores. Após incubação durante a noite o número de transformantes foi cerca de 3 vezes superior ao número obtido, em placas selectivas contendo a mesma concentração de antibiótico, após uma incubação de apenas 3 a 5 horas. O número de transformantes obtidos por Cho *et al.*, para todas as concentrações de antibiótico experimentadas, é inferior às obtidas neste trabalho, inclusive, não obtiveram qualquer transformante para a concentração de G418 de 1,0 g/l.

As placas selectivas permitiram não só seleccionar os transformantes que expressavam o gene *lacA* como também observar diferentes níveis de expressão devido à presença de X-gal nas mesmas, traduzida em intensidade de cor azul.

Os transformantes começaram a crescer após cerca de 2 dias de incubação (ainda brancos), tendo-se prolongando a incubação durante mais 3 dias para permitir o desenvolvimento destas e das últimas colónias a surgir. Foram obtidas colónias com diferentes tamanhos e com diferentes tonalidades de azul de difícil distinção dada a cor escura do meio YPD. Também se obtiveram algumas (poucas) colónias brancas, que indicam a perda (ou mutação) do gene *lacA* e a manutenção da marca de selecção, que não foram estudadas. Para cada concentração de G418, foram seleccionados alguns clones, preferencialmente pela maior intensidade da cor azul, para serem repicados em placas idênticas às de selecção. Após crescimento, estes clones foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio SSLactose ou meio YPD para determinação da actividade de  $\beta$ -galactosidase (2.13.3) em condições definidas (5 ml de meio e incubação a 30°C, 150 rpm, durante 24 horas), ensaios denominados, daqui em diante, de ensaios padrão.

Independentemente da concentração de antibiótico usada, foram obtidos diferentes níveis de produção de enzima e alguns clones apresentaram níveis de produção equivalentes aos obtidos com a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869–A3/pVK1.1.



**Figura 3.7:** Resposta fenotípica de dois dos clones que apresentaram maior actividade enzimática em ensaios padrão de  $\beta$ -galactosidase: o clone número 38 seleccionado em placas YPD com 0,2 g/l de G418 e o clone número 7 seleccionado em placas YPD com 1,5 g/l de G418, comparação com a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869–A3/pVK1.1. À esquerda, crescimento em placas de meio YPD com X-gal e à direita crescimento em placas de meio mínimo com X-gal.

Os clones que revelaram maior interesse, dada a proximidade dos valores de actividade de  $\beta$ -galactosidase destes com a estirpe baseada no vector episomal, foram: o clone número 38 seleccionado em placas YPD com 0,2 g/l de G418; o clone número 52 seleccionado em placas YPD com 0,5 g/l de G418; o clone número 7 e o clone número 9 seleccionados em placas YPD com 1,5 g/l de G418 (Tabela 3.1). A biomassa final, determinada por peso seco, foi semelhante para todos os clones.

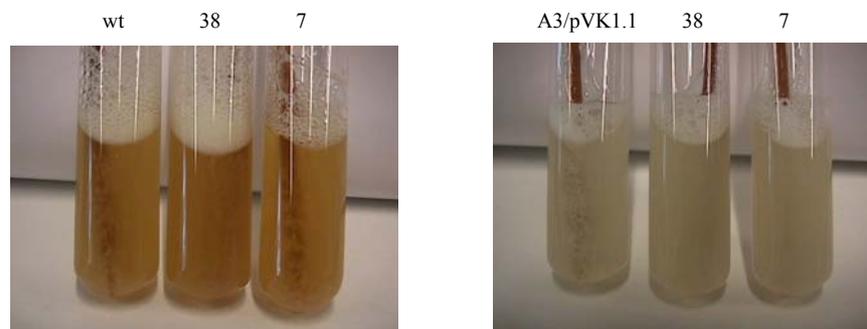
Estes e outros clones que susceptibilizaram maior interesse foram caracterizados geneticamente por hibridação Southern (3.2.1.4).

**Tabela 3.1:** Valores médios máximos obtidos em ensaios padrão de  $\beta$ -galactosidase (valores de actividade de  $\beta$ -galactosidase  $\pm$  intervalo com 95% de confiança), respectivos clones e placas de selecção, comparação com a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869–A3/pVK1.1

Estirpe/Clone	Placas de selecção	Actividade de $\beta$ -galactosidase (U/ml)	
		Meio YPD	Meio SSlactose
<i>S. cerevisiae</i> NCYC869–A3/pVK1.1	Meio mínimo+X-gal	212 $\pm$ 18	95 $\pm$ 5
38	YPD + 0,2 g/l G418 + X-gal	244 $\pm$ 20	71 $\pm$ 3
52	YPD + 0,5 g/l G418 + X-gal	214 $\pm$ 45	70 $\pm$ 3
7	YPD + 1,5 g/l G418 + X-gal	240 $\pm$ 45	79 $\pm$ 3
9	YPD + 1,5 g/l G418 + X-gal	218 $\pm$ 19	90 $\pm$ 5

### 3.2.1.2 Avaliação da capacidade de floculação

De um modo geral, a floculação das estirpes resultantes foi ligeiramente afectada em relação à estirpe original. Comparando o nível de floculação das estirpes obtidas com a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869–A3/pVK1.1, verifica-se que o nível de floculação destas é inferior, sendo caracterizado por agregados celulares de menor tamanho e por células não floculadas. Estas diferenças são ainda mais notórias em meio SSLactose (Figura 3.8). Após cerca de 10 segundos de sedimentação, a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869–A3/pVK1.1 sedimenta totalmente ficando o meio de cultura completamente límpido, enquanto que as novas estirpes apresentam células em suspensão que conferem ao meio um aspecto turvo. As estirpes construídas variam na capacidade de floculação, por exemplo, o clone 7 é mais floculante do que o clone 38 (Figura 3.8).



**Figura 3.8:** Fotografias após ensaios padrão de  $\beta$ -galactosidase dos tubos de ensaio referentes aos clones número 38, seleccionado em placas YPD com 0,2 g/l de G418, e número 7, seleccionado em placas YPD com 1,5 g/l de G418. À esquerda, crescimento em meio YPD e comparação com *S. cerevisiae* NCYC869-wt e à direita em meio SSLactose e comparação com *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1.

É de referir que, o método de transformação utilizado neste trabalho foi a electroporação, enquanto que o método de transformação utilizado na obtenção da estirpe *S. cerevisiae* NCYC869–A3/pVK1.1 foi o acetato de lítio. Venâncio *et al.* (1999) já tinham verificado anteriormente que a capacidade de floculação da estirpe floculante *S. cerevisiae* NCYC869–A3 não é afectada pela inserção do plasmídeo pYAC4, utilizando o método do acetato de lítio. No entanto, não existem dados disponíveis sobre a interferência do método de electroporação na capacidade de floculação de leveduras. Outro factor a ter em conta são as condições ambientais a que estiveram sujeitas as novas estirpes. Estes aspectos ambientais afectam directamente a

floculação e incluem a composição química do meio de cultura, nomeadamente, o conteúdo em açúcar e sal, o pH, a temperatura, o arejamento e a agitação (Domingues *et al.* 2000c). Ainda, as novas estirpes obtidas resultaram da introdução de DNA no genoma da levedura, embora seja muito pouco provável que as inserções tenham afectado o gene da flocculação (*FLO1*), pelo menos directamente.

### 3.2.1.3 Ensaio de estabilidade

Os clones de interesse foram submetidos a ensaios de estabilidade em meio de cultura líquido não selectivo YPD, durante cerca de 80 gerações, para avaliar a estabilidade dos genes integrados (2.16). Verificou-se que todas as 50 colónias, provenientes da oitava cultura sequencial, repicadas em meio YPD selectivo, contendo a concentração de G418 adequada e X-gal, apresentaram capacidade de crescimento e exibiram cor azul (Figura 3.9). Isto significa que as células mantiveram integrado, pelo menos, o número mínimo de genes *neo<sup>r</sup>* necessários ao crescimento e, pelo menos, uma cópia do gene *lacA* para expressão da actividade de  $\beta$ -galactosidase. Para determinar com maior precisão a estabilidade genética das integrações com o tempo de cultura, a variação do número de cópias dos genes integrados, assim como eventuais rearranjos genéticos, é necessário fazer uma análise de Southern, uma vez que a resistência ao antibiótico G418 não significa a manutenção do mesmo número de cópias de genes integrados inicialmente. Por isso mesmo, 3 colónias foram retiradas das placas de estabilidade dos clones número 38 e número 7 para serem analisadas por hibridação Southern (3.2.1.4). Simultaneamente, estes e os outros clones de interesse foram repicados sucessivamente em placas YPD (6 repicagens quinzenais), para serem também analisados em simultâneo.



**Figura 3.9:** Placa de meio YPD com 1,5 g/l de G418 e X-gal obtida após ensaio de estabilidade efectuado ao clone número 7 (seleccionado anteriormente em placas idênticas).

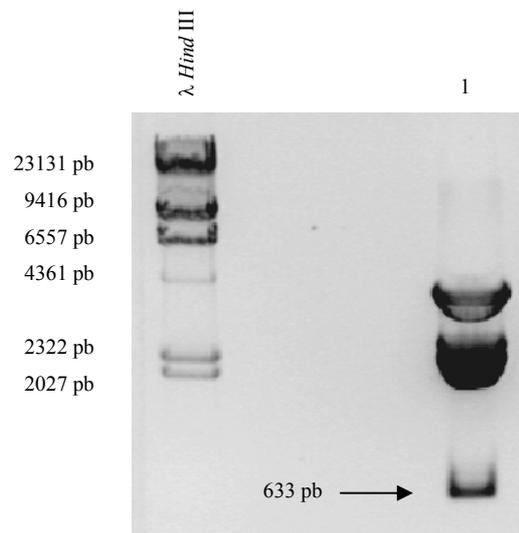
Destas 50 colónias, 1/3 delas foram sujeitas a ensaios padrão de  $\beta$ -galactosidase para comparação do nível de produção desta enzima com o nível obtido com a estirpe inicial respectiva. Todas elas exibiram valores de actividade de  $\beta$ -galactosidase semelhante à obtida com a estirpe inicial o que é um bom indicador da manutenção de todos os genes *lacA* integrados inicialmente.

#### 3.2.1.4 Caracterização genética das inserções por hibridação Southern

Os clones de interesse foram caracterizados geneticamente por hibridação Southern para confirmar a integração do vector pCO1 no genoma da levedura *S. cerevisiae* NCYC869-wt e, simultaneamente, para determinar os locais de integração e o número de cópias integradas.

O DNA genómico dos clones em estudo depois de isolado (2.14) foi analisado em gel de electroforese (2.12) para confirmar a sua integridade uma vez que se estivesse fragmentado poderia interferir com a interpretação dos resultados obtidos por Southern.

A sonda de DNA utilizada para detectar o gene *lacA* no genoma da levedura, contido no vector pCO1, foi um fragmento de 633 pb retirado deste mesmo gene (Anexo A1, Figura A5) por digestão do vector pVK1.1 com a enzima de restrição *EcoRI* e extracção em gel de agarose (Figura 3.10).

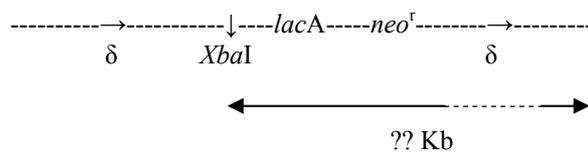


**Figura 3.10:** Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) da digestão do vector pVK1.1 com a enzima *EcoRI* para construção da sonda *lacA*. Legenda:  $\lambda$  *Hind*III- padrão de pesos moleculares de DNA  $\lambda$  digerido com *Hind*III; 1- pVK1.1 digerido com *EcoRI*.

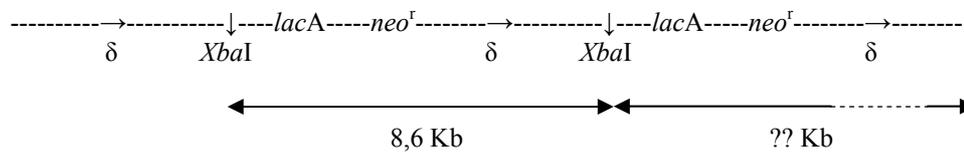
Após a verificação da integridade do DNA genómico dos clones seleccionados, 5, 2,5 ou 1,5 µg de DNA genómico de cada clone foi digerido com a enzima *XbaI* e depois analisados por Southern (2.15).

A enzima *XbaI* corta o vector pCO1 uma única vez fora do gene *lacA*, mais precisamente a 2255 pb da origem. Para cada local de integração único, a hibridação da sonda *lacA* com o gene *lacA* contido no vector pCO1 vai originar uma única banda de tamanho desconhecido, que depende da sua localização, e para inserções seguidas (*tandem*) vai originar igualmente uma banda de tamanho desconhecido e uma banda do tamanho exactamente igual ao do vector pCO1 (8,6 Kb) (Figura 3.11). A intensidade desta banda é directamente proporcional ao número de cópias sequenciais do vector integradas (menos uma), designadas por cópias *tandem*.

**A:**



**B:**



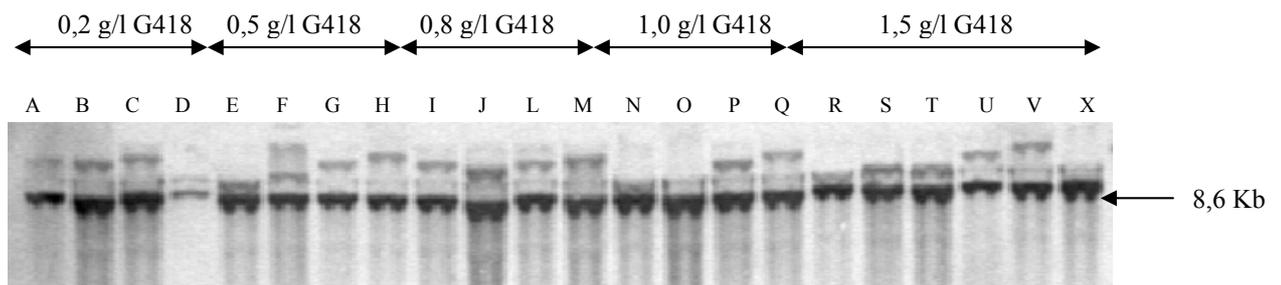
**Figura 3.11: Esquema representativo de possíveis padrões de integração do vector pCO1 no genoma da levedura.** Legenda: A- Integração de uma única cópia; B- Integração de duas cópias seguidas.

Analisando a primeira membrana obtida (Figura 3.12), pode-se observar, tipicamente, apenas um ou dois locais de integração com cópias *tandem*, do mesmo modo como referido na literatura. Nitidamente, o clone da pista F apresenta dois locais de integração, com integrações *tandem*.

Como já foi referido, a digestão com a enzima *XbaI* corta as sequências seguidas (*tandem*) em fragmentos de tamanho exactamente igual ao do vector pCO1 e aparecem numa única banda do seu tamanho (8,6 Kb), que são as bandas mais escuras. Cada banda mais clara e de maior tamanho corresponde ao fragmento de DNA que contém a sequência *lacA* no final das cópias *tandem*. O número de bandas mais claras que, neste

caso, apresentam pesos moleculares maiores do que o vector integrado, indica o número de sítios de integração.

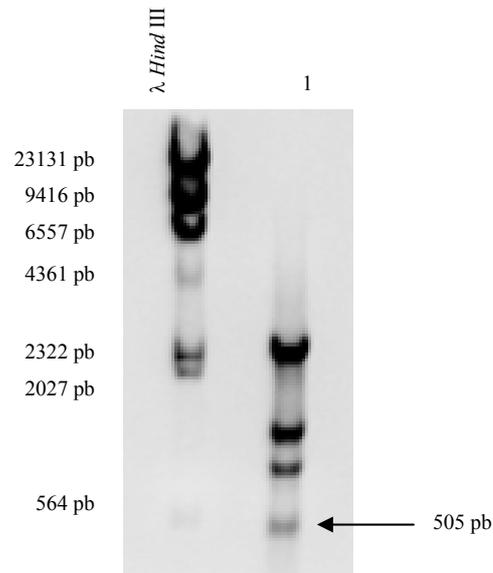
Também é possível observar que são vários os padrões de integração obtidos, ou seja, foram usados diferentes sítios de integração, ditados pela sua posição na membrana. Por exemplo, os clones das pistas S e T têm o mesmo padrão de integração, enquanto que os clones das pistas U e V apresentam padrões diferentes entre si e diferentes dos dois anteriores.



**Figura 3.12: Membrana obtida por hibridação Southern. A hibridação foi efectuada com a sonda *lacA* e foram utilizados 5 µg de DNA genómico digerido com *XbaI* de alguns dos clones obtidos por transformação da estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-wt com o vector integrativo pCO1. Legenda: A- clone 38; B- clone 19; C- clone 36; D- clone 9; E- clone 43; F- clone 52; G- clone 44; H- clone 61; I- clone 7; J- clone 10; L- clone 12; M- clone 5; N- clone 2; O- clone 6; P- clone 8; Q-clone 7; R- clone 1; S- clone 8; T- clone 9; U- clone 11; V- clone 7; X- clone 14.**

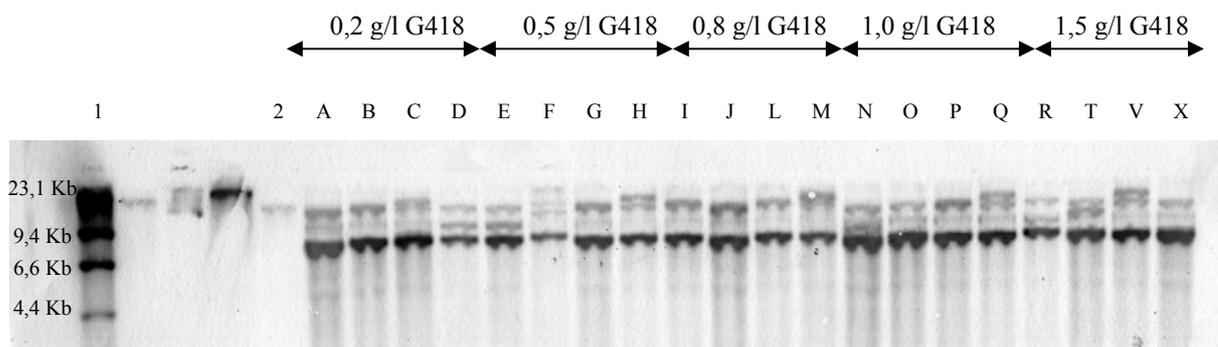
Utilizou-se 2 métodos diferentes para calcular o número de cópias *tandem* integradas. Um deles consiste na comparação das intensidades das bandas *tandem* com a intensidade da respectiva banda única da extremidade destas cópias (Figura 3.11), o qual será designado por método directo. O outro método consiste em comparar essa intensidade com a intensidade de uma banda padrão correspondente a uma única inserção. Como no genoma da levedura existe uma única cópia do gene *URA3*, construiu-se uma sonda para detectar este gene no genoma da levedura para pôr em prática o segundo método, o qual será designado por método indirecto. A sonda *URA3* consistiu num fragmento de 505 pb retirado deste gene (Anexo A1, Figura A8) por digestão do vector YIp5 (Stratagene) com a enzima de restrição *AccI* e extracção em gel de agarose (Figura 3.13).

Foi possível utilizar a sonda *lacA* e a sonda *URA3* em simultâneo uma vez que os seus tamanhos são próximos e os seus conteúdos de cisteína e guanina são semelhantes, o que permitiu usar uma temperatura de hibridação compatível.



**Figura 3.13:** Electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) da digestão do vector YIp5 com a enzima *AccI* para construção da sonda *URA3*. Legenda:  $\lambda$  *HindIII*- padrão de pesos moleculares de DNA  $\lambda$  digerido com *HindIII*; 1- YIp5 digerido com *AccI*.

Observando a membrana resultante (Figura 3.14), verifica-se que, tal como seria de esperar, todos os clones hibridaram com as duas sondas, o controlo, *S. cerevisiae* NCYC869-wt hibridou somente com a sonda *URA3* (Pista 2).



**Figura 3.14:** Membrana obtida por hibridação Southern. A hibridação foi efectuada com a sonda *lacA* conjuntamente com a sonda *URA3* e foram utilizados 2,5  $\mu$ g de DNA genómico digerido com *XbaI* de alguns dos clones obtidos por transformação da estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-wt com o vector integrativo pCO1. Legenda: 1- padrão de pesos moleculares de DNA  $\lambda$  digerido com *HindIII* Dig Labeled; 2- DNA genómico de *S. cerevisiae* NCYC869-wt digerido com *XbaI*; A- clone 38; B- clone 19; C- clone 36; D- clone 9; E- clone 43; F- clone 52; G- clone 44; H- clone 61; I- clone 7; J- clone 10; L- clone 12; M- clone 5; N- clone 2; O- clone 6; P- clone 8; Q-clone 7; R- clone 1; T- clone 9; V- clone 7; X- clone 14.

Após digitalização das duas membranas Southern obtidas, determinou-se o número de cópias integradas utilizando o *Software Quantaty One* (BioRad). Os resultados dos clones de interesse encontram-se apresentados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2: Número de cópias do gene *lacA* inseridas no genoma de alguns dos clones resultantes da transformação da estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-wt com o vector integrativo pCO1**

Clone	Número de cópias não <i>tandem</i>	Número de cópias <i>tandem</i>			Número total de cópias
		Método indirecto	Método directo	Média	
38 (0,2 g/l G418)	2	6	4	5	7
52 (0,5 g/l G418)	2	4	5	5	7
7 (1,5 g/l G418)	2	7	5	6	8
9 (1,5 g/l G418)	1	6	5	6	7

Obtiveram-se números médios de cópias *tandem* entre 3 e 7 (valor máximo). A maioria dos clones apresenta no total 7 ou 8 cópias integradas. O clone que apresentou um menor número total de cópias integradas foi o clone da Pista D com apenas 4 cópias. Os valores obtidos usando os dois métodos são ligeiramente diferentes: o método directo originou, globalmente, números de cópias inferiores às obtidas com o método indirecto, cujas diferenças são no máximo de duas cópias. Não foi possível aplicar o método directo nas Pistas de alguns dos clones devido à indefinição das respectivas cópias não *tandem*, nomeadamente, nas Pistas D, N, O, R e X.

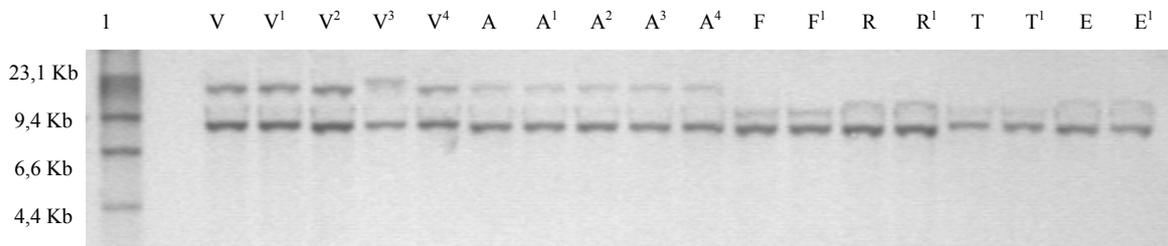
Para se efectuar a determinação do número de cópias *tandem*, utilizando o método indirecto, é estritamente necessário que todas as quantidades de DNA estejam normalizadas e que as sondas de DNA estejam presentes em quantidades iguais. O outro método elimina estes erros uma vez que apenas se usa uma sonda de DNA e a quantificação do número de cópias em cada pista é independente das restantes. Por esse motivo, optou-se por utilizar apenas o método directo na quantificação do número de cópias nos Southern seguintes. Além disso, a diferença do número de cópias obtida nos dois métodos é inferior ao erro associado às análises Southern quantitativas que foi determinado como sendo de  $\pm 20\%$  (Wang *et al.* 1996). Tendo em conta este aspecto, pode considerar-se que os dois métodos apresentam resultantes concordantes.

De um modo geral o número de cópias obtido neste trabalho é relativamente inferior ao referido na literatura (Tabela 1.3, Introdução), sendo da ordem de grandeza

do número de integrações obtidas com o gene da  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* (9 cópias, Lee e Da Silva, 1997a).

Na Figura 3.15 apresenta-se a membrana Southern resultante dos ensaios de estabilidade. Verifica-se que, para cada clone, não há diferenças significativas entre o padrão de bandas inicial e o padrão de bandas obtido após os ensaios de estabilidade. O sinal obtido nesta membrana é inferior ao obtido nas duas membranas anteriores, o que poderá estar relacionado com o desgaste da sonda *lacA* associado à menor quantidade de DNA utilizado.

Independentemente disso, por análise da densidade das bandas, verifica-se que o número de cópias é mantido, logo pode-se concluir que as integrações conseguidas são estáveis, durante pelo menos 80 gerações.



**Figura 3.15: Membrana obtida por hibridação Southern referente aos ensaios de estabilidade. A hibridação foi efectuada com a sonda *lacA* e foram utilizados 1,5  $\mu$ g de DNA genómico digerido com *XbaI*.** Legenda: 1- padrão de pesos moleculares de DNA  $\lambda$  digerido com *HindIII Dig Labeled*; 2- DNA genómico de *S. cerevisiae* NCYC869-wt digerido com *XbaI*; V- clone 7 inicial; V<sup>1</sup>- clone 7 após 6 repicagens em YPD; V<sup>2</sup>, V<sup>3</sup> e V<sup>4</sup>- colónias do clone 7 após ensaios de estabilidade; A- clone 38 inicial; A<sup>1</sup>- clone 38 após 6 repicagens em YPD; A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup> e A<sup>3</sup>- colónias do clone 38 após ensaios de estabilidade; F- clone 52 inicial; F<sup>1</sup>- clone 52 após 6 repicagens em YPD; R- clone 1 inicial; R<sup>1</sup>- clone 1 após 6 repicagens em YPD; T- clone 9 inicial; T<sup>1</sup>- clone 9 após 6 repicagens em YPD; E- clone 43 inicial; E<sup>1</sup>- clone 43 após 6 repicagens em YPD.

Como as integrações resultantes da implementação deste sistema de integração ocorrem, predominantemente, sob a forma de longos *tandem arrays*, a probabilidade de serem eliminadas é maior, pelo que a avaliação da estabilidade das inserções deve ser efectuada. De um modo geral, a alteração do sistema de integração original baseado no vector p $\delta$ -neo, pela introdução de cassetes de expressão de genes heterólogos no mesmo, resultou numa diminuição da estabilidade estrutural das integrações, verificado nos trabalhos de Lee e Da Silva (1997a) e Wang *et al.* (1996).

No entanto, nem todos os autores comprovaram a manutenção do número de cópias após ensaios de estabilidade em meio não selectivo a longo termo, nomeadamente Cho *et al.* (1999) e Kim *et al.* (2001). Estes autores apenas verificaram a manutenção da resistência ao antibiótico G418 em placas selectivas, o que não é suficiente para garantir a manutenção do mesmo número de cópias inicialmente conseguidas.

Neste trabalho a estabilidade estrutural das integrações não parece ser problemática.

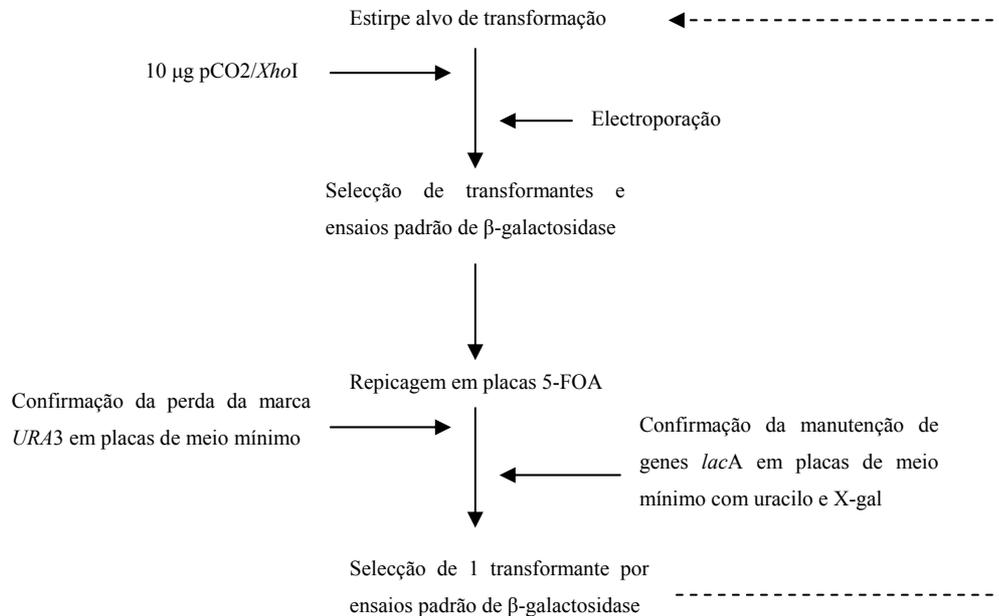
### 3.2.2 Transformação de *S. cerevisiae* NCYC869-A3 com o vector pCO2

Na transformação de *S. cerevisiae* NCYC869-A3 com o vector integrativo pCO2, os transformantes foram seleccionados em placas de meio mínimo contendo glucose como fonte de carbono e energia. O método de transformação utilizado foi a electroporação uma vez que este método já havia sido utilizado e otimizado no sistema anterior. O DNA plasmídico de pCO2 foi linearizado na sequência  $\delta$  com a enzima *Xho*I antes da electroporação.

Os transformantes que apresentaram crescimento em meio mínimo resultaram da integração do gene *URA3* no genoma da levedura, uma vez que a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-A3 encontra-se mutada no gene *URA3* (mutada para *ura<sup>-</sup>* por Lima, 1993) logo, não consegue crescer em meio mínimo sem uracilo. O gene *URA3* codifica para a enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilase, uma enzima com 267 aminoácidos necessária para a biossíntese de uracilo. Como as placas contêm X-gal, é possível simultaneamente seleccionar os clones que têm igualmente o gene *lacA* integrado.

A marca de selecção *URA3*, contida no vector pCO2, consiste no gene de levedura *URA3* flanqueado por duas sequências bacterianas repetidas de histidina G (*hisG*). Este gene pode ser perdido pela recombinação entre as duas sequências repetidas de *hisG* e as colónias que perderam este gene são seleccionadas em placas contendo 5-FOA (estirpes com a via do uracilo completa não crescem em meio 5-FOA). Assim é possível voltar a transformar novamente a estirpe resultante reutilizando a mesma marca de selecção. As novas integrações podem ocorrer em novos locais ou em *tandem* com os anteriores, no entanto só os não *tandem* permanecem uma vez que quaisquer duas sequências repetidas de *hisG* podem recombinar. Deste modo, e em condições óptimas, pode-se conseguir introduzir uma cópia do gene de interesse por cada ronda de transformação, sendo que cada nova cópia é integrada num sítio diferente. Neste

trabalho foram realizadas 3 rondas de transformações sequenciais “cegas”, ou seja, sem análise Southern entre elas. Na próxima figura encontram-se sistematizados todos os passos envolvidos em cada ronda de transformação sequencial “cega” (Figura 3.16).



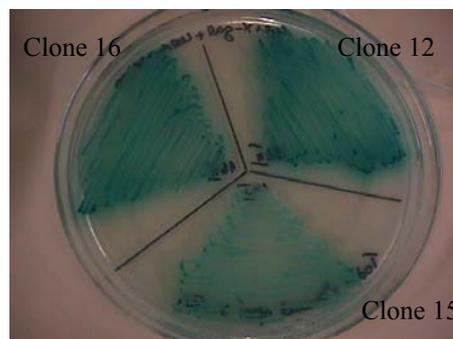
**Figura 3.16: Diagrama de fluxo de todos os passos envolvidos em cada ronda de transformação efectuada com o sistema baseado no vector pδ-UB.**

Após a primeira ronda de transformações obteve-se um elevado número de transformantes com diferentes tonalidades de azul e também algumas colónias brancas. Alguns dos clones que apresentaram maiores intensidades de azul, escolhidos aleatoriamente, foram repicados em meio mínimo com X-gal. Após o seu crescimento, foram submetidos a ensaios padrão de β-galactosidase (2.13.3). Foram obtidos diferentes níveis de produção de enzima mas os níveis mais elevados não foram comparáveis ao sistema baseado no vector 2µm (*S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1). Os 4 clones que apresentaram maior actividade enzimática foram repicados em placas contendo 5-FOA. Foram estes os escolhidos porque possivelmente teriam um maior número de cópias integradas, logo a probabilidade de conservar pelo menos uma delas após 5-FOA poderia ser mais elevada. Uma colónia de cada um destes clones foi repicada, a partir das placas 5-FOA, em placas de meio mínimo para confirmar a perda da marca de selecção (não podem crescer) e em placas contendo meio mínimo com uracilo e X-gal para verificar a manutenção do gene que codifica para a β-galactosidase.

Este facto não foi confirmado uma vez que não se observou cor azul após crescimento. A actividade de  $\beta$ -galactosidase destas colónias em tubos contendo meio SSlactose ou meio YPD deixou de ser mensurável, mas avançou-se, de qualquer forma, para a segunda ronda de transformações com uma destas colónias, escolhida aleatoriamente (clone número 14).

Após a segunda ronda de transformações verificou-se que o número de clones e a variedade de tonalidade de azul dos mesmos foi semelhante ao obtido na ronda anterior. Obtiveram-se igualmente diferentes níveis de produção de enzima, idênticos aos obtidos na primeira ronda de transformações.

O processo de selecção de transformantes foi igual ao descrito anteriormente, tendo-se seleccionado adicionalmente alguns dos clones que apresentaram menor actividade enzimática para repicagem em 5-FOA, 8 clones ao todo. Após crescimento em placas de meio mínimo com uracilo e X-gal, verificou-se que apenas 3 das colónias seleccionadas, correspondentes a 3 clones, apresentavam cor azul, e de diferentes tonalidades, o que indicava a manutenção do gene que codifica para a  $\beta$ -galactosidase (Figura 3.17).



**Figura 3.17: Resposta fenotípica obtida em placas de meio mínimo com uracilo e X-gal de 3 clones provenientes da segunda ronda de transformações após terem passado por placas 5-FOA.**

Todas estas colónias revelaram diminuição de actividade de  $\beta$ -galactosidase em ensaios padrão, o que pode indicar perda de cópias integradas, supostamente cópias *tandem*. A actividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase do clone número 15 deixou de ser mensurável.

O clone seleccionado para a terceira ronda de transformações foi o que apresentou maior actividade enzimática após 5-FOA (clone número 12).

Após a terceira e última ronda de transformações e repetição do processo de selecção de transformantes, os níveis de produção de  $\beta$ -galactosidase antes e após 5-FOA não foram superiores aos obtidos com o melhor clone da ronda anterior, fazendo prever que novas inserções não foram conseguidas (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3: Valores médios máximos obtidos em ensaios padrão de  $\beta$ -galactosidase (valores de actividade de  $\beta$ -galactosidase  $\pm$  intervalo com 95% de confiança) para cada ronda de transformação efectuada e respectivos clones**

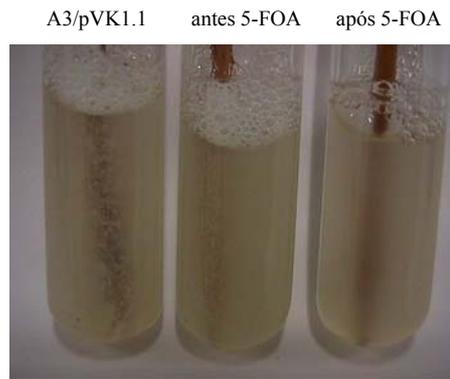
Ronda de transformação	Clone	Actividade de $\beta$ -galactosidase antes 5-FOA (U/ml)		Actividade de $\beta$ -galactosidase após 5-FOA (U/ml)	
		Meio YPD	Meio SSLactose	Meio YPD	Meio SSLactose
		1°	14	51 $\pm$ 11	41 $\pm$ 3
2°	12	103 $\pm$ 15	31 $\pm$ 3	31 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2
3°	7	50 $\pm$ 9	32 $\pm$ 2	36 $\pm$ 6	5 $\pm$ 3

Todas as 12 colónias, resultantes da passagem de 12 clones da terceira ronda por placas 5-FOA, apresentaram cor azul em placas de meio mínimo contendo uracilo e X-gal. Estas e as outras colónias retiradas de placas 5-FOA foram caracterizadas geneticamente por hibridação Southern (3.2.2.2).

### 3.2.2.1 Avaliação da capacidade de floculação

Tal como aconteceu com o sistema de integração anterior, foram obtidas estirpes com diferentes níveis de floculação, no entanto as mais floculadas são mais floculantes do que as do sistema anterior e bastante equivalentes à estirpe *S. cerevisiae* NCYC869–A3/pVK1.1. As estirpes seleccionadas em placas 5-FOA, por terem um baixo número de cópias, apresentam um crescimento lento em lactose e a floculação não é bem conseguida (Figura 3.18).

Foram efectuados ensaios de comparação da floculação exibida pelas estirpes *S. cerevisiae* NCYC869–A3 e *S. cerevisiae* NCYC869–wt e verificou-se que não haviam diferenças significativas, logo as diferenças de floculação obtidas com os dois sistemas de integração não estão relacionadas com a estirpe hospedeira.



**Figura 3.18:** Fotografias após ensaios padrão de  $\beta$ -galactosidase dos tubos de ensaio referentes ao clone número 7 da terceira ronda de transformações antes e após passagem por 5-FOA. Crescimento em meio SSlactose e comparação com *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1.

### 3.2.2.2 Caracterização genética das inserções por hibridação Southern

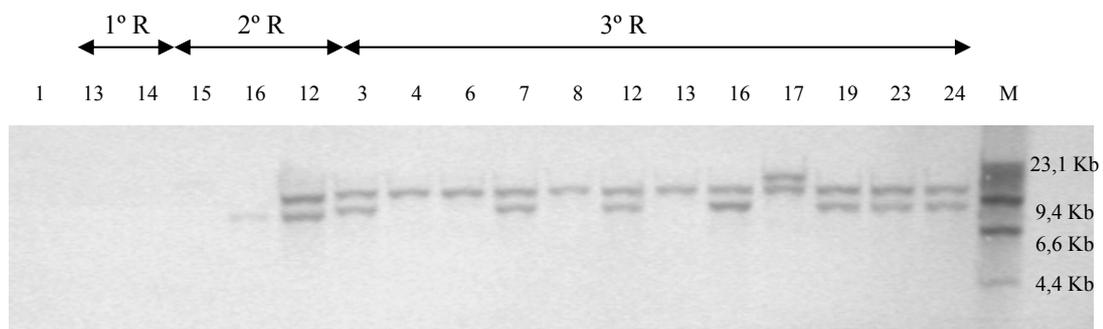
As colónias resultantes da passagem dos clones de interesse por placas 5-FOA foram caracterizadas geneticamente por hibridação Southern para confirmar a integração do vector pCO2 no genoma levedura *S. cerevisiae* NCYC869-A3 e, simultaneamente, para determinar os locais de integração e o número de cópias integradas. Os clones foram analisados apenas após passagem por 5-FOA porque o objectivo era prosseguir com outras rondas de transformação.

Após extracção de DNA genómico (2.14) e verificação da sua integridade em gel de electroforese (2.12), 1,5  $\mu$ g foram digeridas com a enzima *Xba*I para depois se proceder à análise Southern (2.15). A enzima *Xba*I, corta o vector pCO2 uma única vez fora do gene *lacA* e fora da cassete de selecção “reutilizável”, mais concretamente a 5416 pb da origem. E tal como no sistema de integração anterior, a integração do gene *lacA* no genoma da levedura hospedeira foi detectada com a sonda *lacA*. O resultado obtido encontra-se na Figura 3.19.

Foram analisados dois clones da primeira ronda de transformações, o clone número 13 (Pista 13) e o clone número 14 (Pista 14). O clone número 14 foi o clone usado na segunda ronda de transformações, e observando a membrana é possível verificar que não existe qualquer banda o que significa que a segunda ronda teve por base a estirpe original. Em relação à segunda ronda, foram analisados três clones diferentes, o clone número 15 (Pista 15), o clone número 16 (Pista 16) e o clone número 12 (Pista 12), tendo, este último clone, sido usado na terceira ronda de transformações.

O clone número 15 e o clone número 16, embora seja difícil perceber na imagem, apresentam uma única banda em sítios diferentes, ou seja, uma única cópia integrada, enquanto que o clone número 12 apresenta duas bandas, o que corresponde a duas cópias integradas. Da terceira ronda foram analisados 12 clones e verificou-se que não foi possível integrar cópias adicionais, pelo contrário, em alguns casos uma das cópias foi perdida.

Curiosamente, a banda comum a todas as colónias analisadas na terceira ronda, encontra-se aparentemente situada na posição equivalente ao tamanho do vector pCO2 (11,7 Kb). Tal como já foi referido, após 5-FOA as cópias *tandem* são perdidas, pelo que este resultado poder-se-á tratar apenas de uma simples coincidência até porque após 5-FOA não se verificou crescimento em meio mínimo sem uracilo. Ainda, por análise de imagem, as intensidades de todas as bandas são semelhantes.



**Figura 3.19: Membrana obtida por hibridação Southern. A hibridação foi efectuada com a sonda *lacA* e foram utilizados 1,5 µg de DNA genómico digerido com a enzima *XbaI* de alguns dos clones obtidos por transformação da estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-A3 com o vector integrativo pCO2. Legenda: M- padrão de pesos moleculares de DNA λ digerido com *HindIII Dig Labeled*; 1- DNA genómico de *S. cerevisiae* NCYC869-A3 digerido com *XbaI*; os números sobre a figura correspondem ao número de cada clone dentro da respectiva ronda de transformação; 1° R- primeira ronda de transformação; 2° R- segunda ronda de transformação; 3° R- terceira ronda de transformação.**

Analisando a membrana obtida (Figura 3.19), verifica-se que duas das rondas efectuadas foram infrutíferas, nomeadamente a primeira e a terceira ronda, as três rondas efectuadas apenas permitiram a inserção de 2 cópias no genoma.

A passagem dos clones por placas 5-FOA reduziu drasticamente a produção de β-galactosidase, o que indicia perda de cópias. Isto pode querer significar que as novas cópias inseridas em cada ronda podem ter sido inseridas em *tandem* com as anteriores e que após 5-FOA foram perdidas ou então foram inseridas em novos locais sob a forma

de cópias *tandem* e após 5-FOA foram também todas perdidas, devido aos fenómenos de recombinação envolvidos. Este acontecimento pode indicar que esse local de integração seria um local instável e ocorre por recombinação entre as sequências flanqueadoras  $\delta$ , resultando na perda total da inserção (observado por Lee e Da Silva 1997b).

Lee e Da Silva (1997b) após 5 e 10 rondas de transformação sequenciais “cegas”, usando este sistema de integração, obtiveram, no máximo, 3 cópias dispersas integradas. Para as 20 colónias analisadas, após 5 rondas de integração a percentagem de colónias com uma, duas e três integrações foram 15%, 70% e 15% respectivamente e para as 20 colónias analisadas, após 10 rondas de transformação a percentagem de colónias com uma, duas e três integrações foram 0%, 25% e 75% respectivamente.

Este processo demonstrou que é necessário verificar a manutenção da cópia anterior e, simultaneamente, verificar a aquisição de uma nova cópia por hibridação Southern ronda a ronda, e pondo em prática essa verificação, após 5 ciclos de transformação uma série de estirpes com uma a cinco integrações em diferentes sítios foram obtidas. No entanto, a estabilidade da última estirpe (a que apresentava 5 integrações) foi dependente da localização da inserção, porque nos casos de perda, foram perdidas sempre as mesmas 2 bandas, resultando apenas 3 inserções estáveis (Lee e Da Silva, 1997b).

Os transformantes obtidos neste trabalho com duas cópias do gene *lacA* integradas em sítios diferentes do genoma da estirpe hospedeira apresentam níveis de produção de  $\beta$ -galactosidase inferior às obtidas com o sistema anterior e crescimento em lactose muito lento.

Uma vez que se verificou a estabilidade das inserções obtidas com o sistema de integração baseado no vector p $\delta$ -neo e dado que o sucesso deste método de integração é casuístico, obrigando a uma análise de transformantes de longo espectro e à monitorização das integrações ronda após ronda, optou-se por abandonar este sistema.

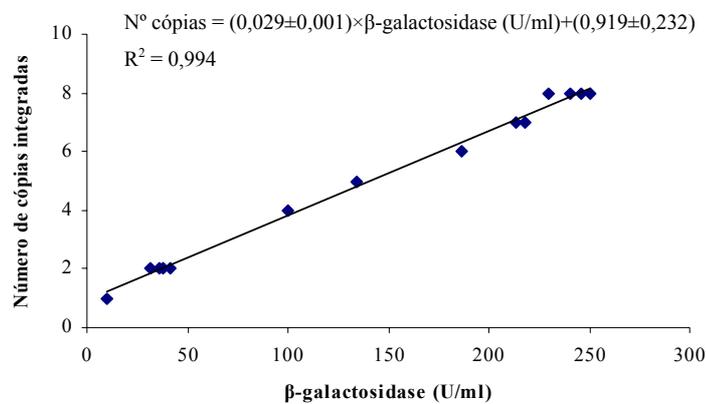
No entanto, este sistema pode contribuir, conjuntamente com o sistema anterior para verificar uma possível relação entre o número de cópias integradas e a actividade de  $\beta$ -galactosidase extracelular expressa.

Devido ao elevado erro associado à análise Southern quantitativa, Lee e Da Silva (1997a) determinaram o número de cópias a partir da actividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* (intracelular). Os valores mais elevados das actividades obtidas eram aproximadamente múltiplos das actividades mais baixas, que correspondiam a

uma única cópia integrada (verificado por Southern). Puderam assim determinar o número de cópias *tandem* por extrapolação, sabendo de estudos anteriores, que esta actividade específica era aproximadamente proporcional ao número de cópias de *lacZ* integradas até um número de pelo menos 10 (Da Silva and Bailey 1989; Wittrup *et al.* 1990).

Neste trabalho, a determinação do número de cópias integradas tendo por base a actividade enzimática de uma única cópia terá de ser verificada experimentalmente uma vez que a enzima clonada ( $\beta$ -galactosidase de *A. niger*) é extracelular, sendo as medições de actividade efectuadas no meio de cultura (sobrenadante de fermentação). Logo, outros processos além da transcrição/tradução medeiam a passagem do gene a proteína, nomeadamente a excreção.

Para determinar a relação entre o número de cópias do gene *lacA* integrado no genoma e a actividade de  $\beta$ -galactosidase extracelular, foram seleccionados os valores de actividade enzimática obtidos em ensaios padrão de  $\beta$ -galactosidase em meio YPD de alguns dos clones construídos neste trabalho (Figura 3.20).



**Figura 3.20: Relação entre o número de cópias do gene *lacA* integradas no genoma e a actividade de  $\beta$ -galactosidase em ensaios padrão.**

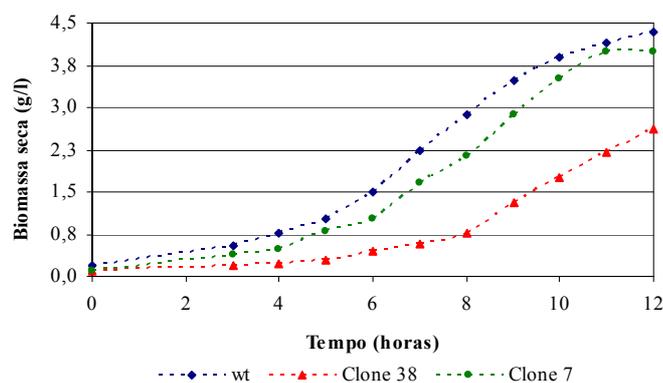
Analisando a Figura 3.20 verifica-se a existência de uma relação linear entre o número de cópias do gene *lacA* integradas no genoma e a actividade de  $\beta$ -galactosidase extracelular, mas nem todos os clones obedecem a esta relação. O sistema baseado no vector  $p\delta$ -UB permite determinar com exactidão a relação entre a actividade extracelular de  $\beta$ -galactosidase e o número de cópias integradas, mas apenas foram obtidos clones com uma ou duas cópias integradas em sítios diferentes no máximo. Os pontos referentes a um número de cópias superior a dois foram obtidos utilizando os

transformantes resultantes do sistema baseado no vector p $\delta$ -neo, no qual o número de cópias foi determinado por análise Southern quantitativa, que tem associado um erro de  $\pm 20\%$ . De referir que, apesar de se apresentar a relação do número de cópias integradas com a actividade volumétrica, a biomassa celular se encontra padronizada para as diferentes amostras, sendo de  $2,6 \pm 0,4$  g/l.

### 3.2.3 Metabolismo da glucose e da lactose e expressão de $\beta$ -galactosidase, comparação com *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1

Tendo em conta os objectivos deste trabalho, foram apenas escolhidos para os ensaios de fermentação descontínua (2.17) clones resultantes da transformação da estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-wt com o vector integrativo pCO1, nomeadamente o clone número 38, proveniente de placas selectivas YPD com 0,2 g/l de G418, e o clone número 7, proveniente de placas selectivas YPD com 1,5 g/l de G418. Ou seja, foram escolhidos dois dos clones que haviam apresentado melhores valores de actividade enzimática em ensaios padrão de  $\beta$ -galactosidase. Estes foram, inicialmente, crescidos em meio YPD com 10 g/l de glucose inicial (Figura 3.21 e Figura 3.22).

O clone 38 apresentou um crescimento mais lento (Figura 3.21) do que a estirpe original mas depois conseguiu recuperar, de tal forma que a biomassa seca no final da fermentação foi idêntica para todas as estirpes, aproximadamente 6 g/l.

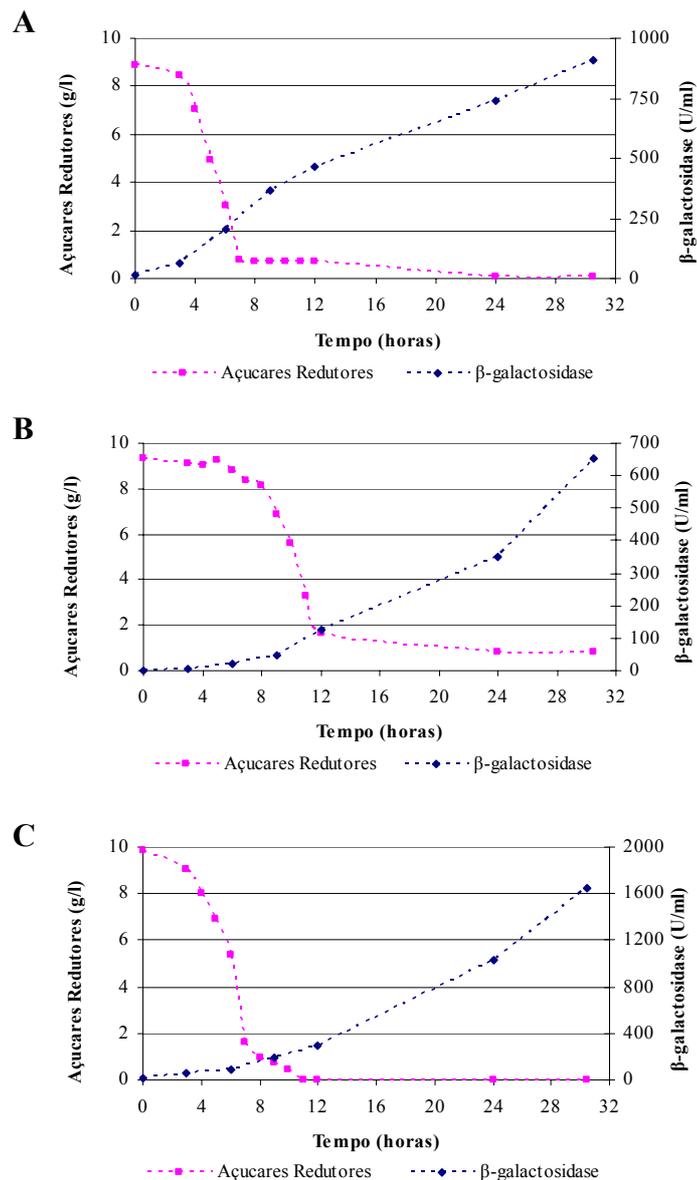


**Figura 3.21:** Perfis de crescimento obtidos em fermentações descontínuas em meio YPD com 10 g/l de glucose inicial para os clones número 38 e número 7 e para a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-wt.

As inserções genómicas não afectaram a taxa específica de crescimento das novas estirpes (Tabela 3.4).

**Tabela 3.4: Taxas específicas de crescimento da estirpe *S. cerevisiae* NCYC869-wt e dos clones 38 e 7 em meio YPD (valores de taxa específica de crescimento  $\pm$  intervalo com 95% de confiança)**

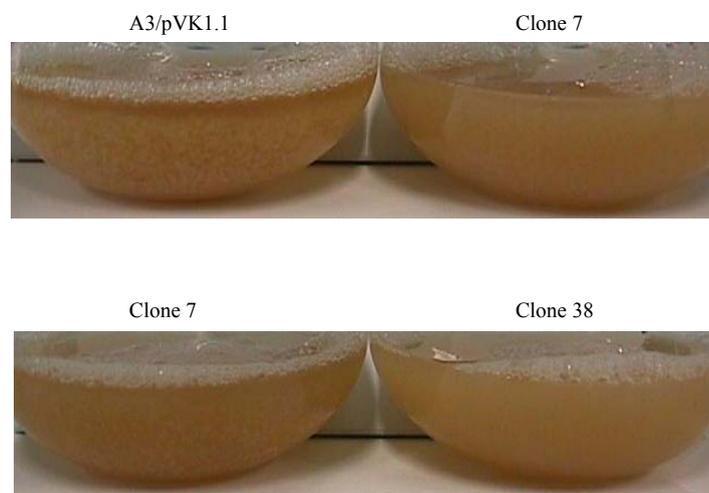
Estirpe/Clone	Taxa específica de crescimento ( $h^{-1}$ )
<i>S. cerevisiae</i> NCYC869-wt	$0,181 \pm 0,057$
38	$0,235 \pm 0,080$
7	$0,220 \pm 0,063$



**Figura 3.22: Perfis de consumo de açúcares redutores e produção de  $\beta$ -galactosidase obtidos em fermentações descontínuas em meio YPD com 10 g/l de glucose inicial. Legenda: A- *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1; B- Clone número 38; C- Clone número 7.**

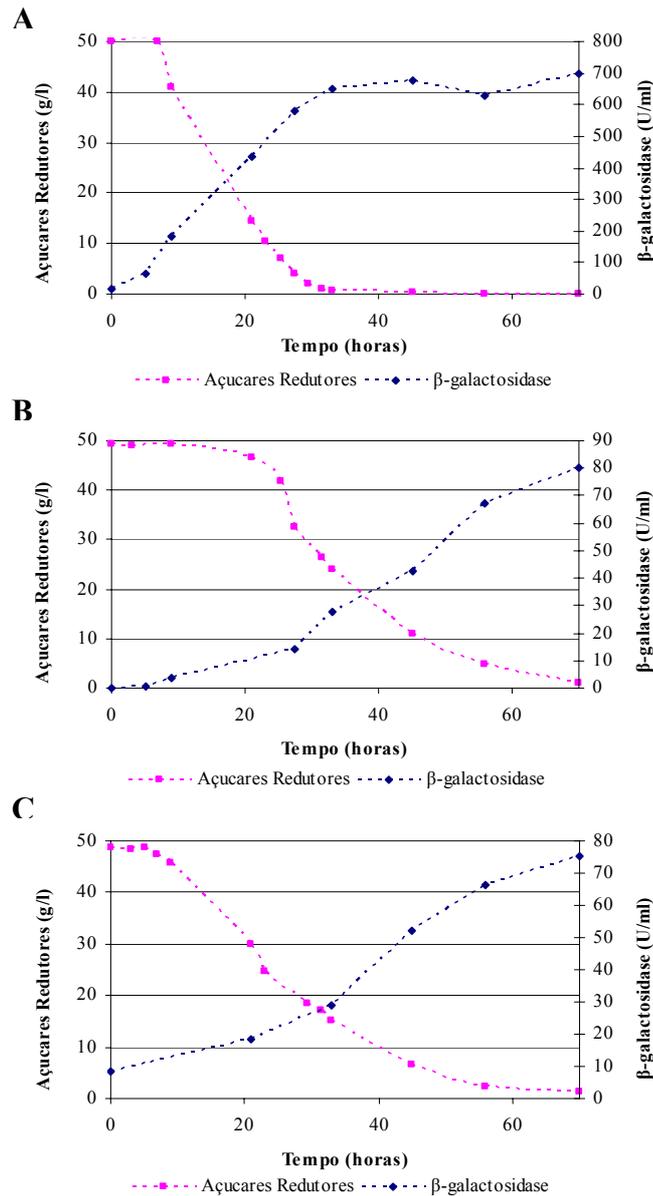
Observando os gráficos da Figura 3.22 verifica-se que o clone 7 tem um comportamento idêntico ao da estirpe *S. cerevisiae* NCYC869A3/pVK1.1 e, após o açúcar ter terminado, verifica-se que conseguiu atingir um valor de actividade enzimática mais elevado do que esta.

Relativamente ao clone 38, verifica-se que este é mais lento do que o clone 7 e do que a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869A3/pVK1.1 a metabolizar a totalidade da glucose. Também não conseguiu atingir os níveis de actividade enzimática obtidos pelas outras duas estirpes e apresentou instabilidade de floculação (Figura 3.23).



**Figura 3.23: Fotografias após fermentações descontinuas das estirpes em estudo em meio YPD com 10 g/l de glucose inicial, comparação do nível de floculação.**

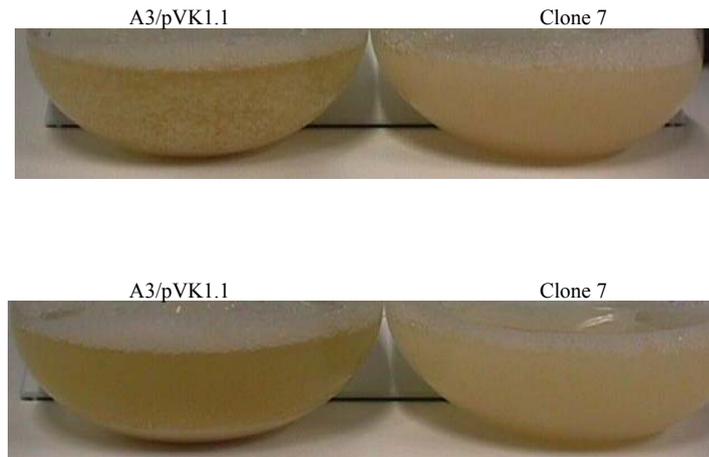
O clone 7, o clone 38 e a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869A3/pVK1.1 foram depois crescidos em meio SSLactose contendo 50 g/l de lactose inicial. Na figura 3.24 encontram-se apresentados os perfis de consumo de açúcares redutores e de produção de  $\beta$ -galactosidase obtidos.



**Figura 3.24:** Perfis de consumo de açúcares redutores e produção de  $\beta$ -galactosidase obtidos em fermentações descontínuas em meio SSLactose com 50 g/l de lactose inicial. Legenda: A- *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1; B- Clone número 38; C- Clone número 7.

Observando os gráficos da Figura 3.24 verifica-se duas grandes diferenças entre a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869A3/pVK1.1 e as estirpes construídas no decorrer deste trabalho: as novas estirpes necessitam o dobro do tempo da estirpe de referência para metabolizar a lactose completamente e o nível de actividade de  $\beta$ -galactosidase extracelular, que é 10 vezes inferior. A evolução destes parâmetros é semelhante entre as duas novas estirpes.

Outra grande diferença observada foi o nível de floculação, que foi semelhante para as duas novas estirpes e muito inferior ao obtido com a estirpe *S. cerevisiae* NCYC869A3/pVK1.1. Esta apresentou agregados celulares significativos que, em condições estáticas, depositavam rapidamente deixando o meio límpido. Os flóculos das outras duas estirpes eram apenas perceptíveis a “contra luz” e davam ao meio um aspecto turvo quando se parava a agitação (Figura 3.25).



**Figura 3.25: Fotografias após fermentações descontínuas das estirpes em estudo em meio SSLactose com 50 g/l de lactose inicial, comparação do nível de floculação. A fotografia de baixo tem um desfasamento de tempo de 10 segundos relativamente à de cima.**

Às 70 horas de fermentação, a biomassa seca final da estirpe *S. cerevisiae* NCYC869A3/pVK1.1 foi de 6,2 g/l, a do clone 38 foi de 6,7 g/l enquanto que a do clone 7 foi de 4,7 g/l.

Os transformantes seleccionados para estes ensaios, parecem mais promissores para produção de  $\beta$ -galactosidase de *A. niger* extracelular se a fonte de carbono utilizada for a glucose. Em meio SSLactose, no qual a única fonte de carbono é a lactose, estes transformantes apresentam um desempenho inferior ao da estirpe de referência.

## **4. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro**

---

O presente trabalho centrou-se na construção e caracterização, genética e fisiológica, de estirpes floculantes de *S. cerevisiae* recombinantes produtoras de  $\beta$ -galactosidase de *A. niger* visando a sua aplicação em processos biotecnológicos, nomeadamente em sistemas de elevada densidade celular.

Em trabalhos anteriores foram construídas as estirpes floculantes *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1 (Domingues, 2001) e *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pAV1 (Velho, 2003) produtoras de  $\beta$ -galactosidase, no entanto a primeira, apesar dos elevados níveis de produção de enzima, apresenta problemas de estabilidade plasmídica e a segunda apresenta baixos níveis de produção de enzima, pelo baixo número de cópias integradas no genoma. Para tentar ultrapassar as limitações das estirpes anteriormente construídas, foi objectivo principal deste trabalho melhorar a estabilidade de produção desta enzima em *S. cerevisiae*, recorrendo à tecnologia do DNA recombinante, mantendo simultaneamente o bom nível de produção da mesma.

As sequências  $\delta$ , que se encontram distribuídas pelo genoma da levedura *S. cerevisiae* em 425 cópias, foram utilizadas como sítios alvo de integração do gene *lacA*, que codifica para a  $\beta$ -galactosidase de *A. niger*. Este gene, ladeado pelo promotor e terminador *ADH1*, foi retirado do vector pVK1.1 (Kumar *et al.* 1992) e clonado nos vectores p $\delta$ -neo e p $\delta$ -UB que foram posteriormente utilizados para transformar as estirpes *S. cerevisiae* NCYC869-wt e *S. cerevisiae* NCYC869-A3, respectivamente. O primeiro sistema de integração utiliza como marca de selecção a resistência ao antibiótico G418, conferida pelo gene bacteriano *neo<sup>r</sup>* (sistema  $\delta$ /neo), enquanto que o outro sistema utiliza a marca *URA3* (sistema  $\delta$ /UB).

O sistema  $\delta$ /neo permite a variação da concentração de antibiótico o que pode permitir obter estirpes com elevados números de cópias integradas. Foram testadas concentrações compreendidas entre 0,2 e 1,5 g/l de G418 e verificou-se que o número de transformantes diminuiu com o aumento da concentração de antibiótico.

Independentemente das placas de selecção de origem, foram obtidos transformantes com diferentes níveis de produção de  $\beta$ -galactosidase. Uma vez que os transformantes foram seleccionados também pela maior actividade de  $\beta$ -galactosidase, devido à presença de X-gal nas placas de selecção, não se pode relacionar os níveis de produção de enzima obtidos com a concentração de antibiótico utilizada, e o mesmo também se aplica ao número de cópias integradas.

Os níveis mais elevados de  $\beta$ -galactosidase obtidos são idênticos aos obtidos com a estirpe de referência previamente construída *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1.1 (Domingues, 2001) em ensaios padrão.

Os transformantes analisados por hibridação Southern revelam múltiplas inserções *tandem* em um ou dois locais usados em simultâneo. A análise da densidade das bandas permitiu constatar que apenas 8 cópias do gene *lacA* foram, no máximo, integradas no genoma da estirpe hospedeira, o que é um número relativamente inferior ao referido na maior parte de trabalhos baseados neste sistema que já foram publicados.

A melhor estirpe obtida, tendo como critério de selecção o nível de produção de  $\beta$ -galactosidase e o nível de floculação em ensaios padrão e o número de cópias integradas por análise Southern foi o clone número 7 seleccionado em placas contendo 1,5 g/l de G418. Apesar dos resultados promissores obtidos, este clone apresentou um crescimento em lactose mais lento do que a estirpe de referência e níveis de produção de enzima bastante inferiores. No entanto, em glucose estes mesmos parâmetros foram semelhantes entre ambas as estirpes e como a nova estirpe apresentou estabilidade das inserções, após 8 culturas sequenciais com pelo menos 10 gerações cada, esta apresentase como uma excelente alternativa à estirpe baseada em plasmídeo episomal. Tendo em conta este resultado, a utilização deste sistema de integração permitiu atingir o objectivo deste trabalho.

O sistema  $\delta$ /UB permite realizar várias rondas de transformações utilizando a mesma marca de selecção uma vez que o gene *URA3* vai sendo perdido por recombinação das sequências de histidina G que o flanqueiam. Esta recombinação permite ainda, em condições óptimas, inserir uma única cópia num sítio diferente do genoma por cada ronda de transformações uma vez que as inserções *tandem* vão sendo eliminadas. Foram efectuadas apenas 3 rondas de transformações sequenciais “cegas”, ou seja, sem análises Southern entre elas, o que não foi suficiente para obter os mesmos níveis de produção de  $\beta$ -galactosidase em ensaios padrão do que os obtidos com o sistema anterior.

Alguns clones foram caracterizados geneticamente por hibridação Southern revelando que, após as 3 rondas de transformação e perda da marca *URA3*, apenas duas cópias do gene de interesse haviam sido inseridas no genoma da levedura. A passagem dos clones por placas 5-FOA reduziu drasticamente a produção de  $\beta$ -galactosidase, o que denuncia a perda de cópias.

A implementação deste sistema não foi muito bem sucedida, não permitindo alcançar o objectivo deste trabalho. Trata-se de um sistema mais complexo do que o sistema  $\delta$ /neo, mais trabalhoso, uma vez que exige a análise de um maior número de transformantes, para além de que algumas rondas de transformação podem revelar-se infrutíferas pelos processos de recombinação envolvidos. Perante os resultados obtidos e uma vez que as inserções *tandem* mostraram ser bastante estáveis, o sistema  $\delta$ /neo revelou ser mais vantajoso do que o sistema  $\delta$ /UB.

Em termos de trabalho futuro, perspectiva-se a optimização do meio de cultura e das condições de crescimento em glucose para a melhor estirpe obtida com o sistema  $\delta$ /neo, nomeadamente testar a utilização de substratos disponíveis de baixo custo cuja principal fonte de carbono seja a glucose.

Do trabalho executado não ficou esclarecido por que motivo as estirpes construídas apresentam níveis de produção de  $\beta$ -galactosidase extracelular semelhante à estirpe que contem o vector episomal quando cultivadas em meio com glucose e quando cultivadas em meio com lactose apresentam níveis de produção 10 vezes inferiores. No seguimento deste trabalho será interessante elucidar este aspecto e eventualmente seleccionar outros clones resultantes deste sistema ( $\delta$ /neo).

Também seria interessante a alteração do vector  $p\delta$ -neo de modo a que a sua linearização por digestão com uma ou mais enzimas de restrição, imediatamente antes da transformação da estirpe de levedura, promova a perda das sequências bacterianas desnecessárias e a permanência do fragmento de interesse intacto (na linha do que foi efectuado por Lee e Da Silva, 1997a), para aplicação inquestionável das estirpes resultantes a nível industrial. Além de poder vir a permitir a integração de um maior número de cópias, como observado por Lee e Da Silva, 1997a.

## **5. Bibliografia**

---

Boeke JD, LaCrute F, Fink GR (1984), *A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance*, Mol Gen Genet 197: 345-346.

Cho KM, Yoo YJ, Kang HS (1999),  *$\delta$ -Integration of endo/exo-glucanase and  $\beta$ -glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol*, Enz Microb Technol 25: 23-30.

Chung Y-S, Kim M-D, Lee W-J, Ryu Y-W, Kim J-H, Seo J-H (2002), *Stable expression of xylose reductase gene enhances xylitol production in recombinant Saccharomyces cerevisiae*, Enz Microb Technol 30: 809-816.

Corazza GR, Benati G, Sorge M, Strocchi A, Calza G, Gasbarrini G (1992),  *$\beta$ -galactosidase from Aspergillus niger in adult lactose malabsorption: a double-blind crossover study*, Aliment Pharmacol Therap 6: 61-66.

Da Silva NA, Bailey JE (1989), *Effects of inducer concentration on GAL regulated cloned gene expression in recombinant Saccharomyces cerevisiae*, J Biotechnol 10: 253-266.

Domingues L (2001), *Estirpes floculantes de Saccharomyces cerevisiae geneticamente modificadas para a utilização da lactose: construção e aplicação biotecnológica*, Dissertação de Doutorado, Universidade do Minho, Braga.

Domingues L, Lima N, Teixeira JA (2000a), *Contamination of a high-cell-density continuous bioreactor*, Biotechnol Bioeng 68: 584-587.

Domingues L, Lima N, Teixeira JA (2005), *Aspergillus niger  $\beta$ -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor*, Process Biochem 40: 1151-1154.

Domingues L, Oliveira C, Castro I, Lima N, Teixeira JA (2004), *Production of  $\beta$ -galactosidase from recombinant Saccharomyces cerevisiae grown on lactose*, J Chem Technol Biotechnol 79: 809-815.

Domingues L, Onnela M-L, Teixeira JA, Lima N, Penttilä M (2000b), *Construction of a flocculent brewer's yeast strain secreting Aspergillus niger  $\beta$ -galactosidase*, Appl Microbiol Biotechnol 54: 97-103.

- Domingues L, Teixeira JA, Lima N (1997), *Rapid and sensitive detection of  $\beta$ -galactosidase-producing yeasts by using microtiter plate assay*, *Biotechnol Tech* 6: 399-402.
- Domingues L, Teixeira JA, Penttilä M, Lima N (2002), *Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain secreting high levels of *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase*, *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 645-650.
- Domingues L, Vicente AA, Lima N, Teixeira JA (2000c), *Applications of yeast flocculation in biotechnological processes*, *Biotechnol Bioprocess Eng* 5: 288-305.
- Dujon B (1996), *The yeast genome project: what did we learn?*, *Trend Genet* 12: 263-270.
- Gekas V, López-Leiva M (1985), *Hydrolysis of lactose: a literature review*, *Process Biochem* 20: 2-12.
- Hadfield C, Raina KK, Shashi-Menon K, Mount RC (1993), *The expression and performance of cloned genes in yeasts*, *Mycol Res* 97: 897-944.
- Henderson RCA, Cox BS, Tubb R (1985), *The transformation of brewing yeasts with a plasmid containing the gene for copper resistance*, *Curr Genet* 9: 133-138.
- Holmes DS, Quigley M (1981), *A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids*, *Anal Biochem* 114: 193-197.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983), *Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations*, *J Bacteriol* 153: 163-168.
- Jacobs E, Dewerchin M, Boeke JD (1988), *Retrovirus-like vectors for *Saccharomyces cerevisiae*: integration of foreign genes controlled by efficient promoters into yeast chromosomal DNA*, *Gene* 67: 259-269.
- Kim M-D, Rhee S-K, Seo J-H (2001), *Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal  $\delta$ -integration*, *Journal Biotechnol* 85: 41-48.

---

Kumar V, Ramakrishnan S, Teeri TT, Knowles JKC, Hartley BS (1992), *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase grow on whey permeate, *Biotechnol* 10: 82-85.

Lee FWF, Da Silva NA (1996), *TyI-Mediated integration of expression cassettes: host strain effects, stability, and product synthesis*, *Biotechnol Prog* 12: 548-554.

Lee FWF, Da Silva NA (1997a), *Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the  $\delta$  sequences of *Saccharomyces cerevisiae**, *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 339-345.

Lee FWK, Da Silva NA (1997b), *Sequential  $\delta$ -integration for the regulated insertion of cloned genes in *Saccharomyces cerevisiae**, *Biotechnol Prog* 13: 368-373.

Lima N (1993), *Rastreio e melhoramento genético de características fúngicas com interesse industrial*, Tese de Doutorado, Universidade do Minho, Braga.

Mochizuki D, Miyahara K, Hirata D, Matsuzaki H, Hatano T, Fukui S, Miyakawa T (1994), *Overexpression and secretion of cellulolytic enzymes by  $\delta$ -sequences-mediated multicopy integration of heterologous DNA sequences into the chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae**, *J Ferment Bioeng* 77: 468-473.

Parekh RN, Shaw MR, Wittrup KD (1996), *An integrating vector for tunable, high copy, stable integration into the dispersed Ty  $\delta$  sites of *Saccharomyces cerevisiae**, *Biotechnol Prog* 12: 16-21.

Ramakrishnan S, Hartley BS (1993), *Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase*, *Appl Environ Microbiol* 59: 4230-4235.

Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ (1992), *Foreign gene expression in yeast: a review*, *Yeast* 8: 423-488.

Sakai A, Shimizu Y, Hishimura F (1990), *Integration of heterologous genes into the chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a  $\delta$ -sequence of yeast retrotransposon Ty*, *Appl Microbiol Biotechnol* 33: 302-306.

Velho A (2003), *Produção da  $\beta$ -galactosidase em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) flocculante por transformação integrativa*, Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, Braga.

Venâncio A, Domingues L, Lima N (1999), *Transformation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* using lithium acetate and pYAC4*, J Basic Microbiol 39: 37-41.

Wang X, Wang Z, Da Silva NA (1996), *G418 selection and stability of cloned genes integrated at chromosomal  $\delta$  sequences of *Saccharomyces cerevisiae**, Biotechnol Bioeng 49: 45-51.

Wittrup KD, Ratzkin B, Patel A, Bailey J (1990), *Propagation of an amplifiable recombinant plasmid in *Saccharomyces cerevisiae*: flow cytometry studies and segregated modeling*, Biotechnol Bioeng 35: 565-577.

## **Anexos**

---

**Anexo A – Sequências de genes e vectores**

cacctgacgcgccttagcggcgccattaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccttagc  
gcccgcctcttctgcttctcccttcttctcgcacgttcgcccggcttccccgtcaagctctaaatcggggctcccttaggggtccgatt  
agtgtttacggcacctcgaccccaaaaactgattagggtagtggtcacgtagtggccatgcctgatagacggttttcgcctttg  
acgttgagtcacgttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaactcaaccctatctcggctattctttgattataagggttt  
gccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaaaaaatfaacgcaatttaacaaaatattaacgcttacaattccattcgc  
tcaggctgcgcaactgttggaagggcgatcggcgggcctctcgttattacgccagctggcgaagggggatgtgctgcaaggcga  
ttaagttgggtaacgccagggtttccagtcacgactgtaaacgacggccagtgaaftgtaatacactactatagggcgaattggg  
taccggccccctcgaaaactattaactaacaatggattcattagatccgttacattgcacaagataaaaatatatcatcatgaacaata  
aactgtctgctacataaacagtaatacaaggggtgtatgagccatattcaacgggaaactgttgcgcgagccgcgattaaattcaaca  
tggatgctgatttatgggtataaatgggctcgcgataatgctgggcaatcaggtgcgacaatctatcgattgtatgggaagccgatgcg  
ccagagttgttctgaaacatggcaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggcagactaaactggctgacggaattatgcct  
cttcgaccatcaagcattttatccgactcctgatgatgcatggttactaccactgcgatccccgggaaaacagcattccagggtattaga  
gaatacctgattcaggtgaaaatattgtgatgcctggcaggttctgcgccggttgactcattcctgttgaattgtccttttaacagcg  
atcgcgtattctgctcgcagcgcgaatcacgaatgaataacgggttggtgatgcgagtgattttgatgacgagcgaatggctggcctgt  
tgaacaagtctggaagaaatgcataagctttgccattctaccggattcagtcgctactcatggtgatttctacttgataacctattttgac  
gaggggaaattaataggtgtattgatgtggacgagtcggaatcgagaccgataccaggatcttccatcctatggaactgcctcgggga  
gtttctcttcttaccagaacggcttttcaaaaataggtattgataatcctgatataaataatgcaagttcttctgatgctcagatgtttc  
taatcagaattggttaattggtgtaaacactggcagagcattacgctgactgacgggacggcgatctattacattatgggtggtatgttga  
atagaatcaactatcatctactaactagatttactactagatataatcatatacgggttagaagatgacgcaaatgatgagaatagtc  
tctaaatagtggaagctgaaacgcaaggattgataatgtaataggatcaatgaatataaacatataaaatgatgataataatattataga  
gtgtagaattgcagattccctttatgattcctaaatccttgaggagaactctagtataattctgtatacctaataattatagcctttatca  
aatccaacaatattctcaaccaccatttctcaaaaagcattgcttatcaattgttgaacgaacaggcactatcagcaaaaataa  
atcattattgattcaattttgtcccactcctgcctctgtcatcacgatactgtgatccatgggtgcccacttatgcccgagaagatgtgagc  
aaacttatcgttctctcctcatagagcttgcagacaaactgcgcaactcgtgaaaggtaggcgatccactagttctagagcggccg  
ccaccgcggtggagctccagctttgttcccttagtgagggttaattcagactggcgtaatcatggtcatagctgttctctgtgaaattgt  
tatccgctcacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaagtagtgagtaactcacattaattgc  
gttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcccgggagaggcgggttgcg  
tattggcgctcttccgctcctcgcactgactcgtcgcctcggctgtcggctcggcgagcggatcagctcactcaaggcggtaa  
tacggttatccagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg  
cgttgcgctgtttccatagctcgcctcctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcaaggtggcgaaccggacaggac  
tataaagataaccagcgttccccctggaagctccctcgtcgcctcctgttccgacctgcccgttaccggatactgtccgctttctcc  
ttcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgaggtcgttccgctccaagctgggctgtgtcacgaacc  
ccccgttagcccgaccgctgcgcttaccggttaactatcgtttagtccaaccggtaagacacgacttatccactggcagcagcc  
actggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggcgggtgtacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggaca

gtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggttagctcttgatccggcaaaaccaccgctggtagcgg  
 tggttttttgttgaagcagcagattaccgcgcaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtg  
 aacgaaaactcacgtaagggttttggatgagattatcaaaaaggatcttcacatagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatc  
 taaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcggtcatccatagtg  
 cctgactccccgctgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgagaccacgctcac  
 cggctccagattatcagcaataaacgaccagccggaaggccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgctccatccagctat  
 taattgtgccgggaagctagagtaagtagttgccagttaatagtttgcgaacggttggccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctc  
 tegtgtgtagtggctcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggtagctcctcg  
 gtctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgta  
 agatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcccggaccgagtgctcttggccggcgtcaatacgg  
 gataataccgcccacatagcagaactttaaagtctcatcattggaaaacgttcttggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgtg  
 agatccagttcagtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaagg  
 caaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaatgtgaatactatactcttcttttaaatattattgaagcatttatcaggggt  
 attgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaataggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgc

**Figura A1: Sequência do vector pδ-neo.**

ggaagatcttc

**Figura A2: Sequência do *linker* Bg/III.**

ggcatgcc

**Figura A3: Sequência do *linker* SphI.**

ctgacgcgccctgtagcggcgcatgaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcagcgccttagcgc  
 cgctccttgccttcttcccttcttctcgcacgttcgccgcttccccgcaagctctaaatcgggggtccctttaggggtccgatttagt  
 gctttacggcacctcagccccaaaaacttgattagggtaggttacgtagtggccatcgcctgatagacggttttccctttgacg  
 ttggagtccagttcttaatagtgactcttgttccaaactggaacaactcaaccctatctcggctattctttgattataaggatgttgc  
 gatttcggcctattggttaaaaatgagctgatttaacaaaataacgcgaatttaacaaaatataacgctfacaatttccattcgcattca  
 ggtcgcgaactgttgggaaggccgatcggcggcctctcgtattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgatta  
 agttgggtaacgccaggtttccagtcacgactgtgaaacgacggccagtgagcgcgtaatacactcactatagggcgaattg  
 ggtaccggccccccatgaagcaggtgtgtgtctgttgagagttagccttagtggaagccttctcacattctcttgggaagctgaaa



gctatatcggtgatgcaattctatgcgacccggtctcggagcactgtccgaccgcttggccgcccccagctctgctcgttcgctactt  
ggagccactatcgactacgcgatcatggcgaccacaccgctctgtggatctccagtggtgatgaacgcatgagaagccccggaa  
gatcatctccgggggctttttttggcgcgatacagaccggttcagacaggataaaaggaacgcagaatgtagacaacaccgctt  
acgcatagctattcagaaatcagccggttaagcgatgattcacgagaattgctggcccgtcgggcataaaaaattaatttacactcagc  
gcctgattcgatggcgaaaacatgccgattgatctctgcgcgtgcgtgatgatgacattccgggtctggtaatggatggcgtggtcgt  
ctcgggtattatcgcgaaaacgtgctggaagaagactactcaaccgccgcgcacagggcgaaagatccacgctatttaacctgcgccgt  
cttgactcggcggtcgcggttatcgtggcaacaccggtgacgaagcctgggacggcccggccgctggacggtaaacgtatcgt  
acctatataccgacctcctcaaacgctacctcgaccagaaaaggcgtctcttttaaatcgtgctgtaaatggtctgcaagtcgcgccgc  
gcgccccggctggccgacgctatctgcgattggtctctaccggcgacgcttgaagtaacggcctgctggaagtcgaagttatctacc  
gctctaaagcctgctgattcagcgcgacgggtgagatggcacagagcaagcaagagctgatcgtataattgctgaccgctattcagggcg  
tgattcagcgcgcgaaatcgaatacatcatgatgcacgcgcaagtgaaagcctggaagaggttatccctgctgcccagggcgcaa  
aggccgacaattctccgctggcagggcagcaacagcgcgtggcgatgacatggtcagcagcgaacgttcttgggaaacctgg  
agaaactgaaagcgttggcgccagctcattctggactcggatcagaagatgatggagtgatctgacgctgatggcgctgcgctt  
atcaggcctacgtaatgcgttgatatttgggtctgtaggccggataaggcggaacctgtgatggagtaaaagacctgagcttcaatacc  
ctgattgactggaagatccatccactagtctagagcggccgccaccgcggtggagctccagcttttctcccttagtgagggttaattgc  
gcgcttggcgtaatcatggtcatagctgttctgtgtaaatgttatccgctcacaattccacacaacatacagccggaagcataaagt  
aaagcctggggtgcctaataagtgagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgttccagtcgggaaacctgctgcccagct  
gcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagggcggttgcgtattggcgctcttccgctcctcactgactcgtcgcctcggtc  
gttcggctgcggcgagcggatcagctcactcaaaaggcgtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtg  
agcaaaaggccagcaaaaggccaggaacctgaaaaaggccggttgcgtggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaca  
aaaatcgacgctcaagttagaggtggcgaaccggacagactataaagataaccaggcgttccccctggaagctcctcgtgcgctctc  
ctgttccgacctgcccgttaccggatactgtccgcttctccttcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcag  
ttcgggtgtagctgctcctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgtcagcccagcgtcgccttatccgtaactatcgtcttg  
agtccaacccggtaagacacgacttatcgcactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggggtgctaca  
gagttctgaagtggcctaactacggctacactagaagacagatattggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttggaaaaag  
agttggtagctcttgatccggcaaaaccaccgctggtagcgggtgtttttgttgaagcagcagattacgcgcaaaaaaggat  
ctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggctatgagattatcaaaaag  
gatcttcacctagatccttttaaaatgaaagtttaaatcaatcctaaagtatatatgagtaaaactggtctgacagttaccaatgcttaatca  
gtgaggcacctatctcagcagatctgtctatcttcttcatcagttgctgactccccgctggtgtagataactacgatacgggagggcttacc  
atctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccg  
agcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagctctatfaattgttggcgggaagctagagtaagtagttcggcagttatagttt  
gcgcaacgttggcattgctacagcagcgtggtgtcacgctcgtctgttggatggctcattcagctccggttccaacgatcaaggcg  
agttacatgatccccatgttgcgcaaaaagcggtagctcctcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtggtatcactc  
atggttatggcagcactgcataattcttactgcatccatccgtaagatcctttctgactggtgagttactcaaccaagtcattctgagaa  
tagtgtatcgggcgaccgagttgctcttcccggcgtaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtctatcattgg  
aaaacgttcttcggggcgaaaaactcgaagatcttaccgctgtgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagc  
atctttactttcaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataaggggcgacacggaatgtt

aatactacatactcttcccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgatttagaaaaataaca  
aatagggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgccac

**Figura A4: Sequência do vector pδ-UB.**

gaattccatcatgaagcttctccgcttgtgctattgcttggcggcacaggctgctggggcgtccattaagcatcgaatcaatggctt  
acccttacggagcattctgaccggccaagcgggaactgttcagaaaatcgtcacttgggatgacaagtcccttttatcaatggcgaag  
gatcatgatctcagtgccgaatttcacattccgtctacctgtaaaagaactcagcttgacatctccagaaggtcaagctctagggtta  
actgtgtcttctacgtcgattggccctcgtgaaggaaaaccgggggaatacaggcagacggcatcttgattggagccgttctcg  
acgggcttcggaagcaggtatctacctgctgcccgccagccctacatcaacgcagagagtccggcgggtgattccgggggtgt  
tgcagagagtcaatggactcttctcgaagcacaaggcttacctggatgctacagataattacgtctctcacgtcgtcgaacaattgcca  
agtaccagattaccaatggcggctccgatcatcctgtatcagcccgaatgagtacactagtggctgctcgggtgtgaattccccgatcca  
gtgtacatgcagtatgtgaagaccaggctcgtaacgccggtgctgctcattccattgatcaataacgatgcctcggctccgggaacaatgct  
cctggaaccgggaaggagcagtcgatattacggccatgatagctaccgcttgggttcgactgcgcgaaccctacggatggccctcg  
ggtgacctacctacaatttccgtaccttcatcttgagcaaagcccgaccacacatcgatagtcgagttcaaggcggctctgacga  
cccttggggaggaccgggattcgtgctgctccgaactcctgaacaatgagttcgagagagtgtctataagaacgacttagctccaga  
ttgccattatgaacctctacatgatcttgggtggaactaactgggtaacctcgggtatcctaatggatacacctctacgactatggctcggct  
gtgacagaatctcgaacatcaccgcgagaaatacagtgaaactcaagctacttggcaactttgccaagatctccgggctatttgacggc  
tagtctggcaatttgacaactccgggtacgctgataccacagacctgactgtaacgccttctcggaaacagcactggctcttctctgtg  
gtcagacattcggactacagcagcgaagagtcaacatcatacaagctcgtcttctaccagtccggtagcgtgactatcctcagcttgg  
tggtaactcacactaatggacgcgattcaagatacacgtgaccgatcacaatgtctctggaaccaatatcatctactccacggccgagg  
tctttacctggaagaagttccggacggaaagtcctcgtgctctcaggaggtgctggtgagcaccacgaacttgcattcaaccaagtc  
gaatgtcacgggtgattgaaggatccgagcttggcatctcgtcaaacgagacctctctcagttgtggtcggctgggatgtgctgaccactc  
gtcgtatcatcaagttggggacctgaaaattctcttcttgacaggaactctgcctataactactgggtgcctcaacttccacagacggca  
cttcaccaggttttagcaccagagaaggtcgcacatccatcatcgtcaaacgggctaccttgttcggactgcgtacctgaaggcag  
cggctttacctcaccgcagactcaacgctaccacttccgtgaagtcattggcgtcccctccactgctaagaatctgttcatcaatggagat  
aagacatcgacaccgtcgacaagaacggcatctggtcagctacagtcgactacaatgccctgatctcgttcccagcctgaaggact  
tggactggaagtacgtggacactctccggagatccagtcctctacgatgattctctctggcccggcagacctcaagcagaccaagaa  
tacgtctgttctctgacgacctctctgtactcatccgattacggctccacaccggatactgctttaccgggacacttaccggc  
acgggcaacgagagacacttctctatcgatacgaaggtggatcagcatttgaagctctgtctggctgaacggaacatacctcggttct  
ggactggcctttatgccaactccgactacaatgccactfacaatctgcctcagctccaggcaggcaagacgtatgtgatcaccgttggatc  
gacaacatgggcttggaggagaactggactgttggtaggacctaatgaagtccccgctggtatctcaactcctgcttgcggacggcc  
aagcagcggcaattagctggaagttgaccggaaccttggcggcaggactacgaagacaaggtccgaggtcctctgaacgaggggtgg  
tctctacgtgagcggcaaggttaccagcccagcctcccagccagaactggaagcttccagcctctggagggtctctctgagggc  
aggcattggtttctacagcggcagtttgacctgacctgccgaaggatgggatgtcccactgttctcaacatcggtaacagcactacgcc  
atccccgtaccgctgcaggctacgtcaacggatcgtatgcgaatacataagcaacatcggacctcagaccagcttccctgtccccg

agggaaatcctgaactatcgcggaacgaactggttggcggtgaccctgtggctctgactctgccggcggaagtggaaagcttgagtt  
 gagttacaccactccagtgtgactgcccttggggaggctgagtcggtgaccagcccaagtacaagaagcggaagggtgcatactagg  
 ttctgtaaatagcacattctatctagttcggttttatcataggttagccacatagcctctcgtcggcttggtcaaatgtccggaggagcttagaa  
 gttaatcatattgagatgctacatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagggaattc

**Figura A5: Sequência do gene *lacA* (a vermelho encontra-se evidenciada a sonda *lacA*).**

aagaaatgatgtaaatgaaataggaaatcaaggagcatgaaggcaaaagacaaatataagggtcgaacgaaaaataaagtcaaaagt  
 ttgatatgatgtatttggctttgcggcgccgaaaaacgagtttacgcaattgcacaatcatgctgactctgtggcgaccgcgctcttgc  
 ggccccggcgataacgctggcggtgaggtgtgccccggcgagtttttgcgctgcattttccaaggttaccctgcgctaagggcgaga  
 ttggagaagcaataagaatgccggttgggggtgcatgatgacgaccagacaactgggtgcattttaaagttgccgaaagaacctgagt  
 gcatttgaacatgagtatactagaagaatgagccaagacttgcgagacgcgagtttgcgggtggtgcgaacaatagagcgaccatgacc  
 ttgaaggtgagacgcgcataaccgctagagactttgaagaggaaacagcaatagggttgcaccagtataaatagacaggatcatacaa  
 cactggaaatggttctgtttgagtacgctttcaattcatttgggtgtgactttattatgtfacaatatggaagggaactttacacttctctatg  
 cacatatattaataaagtccaatgctagtagagaagggggtaacaccctccgcgctctttccgatttttctaaccgtggaatatttcg  
 gatatacctttgttccgggtgtacaatatggacttctctttctggaaccaaacccatacatcgggattcctataataccttcggtgtctc  
 cctaactgtaggtggcgaggggagatatacaatagaacagataccagacaagacataatgggctaacaagactacaccaattacact  
 gcctcattgatggtggtacataacgaaactaatactgtagccctagacttgatagccatcatcatatcgaagttcactacccttttccattgcc  
 atctattgaagtaataataggcgcatgcaactctttctttttcttctctccccgttgtgtctcaccatataccgcaatgacaaaaaaaa  
 tgatggaagacactaaaggaaaaaataacgacaaagacagcaccacacagatgctgttccagagctgataggggtatcttcaaca  
 cacgaaacttttcttcttctcactacgacactactctaatgagcaacggtatacggccttctccagttactgaattgaaataaaaaa  
 agtttccgcttctatcaagtataatagacctgcaattattaatctttgttctcgtcattgttctcgtcccttcttcttcttctgca  
 caatattcaagctataccaagcatacaatcaactatctcatatacaatg

**Figura A6: Sequência do promotor *ADH1*.**

taagcgaattcttatgatttatgattttattataaataagttataaaaaataaagtgatacaaatTTAAAGTgactcttaggttttaaacgaa  
 aattcttgtcttgagtaacttttctgtaggtcaggtgctttctcagggtatagcatgaggtcgtcttattgaccacacctaccggcatgcc  
 gagcaaatgcctgcaaatcgtccccattcaccacattgtagatatgtaactccagcaatgagttgatgaatctcgggtgtgattttatgtcct  
 cagaggacaatacctgttgaatccgtcc

**Figura A7: Sequência do terminador *ADH1*.**

ttcaattcaattcatcattttttttattctttttttgatttcggttcttgaattttttgattcggtaatctccgaacagaaggaagaacgaagga  
aggagcacagacttagattggtatatatacgcatatgtagtgtgaagaacatgaaattgccagattcttaaccaactgcacagaacaa  
aaacctgcaggaacgaagataaatcatgtcgaaagctacatataaggaacgtctgctactcatcctagtctgtgtgccaagctattta  
atatcatgcacgaaaagcaaacaaactgtgtgcttcattggatgttcgtaccaccaaggaatactggagtagtgaagcattaggtccca  
aaattgttactaaaaacacatgtggatatctgactgattttccatggagggcacagttaagccgctaaaggcattatccccaagtacaat  
ttttactctcgaagacagaaaattgctgacattggaatacagtc aaattgcagtactctgcgggtgtat**acagaatagcagaatgggcag**  
**acattacgaatgcacacggtgtggtgggcccaggtattgtagcggttgaagcagcggcagaagaagtaacaaggaacctagaggc**  
**ctttgatgtagcagaattgcatgcaagggtccctactctactggagaataactaagggtactgtgacattgcgaagagcgacaagatt**  
**ttgtatcggcttattgctcaaaagagacatgggtggaagagatgaagggtacgattggtgattatgacaccgggtgtgggttagatgaca**  
**gggagacgcattgggtcaacagtatagaaccgtggatgatgtgtctctacaggatctgacattattgttgaagaggactattgcaaa**  
**gggaagggtgctaaggtagagggtgaacgttacagaaaagcaggctgggaagcatattgagaagatgcggccagcaaaactaaaa**  
**actgtattataagtaaatgcatgtataactcacaattagagctcaatttaattatcagttattaccgggaatctcggctgtaatgatt**  
ttataatgacgaaaaaaaaaattgaaagaaaa

**Figura A8: Sequência do gene *URA3* (a vermelho encontra-se evidenciada a sonda *URA3*).**

## Anexo B – Locais de restrição de genes e vectores

Este anexo foi elaborado a partir da análise do **Anexo A** no programa *BioEdit*. De seguida encontram-se apresentados os locais de restrição de cada gene e de cada vector relativamente às enzimas que apresentam uma frequência de corte inferior ou igual a 5 vezes, assim como também se apresenta a lista das enzimas que não os cortam.

**Tabela B1: Locais de restrição do vector pδ-neo**

Enzima	Local de reconhecimento	Nº de cortes	Locais de corte
AccI	GT'mk_AC	1	1952
AceIII	CAGCTCnnnnnnn'nnnn_	3	397, 2629, 3869
AclI	AA'CG_TT	2	3796, 4169
AflIII	A'CryG_T	1	2677
AhdI	GACnn_n'nnGTC	1	3570
Alol	GAAcnnnnnnTCC	1	290
AlwNI	CAG_nnn'CTG	1	3093
ApaI	G_GGCC'C	1	664
ApaLI	G'TGCA_C	2	2991, 4237
ApoI	r'AATT_y	4	421, 432, 832, 1016
AvaI	C'yCGr_G	3	817, 1091, 2158
BamHI	G'GATC_C	1	2243
BanI	G'GyrC_C	4	197, 654, 2421, 3518
BanII	G_rGCy'C	4	167, 664, 874, 2283
Bce83I	CTTGAGnnnnnnnnnnnn'_nn'	5	1946, 2765, 3066, 3304, 4172
Bcefl	ACGGCnnnnnnnnnnnn'_n	5	211, 628, 1538, 1675, 3179
BcgI	CGAnnnnnnTGCnnnnnnnnnn'_nn'	2	2160, 4109
BcgI	GCAnnnnnnTCGnnnnnnnnnn'_nn'	2	2197, 4072
BciVI	GTATCCnnnnn'_n'	2	2878, 4405
BglI	GCCn_nnn'nGGC	2	476, 3690
BmgI	GkGCCC	1	662
BmrI	ACTGGG	2	590, 3616
BpmI	CTGGAGnnnnnnnnnnnnnn'_nn'	2	2264, 3637
Bpu10I	CC'TnA_GC	1	1238
BsaI	GGTCTCn'nnnn_	1	3634
BsaAI	yAC'GTr	1	238
BsaHI	Gr'CG_yC	1	4107
BsaWI	w'CCGG_w	4	1354, 2883, 3030, 3861
BsaXI	ACnnnnnCTCC	2	289, 2534
Bsbl	CAACAC	1	331
BseMII	CTCAGnnnnnnnn'_nn'	5	1250, 2966, 3375, 3541, 4055
BseRI	GAGGAGnnnnnnnn'_nn'	1	1943
BseSI	GkGCmC	3	662, 2993, 4239
BsiHKA1	G_wGCw'C	4	2283, 2995, 4156, 4241
BsmI	GAATG_Cn'	2	1100, 1177

BsmAI	GTCTCn'nnnn_	3	1235, 3634, 4407
BsmBI	CGTCTCn'nnnn_	1	1235
BsmFI	GGGACnnnnnnnnnn'nnnn_	2	1670, 2089
Bsp24I	GACnnnnnnTGnnnnnnn_nnnnn'	2	3202, 3380
Bsp24I	CCAnnnnnnGTCnnnnnnnn_nnnnn'	2	3164, 3342
BspLU11I	A'CATG_T	1	2677
BsrBI	CCG'CTC	5	94, 2260, 2369, 2609, 4410
BsrDI	GCAATG_nn'	4	708, 2024, 3631, 3802
BsrFI	r'CCGG_y	3	133, 1173, 3650
BssSI	C'ACGA_G	3	2230, 2853, 4237
BstDSI	C'CryG_G	2	2139, 2271
BstXI	CCAn_nnnn'nTGG	1	2275
BstZ17I	GTA'TAC	1	1953
BtsI	GCAAGT	5	1082, 1162, 2465, 3965, 3992
Clal	AT'CG_AT	1	910
DraI	TTT'AAA	3	3436, 3455, 4147
DraIII	CAC_nnn'GTG	1	241
DrdI	GACnn_nn'nnGTC	2	285, 2785
DrdII	GAACCA	1	232
EaeI	y'GGCC_r	4	613, 2262, 2516, 3958
EagI	C'GGCC_G	1	2262
EarI	CTCTTCn'hnn_	4	521, 1032, 2561, 4365
EciI	TCCGCC	5	1662, 2241, 2751, 2897, 3725
Eco57I	CTGAAGnnnnnnnnnnnnnnn'_nn'	2	3225, 4234
EcoNI	CCTnn'n_nnAGG	1	1131
EcoO109I	rG'GnC_Cy	1	661
FauI	CCCGCnnnn'nn_	5	31, 99, 503, 2477, 2520
FspI	TGC'GCA	3	483, 2222, 3792
GdiII	C'GGCC_r	4	613, 2262, 2516, 3961
HaeI	wGG'CCw	4	1306, 2692, 2703, 3155
HaeII	r_GCGC'y	4	83, 91, 2555, 2925
HaeIV	GAynnnnrTC	3	905, 1662, 3569
HgaI	GACGCnnnn'n'nnnn_	5	16, 1776, 2788, 3366, 4100
HgiEII	ACCnnnnnnGGT	1	3263
HindIII	A'AGCT_T	1	1337
KpnI	G_GTAC'C	1	658
MslI	CAynn'nrTG	4	2273, 3822, 3981, 4340
NcoI	C'CATG_G	1	2139
NgoAIV	G'CCGG_C	1	133
NotI	GC'GGCC_GC	1	2262
NruI	TCG'CGA	1	876
NsiI	A_TGCA'T	2	1069, 1335
NspI	r_CATG'y	1	2681
Pfl1108I	TCGTAG	1	3587
PflMI	CCAn_nnn'nTGG	1	1482
PpiI	GAGnnnnnGTTC	3	291, 3372, 4216
PsiI	TTA'TAA	1	366
PvuI	CG_AT'CG	3	504, 1219, 3940
PvuII	CAG'CTG	2	533, 2501
RcaI	T'CATG_A	3	737, 3397, 4405
SacI	G_AGCT'C	1	2283

SacII	CC_GC'GG	1	2274
SapI	GCTCTTCn'nnn_	1	2561
Scal	AGT'ACT	1	4050
SfeI	C'TryA_G	5	15, 639, 2942, 3133, 3811
Sgfl	GCG_AT'CGC	1	1219
SmaI	CCC'GGG	1	1093
SpeI	A'CTAG_T	3	1719, 1734, 2249
SspI	AAT'ATT	5	446, 1144, 1873, 1961, 4374
StyI	C'CwwG_G	1	2139
TaqII	GACCGAnnnnnnnnn_nn'	5	333, 1473, 2576, 3915, 4103
TaqII	CACCCAnnnnnnnnn_nn'	4	1666, 2025, 4256, 4270
TatI	w'GTAC_w	1	4048
Tth111II	CAArCAnnnnnnnnn_nn'	5	1055, 1179, 3267, 3271, 3306
VspI	AT'TA_AT	4	1418, 2448, 2507, 3742
XbaI	T'CTAG_A	1	2255
XhoI	C'TCGA_G	1	817
XmnI	GAAnn'nnTTC	1	4169

Enzimas que não cortam:

AarI, AatII, AflIII, AscI, AvrII, BaeI, BaeI, BbsI, BbvCI, BclI, BglII, BplI, BplI, Bpu1102I, BsaBI, BsgI, BspEI, BspGI, BspMI, BsrGI, BssHII, BstAPI, BstEII, Bsu36I, BtrI, Eco47III, EcoRI, EcoRV, FseI, HincII, HpaI, MluI, MscI, MunI, NarI, NdeI, NheI, NspV, PacI, PinAI, PmeI, PmlI, PshAI, Psp5II, PstI, RleAI, RsrII, SalI, SanDI, SbfI, SexAI, SfiI, SgrAI, SnaBI, SphI, SrfI, Sse8647I, StuI, SunI, SwaI, Tth111I, XcmI

**Tabela B2: Locais de restrição do vector pδ-UB**

Enzima	Local de reconhecimento	Nº de cortes	Locais de corte
AarI	CACCTGC	1	677
AccI	GT'mk_AC	4	876, 1516, 3294, 3799
AclI	AA'CG_TT	5	2489, 3715, 5182, 6957, 7330
AflIII	A'CryG_T	2	3148, 5838
AhdI	GACnn_n'nnGTC	1	6731
AloI	GAACnnnnnnTCC	1	287
AlwNI	CAG_nnn'CTG	4	1789, 3650, 4482, 6254
ApaI	G_GGCC'C	2	664, 3347
ApaLI	G'TGCA_C	2	6152, 7398
AvaI	C'yCGr_G	3	901, 1554, 3848
BamHI	G'GATC_C	1	5400
BanII	G_rGCy'C	5	164, 664, 3347, 3440, 5444
BbsI	GAAGACnn'nnnn_	1	3243
Bce83I	CTTGAGnnnnnnnnnnnn_nn'	4	5926, 6227, 6465, 7333
BcgI	CGAnnnnnnTGCnnnnnnnnnn_nn'	3	2450, 5143, 7270
BcgI	GCAnnnnnnTCGnnnnnnnnnn_nn'	3	2413, 5106, 7233
BciVI	GTATCCnnnnn_n'	2	6039, 7566
BglI	GCCn_nnn'nGGC	2	473, 6851
BmgI	GkGCCC	3	662, 3182, 3345
BmrI	ACTGGG	4	587, 2912, 4184, 6777
BpmI	CTGGAGnnnnnnnnnnnn_nn'	4	3122, 3471, 5425, 6798

Bpu10I	CC'TnA_GC	1	3701
BsaI	GGTCTCn'nnnn_	4	2191, 3643, 4884, 6795
BsaAI	yAC'GTr	3	235, 2611, 5304
BsaBI	GATnn'nnATC	2	1820, 4513
BsaXI	ACnnnnnCTCC	2	286, 5695
BseRI	GAGGAGnnnnnnnn'_nn'	3	886, 2063, 4756
BseSI	GkGCmC	5	662, 3183, 3345, 6154, 7400
BsgI	GTGCAGnnnnnnnnnnnn'_nn'	1	2912
BsmI	GAATG_Cn'	1	3331
BsmBI	CGTCTCn'nnnn_	3	2110, 3594, 4803
BsmFI	GGGACnnnnnnnnnn'_nnnn_	3	2036, 3111, 4729
BspGI	CTGGAC	2	2041, 4734
BspLU11I	A'CATG_T	2	3148, 5838
BspMI	ACCTGCnnnn'nnnn_	2	669, 2954
BsrDI	GCAATG'_nn'	3	3474, 6792, 6963
BssSI	C'ACGA_G	4	1737, 4430, 6014, 7398
BstDSI	C'CryG_G	5	2505, 3174, 3624, 5198, 5432
BstXI	CCAn_nnnn'nTGG	1	5436
BstZ17I	GTA'TAC	3	877, 3295, 3800
BtsI	GCAAGT	3	5626, 7126, 7153
Clal	AT'CG_AT	4	1525, 2304, 2737, 4997
DraI	TTT'AAA	5	2113, 4806, 6597, 6616, 7308
DraIII	CAC_nnn'GTG	4	238, 3335, 3337, 3575
DrdI	GACnn'_nn'nnGTC	2	282, 5946
DrdII	GAACCA	3	229, 2132, 4825
EagI	C'GGCC_G	3	2031, 4724, 5423
Eco47III	AGC'GCT	3	2523, 4113, 5216
Eco57I	CTGAAGnnnnnnnnnnnn'_nn'	2	6386, 7395
EcoNI	CC'Tnn'n'_nnAGG	2	2390, 5083
EcoO109I	rG'GnC_Cy	2	661, 3122
EcoRI	G'AATT_C	1	1542
EcoRV	GAT'ATC	5	1538, 1822, 3157, 4066, 4515
FspI	TGC'GCA	3	480, 4141, 6953
HaeIV	GAynnnnnrTC	2	2729, 6730
HgiEII	ACCnnnnnnGGT	1	6424
HincII	G'Ty'rAC	5	1517, 2011, 3475, 3611, 4704
HindIII	A'AGCT_T	3	1530, 2742, 3908
KpnI	G_GTAC'C	1	658
NarI	GG'CG_CC	4	2415, 2529, 5108, 5222
NcoI	C'CATG_G	3	2505, 3174, 5198
NdeI	CA'TA_TG	2	1203, 2882
NgoAIV	G'CCGG_C	1	130
NheI	G'CTAG_C	1	4108
NotI	GC'GGCC_GC	1	5423
NsiI	A_TGCA'T	1	3796
NspI	r_CATG'y	5	1813, 3152, 3798, 4506, 5842
NspV	TT'CG_AA	1	3234
Pfl1108I	TCGTAG	1	6748
PinAI	A'CCGG_T	4	1644, 2005, 4337, 4698
PpiI	GAGnnnnnGTTC	3	288, 6533, 7377
PsiI	TTA'TAA	3	363, 3784, 3876

Psp5II	rG'GwC_Cy	1	3122
PstI	C_TGCA'G	2	1552, 2951
PvuI	CG_AT'CG	4	501, 2556, 5249, 7101
PvuII	CAG'CTG	2	530, 5662
RcaI	T'CATG_A	4	2361, 5054, 6558, 7566
RleAI	CCCACAnnnnnnnnn_nnn'	1	3563
SacI	G_AGCT'C	1	5444
SacII	CC_GC'GG	1	5435
Sall	G'TCGA_C	1	1515
SapI	GCTCTTCn'nnn_	4	1907, 3481, 4600, 5722
Sbfl	CC_TGCA'GG	1	2951
Scal	AGT'ACT	2	3281, 7211
SmaI	CCC'GGG	2	1556, 3850
SmlI	C'TyrA_G	5	901, 5944, 6206, 6483, 7351
SnaBI	TAC'GTA	2	2611, 5304
SpeI	A'CTAG_T	3	1092, 1107, 5410
SspI	AAT'ATT	4	443, 869, 957, 7535
StuI	AGG'CCT	3	2606, 3405, 5299
StyI	C'CwwG_G	4	2505, 3090, 3174, 5198
TaqII	GACCGAnnnnnnnnn_nn'	5	330, 3845, 5737, 7076, 7264
TaqII	CACCCAnnnnnnnnn_nn'	4	804, 3518, 7417, 7431
TatI	w'GTAC_w	3	3216, 3279, 7209
VspI	AT'TA_AT	5	1770, 4463, 5609, 5668, 6903
XbaI	T'CTAG_A	1	5416
XcmI	CCAnnnn_n'nnnnTGG	3	2539, 3097, 5232
XhoI	C'TCGA_G	1	901
XmnI	GAAnn'nnTTC	1	7330

Enzimas que não cortam:

AatII, AflIII, AscI, AvrII, BaeI, BaeI, BbvCI, BclI, BglIII, BplI, BplI, Bpu1102I, BspEI, BsrGI, BstAPI, BstEII, Bsu36I, BtrI, FseI, HpaI, MluI, MscI, MunI, NruI, PacI, PflMI, PmeI, PmlI, PshAI, RsrII, SanDI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SphI, SrfI, Sse8647I, SunI, SwaI, Tth111I

**Tabela B3: Locais de restrição do gene *lacA***

Enzima	Local de Reconhecimento	Nº de cortes	Locais de corte
AccI	GT'mk_AC	5	224, 1656, 1960, 1990, 2784
AceIII	CAGCTCnnnnnnn'nnnn_	1	2373
AflIII	A'CryG_T	1	1427
AhdI	GACnn_n'nnGTC	2	1204, 1663
ApaI	G_GGCC'C	1	311
ApoI	r'AATT_y	4	2, 207, 636, 1693
AvaI	C'yCGr_G	3	830, 2613, 2851
BamHI	G'GATC_C	1	1593
BanI	G'GyrC_C	1	1733
BanII	G_rGCy'C	1	311
BbsI	GAAGACnn'nnnn_	4	676, 1344, 2554, 2635
BbvCI	CC'TCA_GC	2	1381, 2359

Bce83I	CTTGAGnnnnnnnnnnnnn_nn'	5	473, 888, 1137, 2091, 2436
BcgI	CGAnnnnnnTGCnnnnnnnnnn_nn'	2	2014, 2356
BcgI	GCAAnnnnnnTCGnnnnnnnnnn_nn'	2	1977, 2319
BciVI	GTATCCnnnnn_n'	2	1075, 2179
BclI	T'GATC_A	2	706, 2386
BglI	GCCn_nnn'nGGC	1	45
BmgI	GkGCCC	1	309
BmrI	ACTGGG	2	1059, 1731
BpII	GAGnnnnnCTCnnnnnnnnn_nnnnn'	2	2640, 2678
BpII	GAGnnnnnCTCnnnnnnnnn_nnnnn'	2	2640, 2678
Bpml	CTGGAGnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	3	2346, 2673, 2938
Bpu10I	CC'TnA_GC	2	1381, 2359
Bpu1102I	GC'TnA_GC	1	2590
BsaI	GGTCTCn'nnnn_	2	2586, 2664
BsaAI	yAC'GTr	2	1430, 2048
BsaBI	GATnn'nnATC	1	192
BsaHI	Gr'CG_yC	2	66, 1903
BsaWI	w'CCGG_w	5	1227, 2060, 2184, 2520, 3113
BsaXI	ACnnnnnCTCC	2	2067, 2982
Bsbl	CAACAC	1	632
BseMII	CTCAGnnnnnnnnn_nn'	5	1395, 2373, 2578, 2653, 2845
BseRI	GAGGAGnnnnnnnnn_nn'	2	2433, 3132
BseSI	GkGCmC	1	309
BsgI	GTGCAGnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	1	2798
BsiEI	CG_ry'CG	1	1477
BsiHKAI	G_wGCw'C	4	957, 1525, 1546, 2235
BsmI	GAATG_Cn'	1	104
BsmAI	GTCTCn'nnnn_	4	536, 1451, 2586, 2664
BsmBI	CGTCTCn'nnnn_	1	536
Bsp24I	GACnnnnnnTGGnnnnnnnnn_nnnnn'	4	557, 1765, 2054, 2989
Bsp24I	CCAnnnnnnGTCnnnnnnnnn_nnnnn'	4	595, 1803, 2016, 2951
Bsp1286I	G_dGCh'C	5	311, 957, 1525, 1546, 2235
BspEI	T'CCGG_A	2	2060, 3113
BspGI	CTGGAC	3	413, 2311, 2428
BspMI	ACCTGCnnnn'nnnn_	5	384, 409, 2200, 2716, 2773
BsrFI	r'CCGG_y	3	687, 1362, 2916
BsrGI	T'GTAC_A	1	652
BssSI	C'ACGA_G	1	1521
BstAPI	GCA_n_nnn'nTGC	2	57, 552
BstDSI	C'CryG_G	3	1471, 2201, 2218
BstEII	G'GTnAC_C	3	834, 1062, 2892
BstXI	CCAn_nnnn'nTGG	2	2509, 2651
BstYI	r'GATC_y	2	1593, 2065
BtrI	CAC'GTC	1	539
BtsI	GCA GTG	1	1914
Clal	AT'CG_AT	1	2245
DrdI	GACnn_nn'nnGTC	2	1512, 1628
DrdII	GAACCA	2	1104, 1455
EaeI	y'GGCC_r	4	118, 776, 1474, 2489
EagI	C'GGCC_G	1	1474
EarI	CTCTTCn'nnn_	4	490, 1320, 1631, 2062

Eco57I	CTGAAGnnnnnnnnnnnnnnn'_nn'	4	179, 222, 1860, 2046
EcoNI	CCTnn'n_nnAGG	3	931, 2712, 2976
EcoO109I	rG'GnC_Cy	5	308, 1514, 1685, 2441, 2562
EcoRI	G'AATT_C	2	2, 636
EcoRV	GAT'ATC	2	2009, 2798
GdiII	C'GGCC_r	4	118, 776, 1474, 2489
HaeI	wGG'CCw	1	2317
HaeII	r_GCGC'y	3	2502, 2597, 2692
HaeIV	GAynnnnrTC	5	160, 1203, 1662, 1945, 2722
HgaI	GACGCnnnnn'nnnnn_	4	59, 384, 1420, 1896
HgiEII	ACCnnnnnnGGT	3	575, 795, 1361
HindIII	A'AGCT_T	3	15, 1341, 2933
MmeI	TCCrACnnnnnnnnnnnnnnnn'_nn'	2	2356, 2905
MslI	CAynn'nrTG	2	2394, 2958
MspAII	CmG'ckG	2	1849, 2203
MunI	C'AATT_G	1	550
NdeI	CA'TA_TG	1	890
NgoAIV	G'CCGG_C	1	2916
NspI	r_CATG'y	1	659
PflI108I	TCGTAG	3	1095, 2079, 2544
PleI	GAGTCnnnn'n_	5	480, 1334, 1607, 2904, 2993
PmlI	CAC'GTG	1	1430
PpiI	GAGnnnnnGTTC	1	986
Psp5II	rG'GwC_Cy	4	1514, 1685, 2441, 2562
RcaI	T'CATG_A	2	10, 190
RsrII	CG'GwC_CG	1	579
SacII	CC_GC'GG	1	2204
SalI	G'TCGA_C	3	1655, 1959, 1989
SexAI	A'CCwGG_T	1	1763
SfeI	C'TryA_G	4	517, 1313, 1984, 2684
SgrAI	Cr'CCGG_yG	1	687
SmlI	C'TyrA_G	5	491, 867, 1155, 2109, 2415
SpeI	A'CTAG_T	1	615
Sse8647I	AG'GwC_CT	3	1514, 2441, 2562
StyI	C'CwwG_G	5	908, 927, 2528, 2597, 2972
SunI	C'GTAC_G	1	919
TaqII	GACCGAnnnnnnnnn'_nn'	1	1449
TaqII	CACCCAnnnnnnnnn'_nn'	1	1718
TatI	w'GTAC_w	4	610, 652, 2158, 3004
Tth111I	GACn'n_nGTC	1	2553
Tth111III	CAArCAnnnnnnnnn'_nn'	4	390, 2127, 2465, 2509
XcmI	CCAnnnn_n'nnnnTGG	1	570
XmnI	GAAAn'nnTTC	2	1497, 1926

Enzimas que não cortam:

AarI, AatII, AclI, AflIII, AfoI, AlwNI, ApaLI, AscI, AvrII, BaeI, BaeI, BglII, BspLU11I, BsrBI, BsrDI, BssHII, BstZ17I, Bsu36I, DraI, DraIII, EciI, Eco47III, FseI, FspI, HpaI, KpnI, MluI, MscI, NarI, NcoI, NheI, NotI, NruI, NsiI, NspV, PacI, PflMI, PinAI, PmeI, PshAI, PstI, PstI, PvuI, PvuII, RleAI, SacI, SanDI, SapI, SbfI, ScaI, SfiI, SgfI, SmaI, SnaBI, SphI, SrfI, SspI, StuI, SwaI, VspI, XbaI, XhoI

**Tabela B4: Locais de restrição do promotor *ADH1***

Enzima	Local de reconhecimento	Nº de cortes	Locais de corte
AccI	GT <sup>m</sup> mk <sub>AC</sub>	2	381, 1266
AceIII	CAGCTCnnnnnnn'nnnn <sub>AC</sub>	1	1177
AflIII	A <sup>C</sup> CryG <sub>T</sub>	1	840
ApaLI	G <sup>T</sup> TGCA <sub>C</sub>	1	592
ApoI	r <sup>A</sup> AATT <sub>y</sub>	1	1291
BanI	G <sup>G</sup> GyrC <sub>C</sub>	1	115
BbsI	GAAGACnn'nnnn <sub>AC</sub>	1	1134
BceI	ACGGCnnnnnnnnnnn'n <sub>AC</sub>	1	1285
BglI	GCCn <sub>nnn</sub> 'nGGC	1	187
BmgI	GkGCCC	1	215
Bpu10I	CC <sup>T</sup> nA <sub>GC</sub>	1	263
BsaI	GGTCTCn'nnnn <sub>AC</sub>	1	836
BsaBI	GATnn'nnATC	1	979
BsaHI	Gr <sup>C</sup> CG <sub>yC</sub>	1	116
BsaII	C <sup>C</sup> nnG <sub>G</sub>	2	245, 723
BsbI	CAACAC	2	89, 544
BseMII	CTCAGnnnnnnnn <sub>nn'</sub>	1	347
BseSI	GkGCmC	2	215, 594
BsgI	GTGCAGnnnnnnnnnnnn <sub>nn'</sub>	1	1388
BsiHKA1	G <sub>w</sub> GCw <sup>C</sup>	1	596
BsII	CCnn <sub>nnn</sub> 'nnGG	1	804
BsmI	GAATG <sub>Cn'</sub>	1	295
BsmAI	GTCTCn'nnnn <sub>AC</sub>	4	406, 460, 836, 1097
BsmBI	CGTCTCn'nnnn <sub>AC</sub>	2	406, 460
Bsp24I	GACnnnnnnTGGnnnnnnnn <sub>nnnnn'</sub>	1	1151
Bsp24I	CCAnnnnnnGTCnnnnnnnn <sub>nnnnn'</sub>	1	1189
Bsp1286I	G <sub>d</sub> GCh <sup>C</sup>	2	217, 596
BspLU11I	A <sup>C</sup> CATG <sub>T</sub>	1	840
BspMI	ACCTGCnnnn'nnnn <sub>AC</sub>	1	1348
BsrI	ACTG <sub>Gn'</sub>	4	332, 515, 551, 1278
BsrDI	GCAATG <sub>nn'</sub>	1	1113
BsrFI	r <sup>C</sup> CGG <sub>y</sub>	3	181, 293, 422
BsrGI	T <sup>G</sup> TAC <sub>A</sub>	1	761
BstDSI	C <sup>C</sup> CryG <sub>G</sub>	1	723
BstEII	G <sup>G</sup> TnAC <sub>C</sub>	1	249
BstZ17I	GTA <sup>T</sup> TAC	2	382, 1267
BtsI	GCAGTG	1	923
Cac8I	GCn'nGC	3	183, 236, 1046
CjeI	CCAnnnnnnGTnnnnnnnn <sub>nnnnn'</sub>	5	304, 529, 687, 804, 1190
CjeI	ACnnnnnnTGGnnnnnnnn <sub>nnnnn'</sub>	5	345, 570, 646, 845, 1149
CjePI	GAnnnnnnnTGGnnnnnnnn <sub>nnnnn'</sub>	2	998, 1150
CjePI	CCAnnnnnnnTCnnnnnnnn <sub>nnnnn'</sub>	2	1038, 1190
EarI	CTCTTCn'nnn <sub>AC</sub>	1	488
EciI	TCCGCC	3	165, 220, 851
EcoRV	GAT <sup>A</sup> ATC	1	740

FauI	CCCGCnnnnn'nn_	1	178
HaeII	r_GCGC'y	1	119
HgaI	GACGCnnnnn'nnnnn_	2	420, 474
HgiEII	ACCnnnnnnGGT	1	826
Hin4I	GAbnnnnnvTC	1	172
HphI	GGTGAnnnnnnn'_n'	2	472, 1085
Hpy178III	TCnnGA	2	807, 1184
MboII	GAAGAnnnnnnn'_n'	5	400, 503, 1139, 1192, 1378
MslI	CAynn'nnrTG	3	148, 587, 845
MunI	C'AATT_G	1	138
MwoI	GCnn_enn'nnGC	2	187, 428
NarI	GG'CG_CC	1	116
NgoAIV	G'CCGG_C	1	181
NgoGV	GGnnCC	2	117, 169
NlaIV	GGn'nCC	2	117, 169
NspI	r_CATG'y	2	844, 1048
NspV	TT'CG_AA	1	1205
Pacl	TTA_AT'TAA	1	655
PleI	GAGTCnnnn'n_	1	150
Scal	AGT'ACT	1	485
SfeI	C'TryA_G	1	959
SphI	G_CATG'C	1	1048
SspI	AAT'ATT	2	731, 1414
StyI	C'CwwG_G	1	245
TaqII	CACCCAnnnnnnnnn'_nn'	1	574
TatI	w'GTAC_w	2	483, 761
TspRI	_nnCAsTGnn'	2	551, 928
Tth111III	CAArCAnnnnnnnnn'_nn'	2	549, 1445
VspI	AT'TA_AT	2	651, 1350

Enzimas que não cortam:

AarI, AatII, AclI, AflIII, AhdI, AhoI, AlwI, AlwNI, ApaI, AscI, AvaI, AvrII, BaeI, BamHI, BanII, BbvI, BbvCI, Bce83I, BcgI, BcgI, BciVI, BclI, BglII, BmrI, BplI, BpmI, Bpu1102I, BsaAI, BsaWI, BsaXI, BseRI, BsiEI, BsmFI, BspEI, BspGI, BsrBI, BssHII, BssSI, BstAPI, BstXI, BstYI, Bsu36I, BtrI, ClaI, DraI, DraIII, DrdI, DrdII, EaeI, EagI, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoO109I, EcoRI, FokI, FseI, FspI, GdiII, HaeI, HaeIV, HincII, HindIII, HpaI, KpnI, MluI, MmeI, MscI, MspAII, NcoI, NdeI, NheI, NotI, NruI, NsiI, Pfl1108I, PflMI, PinAI, PmeI, PmlI, PpiI, PshAI, PsiI, Psp5II, PstI, PvuI, PvuII, RcaI, RleAI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SanDI, SapI, SbfI, SexAI, SfaNI, SfiI, SgfI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SrfI, Sse8647I, StuI, SunI, SwaI, TaqII, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmnI

**Tabela B5: Locais de restrição do terminador *ADH1***

Enzima	Local de reconhecimento	Nº de cortes	Locais de corte
AccI	GT'mk_AC	1	63
ApoI	r'AATT_y	3	7, 68, 101
Bce83I	CTTGAGnnnnnnnnnnnn'_nn'	1	133
BpmI	CTGGAGnnnnnnnnnnnn'_nn'	1	233
BseMII	CTCAGnnnnnnnn'_nn'	2	161, 307
BsrDI	GCAATG'_nn'	1	263

BsrFI	r'CCGG_y	1	188
BstZ17I	GTA'TAC	1	64
Cac8I	GCn'nGC	2	194, 209
DraI	TTT'AAA	2	74, 93
Hin4I	GAbnnnnnvTC	1	180
HphI	GGTGAnnnnnnn_n'	1	218
Hpy178III	TCnnGA	1	113
MnII	CCTCnnnnnn_n'	4	152, 193, 288, 302
MunI	C'AATT_G	1	233
MwoI	GCnn_nnn'nnGC	1	198
NspI	r_CATG'y	1	196
PleI	GAGTCnnnn'n_	1	74
PsiI	TTA'TAA	1	47
SfcI	C'TryA_G	1	128
SmlI	C'TyrA_G	1	112
SphI	G_CATG'C	1	196
TaqII	CACCCAnnnnnnnnn_nn'	1	245

Enzimas que não cortam:

AarI, AatII, AceIII, AclI, AflIII, AflIII, AhdI, AhoI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, AscI, AvaI, AvrII, BaeI, BaeI, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvI, BbvCI, BceI, BcgI, BcgI, BciVI, BclI, BglI, BglII, BmgI, BmrI, BpII, BpII, Bpu10I, Bpu102I, BsaI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BsbI, BseRI, BseSI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BslI, BsmI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, Bsp24I, Bsp24I, Bsp1286I, BspEI, BspGI, BspLU11I, BspMI, BsrI, BsrBI, BsrGI, BssHII, BssSI, BstAPI, BstDSI, BstEII, BstXI, BstYI, Bsu36I, BtrI, BtsI, CjeI, CjeI, CjePI, CjePI, ClaI, DraIII, DrdI, DrdII, EaeI, EagI, EarI, EciI, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoO109I, EcoRI, EcoRV, FauI, FokI, FseI, FspI, GdiII, HaeI, HaeII, HaeIV, Hgal, HgiEII, HincII, HindIII, HpaI, KpnI, MboII, MluI, MmeI, MscI, MslI, MspAII, NarI, NcoI, NdeI, NgoAIV, NgoGV, NheI, NlaIV, NotI, NruI, NsiI, NspV, PacI, Pfl1108I, PflMI, PinAI, PmeI, PmlI, PpiI, PshAI, Psp5II, PstI, PvuI, PvuII, RcaI, RleAI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SanDI, SapI, SbfI, ScaI, SexAI, SfaNI, SfiI, SgfI, SgrAI, SmaI, SnaBI, SpeI, SrfI, Sse8647I, SspI, Sth132I, StuI, Styl, SunI, SwaI, TaqII, TatI, TspRI, Tth111I, Tth111III, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XmnI

**Tabela B6: Locais de restrição do gene *URA***

Enzima	Local de reconhecimento	Nº de cortes	Locais de cortes
AccI	GT'mk_AC	2	549, 1054
AclI	AA'CG_TT	1	970
AflIII	A'CryG_T	1	403
AlwI	GGATCnnnn'n_	1	910
AlwNI	CAG_nnn'CTG	1	905
ApaI	G_GGCC'C	1	602
ApoI	r'AATT_y	3	58, 384, 500
AvaI	C'yCGr_G	1	1103
BanII	G_rGCy'C	2	602, 695
BbsI	GAAGACnn'nnnn_	1	498
BbvI	GCAGCnnnnnnnn'nnnn_	2	241, 265
BmgI	GkGCCC	2	437, 600
BmrI	ACTGGG	1	167
Bpml	CTGGAGnnnnnnnnnnnn_nn'	2	377, 726
Bpu10I	CC'TnA_GC	1	956

BsaI	GGTCTCn'nnnn_	1	898
BsaJI	C'CnnG_G	5	345, 429, 601, 879, 1103
Bsbl	CAACAC	1	145
BseSI	GkGCmC	2	438, 600
BsgI	GTGCAGnnnnnnnnnnnn'_nn'	1	167
BsiEI	CG_ry'CG	1	1117
BsiHKAI	G_wGCw'C	1	111
BsII	CCnn_enn'nnGG	1	833
BsmI	GAATG_Cn'	1	586
BsmAI	GTCTCn'nnnn_	3	777, 849, 898
BsmBI	CGTCTCn'nnnn_	1	849
BsmFI	GGGACnnnnnnnnnn'_nnnn_	1	366
Bsp24I	GACnnnnnnTGnnnnnnnn'_nnnnn'	1	137
Bsp24I	CCAnnnnnnGTCnnnnnnnn'_nnnnn'	1	99
Bsp1286I	G_dGCh'C	4	111, 440, 602, 695
BspLU11I	A'CATG_T	1	403
BspMI	ACCTGCnnnn'_nnnn_	1	209
BsrI	ACTG_Gn'	3	164, 360, 709
BsrDI	GCAATG_enn'	1	729
BstDSI	C'CryG_G	2	429, 879
BstYI	r'GATC_y	1	902
BstZ17I	GTA'TAC	2	550, 1055
Cac8I	GCn'nGC	3	627, 985, 1016
CjeI	CCAnnnnnnGTnnnnnnnnnn'_nnnnnn'	5	98, 406, 569, 627, 809
CjeI	ACnnnnnnTGnnnnnnnnnn'_nnnnnn'	5	139, 365, 610, 586, 850
CjePI	GAnnnnnnnTGnnnnnnnnnn'_nnnnnn'	2	138, 876
CjePI	CCAnnnnnnnTCnnnnnnnnnn'_nnnnnn'	2	98, 836
DrallI	CAC_enn'GTG	3	590, 592, 830
EaeI	y'GGCC_r	1	1012
EarI	CTCTTCn'nnn_	4	491, 736, 789, 921
EciI	TCCGCC	1	466
EcoO109I	rG'GnC_Cy	1	377
EcoRV	GAT'ATC	1	412
FauI	CCCGCnnnn'_nn_	1	536
FokI	GGATGnnnnnnnnnn'_nnnn_	4	249, 344, 896, 962
GdiII	C'GGCC_r	1	1012
HaeI	wGG'CCw	1	660
HgaI	GACGCnnnn'_nnnn_	1	863
Hin4I	GAbnnnnnvTC	1	891
HincII	GTy'rAC	2	730, 866
HphI	GGTGAnnnnnnn'_n'	1	977
Hpy178III	TCnnGA	1	416
MmeI	TCCrACnnnnnnnnnnnnnnnnnn'_nn'	1	898
MnII	CCTCnnnnnn'_n'	4	425, 648, 918, 953
MwoI	GCnn_enn'nnGC	3	304, 464, 566
NcoI	C'CATG_G	1	429
NdeI	CA'TA_TG	1	137
NgoGV	GGnnCC	4	379, 600, 651, 694
NlaIV	GGn'nCC	4	379, 600, 651, 694
NsiI	A_TGCA'T	1	1051
NspI	r_CATG'y	2	407, 1053

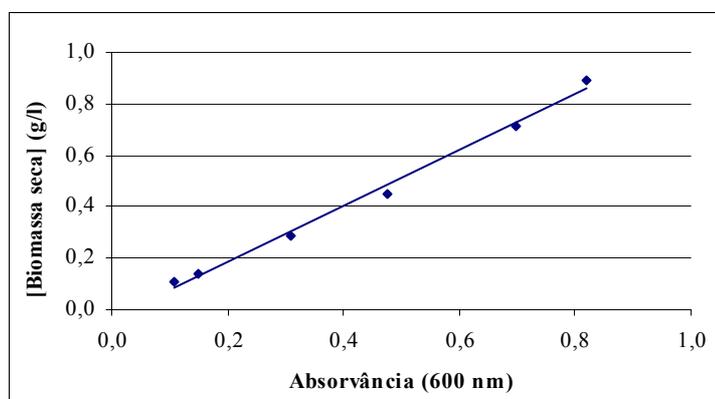
---

NspV	TT <sup>+</sup> CG_AA	1	489
PsiI	TTA <sup>+</sup> TAA	2	1039, 1131
Psp5II	rG'GwC_Cy	1	377
PstI	C_TGCA'G	1	206
RleAI	CCCACAnnnnnnnnn_nnn'	1	818
SapI	GCTCTTCn'nnn_	1	736
SbfI	CC_TGCA'GG	1	206
Scal	AGT'ACT	1	536
SfaNI	GCATCnnnnn'nnnn_	2	943, 1001
SfeI	C'TryA_G	2	202, 897
SmaI	CCC'GGG	1	1105
Sth132I	CCCGnnnn'nnnn_	4	537, 834, 1099, 1110
StuI	AGG'CCT	1	660
StyI	C'CwwG_G	2	345, 429
TaqII	GACCGAnnnnnnnnn_nn'	1	1100
TaqII	CACCCAnnnnnnnnn_nn'	1	773
TatI	w'GTAC_w	2	471, 534
Tth111II	CAArCAnnnnnnnnn_nn'	1	324
XcmI	CCAnnnn_n'nnnnTGG	1	352

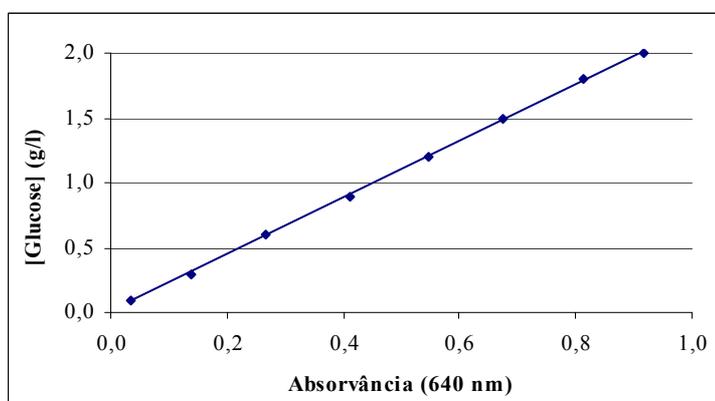
---

## Enzimas que não cortam:

AarI, AatII, AceIII, AflII, AhdI, Aloi, ApaLI, AscI, AvrII, BaeI, BaeI, BamHI, BanI, BbvCI, Bce83I, BceII, BcgI, BcgI, BciVI, BclI, BglI, BglII, BplI, BplI, Bpu1102I, BsaAI, BsaBI, BsaHI, BsaWI, BsaXI, BseMII, BseRI, BspEI, BspGI, BsrBI, BsrFI, BsrGI, BssHII, BssSI, BstAPI, BstEII, BstXI, Bsu36I, BtrI, BtsI, ClaI, DraI, DrdI, DrdII, EagI, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoRI, FseI, FspI, HaeII, HaeIV, HgiEII, HindIII, HpaI, KpnI, MluI, MscI, MslI, MspAII, MunI, NarI, NgoAIV, NheI, NotI, NruI, PacI, Pfl1108I, PflMI, PinAI, PleI, PmeI, PmlI, PpiI, PshAI, PvuI, PvuII, RcaI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SanDI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8647I, SspI, SunI, SwaI, TspRI, Tth111I, VspI, XbaI, XhoI, XmnI

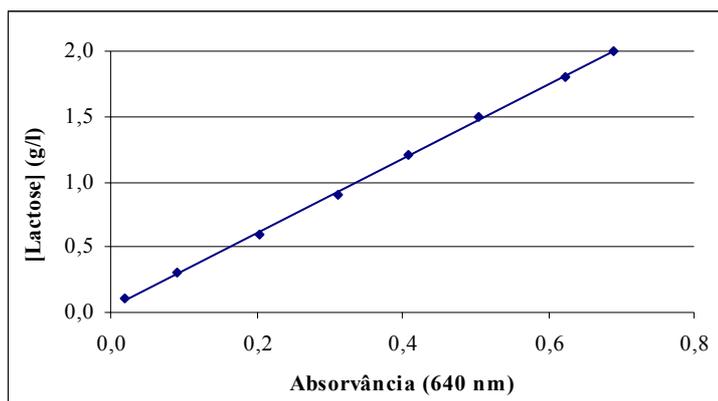
**Anexo C – Curvas de calibração**

$$[\text{Biomassa seca}] (\text{g/l}) = (1,086 \pm 0,133) \times \text{Absorvância (600 nm)} - (0,033 \pm 0,067)$$
$$R^2 = 0,992$$

**Figura C1: Curva de calibração para a quantificação da biomassa.**

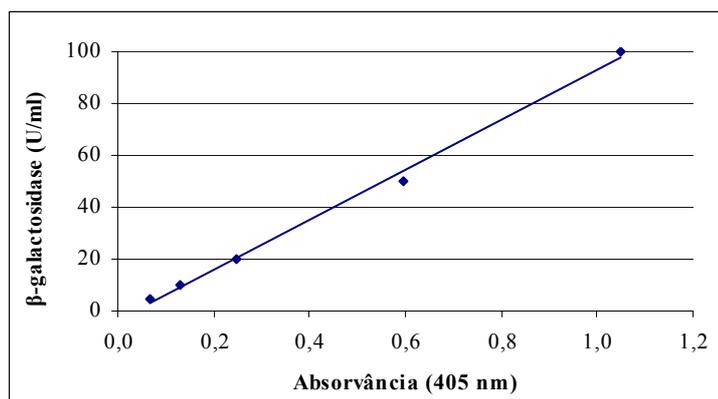
$$[\text{Glucose}] (\text{g/l}) = (2,181 \pm 0,037) \times \text{Absorvância (640 nm)} + (0,014 \pm 0,021)$$
$$R^2 = 0,999$$

**Figura C2: Curva de calibração para a quantificação da glucose.**



$$[\text{Lactose}] \text{ (g/l)} = (2,844 \pm 0,067) \times \text{Absorv\~{a}ncia (640 nm)} + (0,035 \pm 0,029)$$
$$R^2 = 0,999$$

**Figura C3: Curva de calibração para a quantificação da lactose.**



$$\beta\text{-galactosidase (U/ml)} = (96,272 \pm 11,570) \times \text{Absorv\~{a}ncia (405 nm)} - (3,145 \pm 6,407)$$
$$R^2 = 0,996$$

**Figura C4: Curva de calibração para a quantificação da actividade de β-galactosidase.**