

Prot  ria
gen  tica

CITOGÉNICA GENÉTICA MOLECULAR E MICROBIOLÓGICA
GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS
GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL
GENÉTICA HUMANA E MÉDICA
EVOUÇÃO E GENÉTICA DAS POPULAÇÕES
DA DIFERENCIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO

EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM A α -AMILASE EM **SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

ALTINO BRANCO CHOUPINA

Licenciado em Biologia/Geologia (Universidade dos Açores)
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Universidade Técnica de Lisboa)
Doutorando em Bioquímica e Biologia Molecular (Universidade de Salamanca)
Docente na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança
e na Escola Superior de Educação do Instituto Jean Piaget

1. INTRODUÇÃO

Os componentes contidos no amido são utilizados principalmente como reserva de alimentos para a produção de etanol, soluções alcoólicas bebíveis (licores, etc.) e cerveja. A *Saccharomyces cerevisiae*, porque realiza a fermentação, é o produtor mais importante para estes produtos alcoólicos, carecendo contudo de actividades amilolíticas. Assim, para a utilização de substratos de amido pela levedura é necessário hidrolizar o amido em glucose, maltose e maltotriose, os quais já são aceites e metabolizados pelo sistema enzimático da levedura.

A hidrólise do amido pode ser realizada de várias formas, por exemplo, pelo tratamento enzimático depois de termoaquecido.

A indústria actualmente utiliza o enzima α -amilase do *Bacillus amyloliquefaciens* que se dissolve facilmente e é bastante termoestável, e também (gluco)-amilases de alguns fungos, mas, estes microrganismos não realizam a fermentação e por isso não podem utilizar-se na obtenção de álcool a partir do substrato amido.

Com a ajuda da tecnologia do DNA recombinante é agora possível manipular leveduras de forma a introduzir e a expressar nelas genes que codificam enzimas amilolíticas.

No mundo contemporâneo o álcool ganhou grande importância não só pela sua utilização na farmácia, na indústria química e em bebidas mas também como combustível, a procura de etanol aumenta dia a dia sobretudo em países como o Brasil onde já há mais de 2 milhões de veículos movidos exclusivamente a álcool. É portanto de interesse tecnológico o aproveitamento de matérias primas alternativas à cana-do-açúcar, de entre as quais se encontram as matérias primas amiláceas.

Vários genes de amilase foram já clonados e expressos em *Saccharomyces cerevisiae*, estando de entre eles os de α -amilase (1,4- α -D.glucanohidrolase), que quebra as ligações (α -1,4-glicosídicas) das moléculas de glucose no amido, no glicogénio e nas dextrinas desdobrando-os em glucose, maltose e oligossacarídeos ramificados.

Estas endomilases são acessíveis a partir de várias fontes.

Recentemente, os genes que codificam a α -amilase em eucariontes (pâncreas de camundongo e em fungos) têm sido clonados e expressos em leveduras através de várias manipulações genéticas.

Neste trabalho procura-se estudar a expressão de genes da α -amilase em *Saccharomyces cerevisiae*.

2. EXPRESSÃO DO GENE α -AMILASE DE CAMUNDONGO EM *S. CEREVISIAE*

Nos últimos anos um grupo de pesquisa no Brasil empreendeu um programa de melhoramento genético de *Saccharomyces cerevisiae* com o objetivo de introduzir neste organismo. Para que isso fosse possível construíram num plasmídeo do tipo YEp uma fusão genética compreendendo a região promotora e a região codificadora dos sinais de secreção de um peptídeo da própria levedura (o foromónio α), o cDNA da α -amilase pancreática de camundongo e os sinais de terminação da transcrição do gene FLP da levedura. A transformação genética de várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com este plasmídeo híbrido resultou na obtenção de células capazes de secretar activamente α -amilase para o meio de cultura. Numa etapa seguinte o plasmídeo foi integrado no cromossoma III da célula hospedeira ficando desta forma estabilizada a informação genética do camundongo entre a descendência da célula da levedura originalmente transformada.

3. EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA A α -AMILASE DE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Desde 1987 que um grupo de cientistas da Academia de Wissenschaften, na antiga República Democrática Alemã, tem vindo a realizar trabalhos no sentido de expressar genes que codificam a α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* em *Saccharomyces cerevisiae*.

Num desses trabalhos um fragmento do DNA de *Bacillus amyloliquefaciens* que codifica a α -amilase foi clonado e combinado com o promotor ADH1 da levedura num plasmídeo híbrido de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (PAAH5), vector usado na transformação de estirpes laboratoriais de *Saccharomyces cerevisiae*.

A expressão em leveduras do gene de *Bacillus* foi tida como dependendo essencialmente da actividade do promotor ADH, da levedura no plasmídeo PAAH5, que contém a sequência terminal do gene ADH1. Os transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* são caracterizados pela presença do plasmídeo recombinante, identidade do fragmento de cDNA do *Bacillus*, pela sua estabilidade mitótica e pelo valor de actividade da α -amilase.

As «manchas» de RNA total isolado da *E. coli* e dos transformantes de leveduras foram identificadas da hibridização com o fragmento de DNA do *Bacillus* (CLaI/BamI) que contém o gene amilase.

A introdução de PAAH5-amilase na *Saccharomyces cerevisiae* transformou as células da levedura, que em meio contendo amido mostraram, depois de um período prolongado de tempo, actividades hidrolíticas bem como divisão celular indicando assim uma utilização do substrato.

4. EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA A α -AMILASE DE *SCHAWANNIOMYCES CASTELLI* EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

O género de levedura *Schwanniomyces*, descrito pela primeira vez por Kloecker em 1909, atraiu recentemente interesse científico por causa da elevada capacidade secretora de uma proteína amilolítica por algumas das suas espécies.

Uma dessas espécies a *Sw. castelli* produz α -amilase glucoamilases e outras enzimas amilolíticas. Estas enzimas possuem uma actividade óptima a pH ligeiramente ácido a uma temperatura de 40-60°C.

Ao contrário do que se passa com os genes de muitas leveduras do género *Schwanniomyces* que codificam a α -amilase, os genes que codificam esta enzima na espécie *Sw. castelli* não são reprimidos em *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, como os seus promotores são funcionais eles podem ser expressados constitutivamente nesta levedura.

4.1. Discussão dos resultados

4.1.1. Isolamento do gene que codifica a α -amilase:

Várias estirpes transformantes de *S. cerevisiae* formadoras do halo LEU, foram obtidas do banco de genes de *Sw. castelli*. O DNA plasmídico de um desses transformantes foi usado para transformar *E. coli*; esses transformantes transportavam o plasmídio pFH4 que por sua vez integrava o plasmídio YEP13 com um fragmento de DNA de 5.3 kb.

Os plasmídeos pFH4 foram isolados de colónias que tinham sido hibridadas com *E. coli*. Esferoplastos de *S. cerevisiae* foram transformados com esses plasmídios e apresentaram o fenótipo SWA. Todos os plasmídios que expressaram o fenótipo Swa continham o mesmo fragmento de ADN (2.8 kb). Portanto, essa sequência deverá conter o gene SWA. Quando os outros esferoplastos da levedura *S. cerevisiae* foram transformados com pFH4 todos os clones LEU apresentaram SWA com actividade α -amilase.

4.1.2. Estudos Bioquímicos

A natureza do enzima expressado por SWA1 foi examinada em filtrados de culturas de *Sw. castelli* (pFH4) mostrando actividade α -amilase. Análises cromatográficas das amostras contendo amido revelaram a presença de pequenas quantidades de maltose e altas concentrações de maltotrioses e oligossacarídeos de alto peso molecular. Portanto, pode concluir-se que o gene SWA1 codificou um enzima com actividade α -amilase.

A produção de quantidades limitadas de maltose poderia explicar o baixo nível de crescimento num meio à base de amido e que carece de qualquer outra fonte de carbono, por parte da *S. cerevisiae* (pFH4).

Os resultados destas experiências que foram realizadas em 1989, no Centro de Biologia Molecular da Universidade Autónoma de Madrid, Espanha, estão registados no gráfico da figura 1.

Quer em *Sw. castelli* quer em *S. cerevisiae* (pFH4) a actividade da α -amilase é significativa, no entanto, esta actividade em *Sw. castelli* desceu drasticamente para baixas taxas de crescimento, mas não totalmente, enquanto que a actividade da α -amilase das culturas de *S. cerevisiae* foi totalmente estável. A razão desta diferença é desconhecida mas pensa-se que seja devida à presença de actividades proteolíticas secretadas por *Sw. castelli*.

É interessante notar que a transição do gene SWA foi mais activa em *S. cerevisiae* (pFH4) que em *Sw. castelli*.

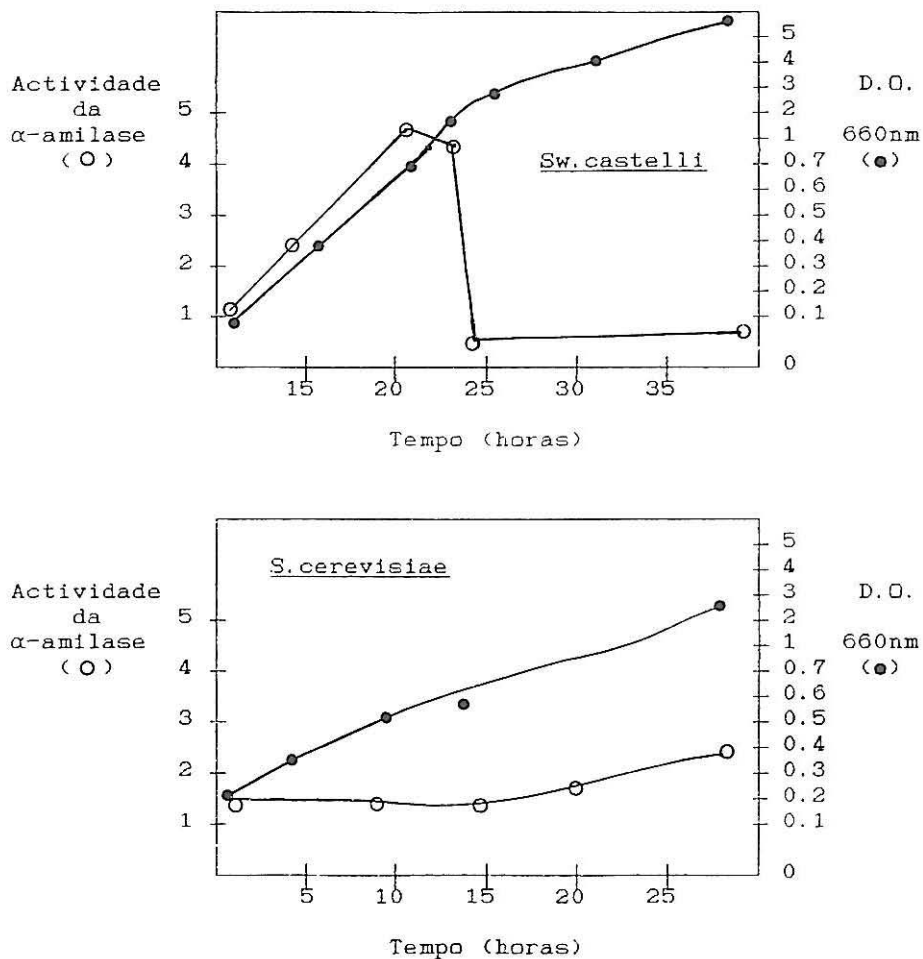


FIGURA 1

5. CONCLUSÕES

Embora os resultados das experiências levadas a cabo, até ao momento pelas várias equipas de cientistas que têm vindo a estudar a expressão dos genes que codificam a α -amilase em estirpes de *S. cerevisiae* não sejam suficientemente conclusivos para que a indústria possa utilizar seguramente essas estirpes para obter álcool a partir de substratos de amido, eles são contudo uma boa indicação do que a engenharia genética pode vir a fazer nesse campo, através da tecnologia do DNA recombinante.

BIBLIOGRAFIA

- ABARCA, D.; JOBATO, M. F.; CLAROS, M. G. e JIMÉNEZ, A. (1989). Isolation and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene encoding and α -amilase from *Schwannomyces castelli*. *Febs Letters*, 255, 2: 455-459.
- COSTA, S. O. P. (1987). Genética Molecular e de Microrganismos. *Fundamentos de Engenharia Genética*, S. Paulo, Manole.
- ERNST, J. F. e KAWAASHIMA, E. (1987). Variations in codon usage are not correlated with heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 7 (1988): 1-10.
- KUNZE, G. et al. (1987). Expression in yeast of a *Bacillus* α -amilase gene by the ADHI promoter. *Elsivier, Journal of Biotechnology*, 7 (1988): 33-48.