



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI – UFSJ**  
**CAMPUS CENTRO-OESTE DONA LINDU – CCO**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**ANA AMÉLIA MAIA SILVA**

**EXPRESSÃO DA AMILASE DE *Cryptococcus flavus***  
**EM CÉLULAS DE *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)**  
**PARA APLICAÇÕES EM INDÚSTRIAS**

**DIVINÓPOLIS - MG**

**AGOSTO - 2021**

**ANA AMÉLIA MAIA SILVA**

**EXPRESSÃO DA AMILASE DE *Cryptococcus flavus*  
EM CÉLULAS DE *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)  
PARA APLICAÇÕES EM INDÚSTRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São João Del Rei, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

**Orientador:** Alexsandro Sobreira Galdino

**DIVINÓPOLIS - MG**

**AGOSTO - 2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)  
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S532e Silva, Ana Amélia Maia.  
EXPRESSÃO DA AMILASE DE *Cryptococcus flavus* EM  
CÉLULAS DE *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)  
PARA APLICAÇÕES EM INDÚSTRIAS / Ana Amélia Maia Silva  
; orientador Alexsandro Sobreira Galdino. --  
Divinópolis, 2021.  
105 p.

Dissertação (Mestrado - Programa Multicêntrico de  
Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular) --  
Universidade Federal de São João del-Rei, 2021.

1. Engenharia Genética. 2. DNA Recombinante. 3.  
Enzimologia. 4. Biologia Molecular. 5.  
Biotecnologia. I. Galdino, Alexsandro Sobreira,  
orient. II. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 39 / 2021 - PMBqBM (13.26)**

**Nº do Protocolo: 23122.032233/2021-23**

**Divinópolis-MG, 31 de agosto de 2021.**

**Ata de Defesa de Dissertação da mestranda**

**Ana Amélia Maia Silva**

No dia 27 de agosto de 2021, às 08h30min, reuniu-se, por meio de videoconferência - plataforma Google Meet, a banca examinadora da Defesa de Dissertação da discente Ana Amélia Maia Silva, regularmente matriculada no Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, nível Mestrado. A banca examinadora foi constituída pelos doutores: Alexsandro Sobreira Galdino (UFSJ), orientador e presidente da banca, Leonardo Henrique Franca de Lima (UFSJ) e Maria de Lourdes Borba Magalhães (UDESC). Após apresentação, durante 54 minutos, do trabalho intitulado "Expressão da amilase de *Cryptococcus flavus* em células de *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) para aplicações em indústrias", a mestranda foi arguida pelos examinadores. Reunidos em sessão secreta, às 12h45min a banca considerou a candidata APROVADA. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que será inserida no SIPAC - Sistema Integrado de Patrimônio, Administração e Contratos da UFSJ para ser assinada eletronicamente pelos membros internos da banca. O membro externo, Dra Maria de Lourdes Borba Magalhães, encaminhou, por correspondência eletrônica, termo de concordância com os dados constantes nesta ata. Divinópolis, 27 de agosto de 2021.

**(Assinado digitalmente em 31/08/2021 09:10 )**

ALEXSANDRO SOBREIRA GALDINO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
CCO (10.02)  
Matrícula: 1367304

**(Assinado digitalmente em 01/09/2021 14:52 )**

LEONARDO HENRIQUE FRANCA DE LIMA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DECEB (12.11)  
Matrícula: 2981680

Para verificar a autenticidade deste documento entre em  
<https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **39**, ano:  
**2021**, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão: **31/08/2021** e o código de  
verificação: **d004a907fb**

**Para meus pais, Amélia Maia Silva e José Eustáquio da Silva.**

## AGRADECIMENTO INSTITUCIONAL

Os meus agradecimentos aos financiadores e apoiadores da pesquisa científica, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudos, ao **Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM)**, pela oportunidade. À minha Universidade-mãe, **Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ)** pela estrutura acadêmica, a qual estou inserida desde o ano de 2013, onde foi possível realizar os meus cursos de graduação e pós-graduação.

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À **DEUS**. À possibilidade de realização deste trabalho, de ter saúde e força durante toda a trajetória. Somente Deus e eu sabemos intimamente o que significa para mim o fechamento desse ciclo. Mais que a realização de um sonho, em que eu pude crescer pessoal e profissionalmente, a Biologia Molecular me proporcionou também experiências de fé em transbordos científicos.

Aos **meus pais, Amélia e José Eustáquio**, por confiarem e me apoiarem mesmo quando minhas buscas são diferentes do que vocês julgam ser a melhor escolha. Por me permitirem ter oportunidades que nunca tiveram, por me permitirem “estudar” mesmo em situações mais vulneráveis. Por se limitarem e sacrificarem anseios em suas vidas a fim de que eu me tornasse uma mulher forte, independente, com conhecimento. Por me mostrarem que, independente do título que eu tiver, que eu nunca devo perder a humildade e os meus valores. Eu amo vocês imensamente e serei sempre grata por tudo o que vocês me proporcionam.

Ao meu avô **Bento**. O amor que eu sinto por você transborda. Obrigada por fazer com que o meu “estudo” seja visto com carinho por você, por ser sempre carinhoso e por entender quando não pude estar presente em momentos especiais contigo, seja pela distância ou seja pela Covid-19. Amo você muito... a saudade está gigante!

Ao meu irmão de alma, **Iago Oliveira**. Onde mesmo distante, manteve-se ao meu lado... ouvindo, compreendendo, acalmado, guiando, incentivando. Uma amizade que transcende os limites físicos. Eu amo você! Você agrega tanto em minha vida, me torna uma pessoa ainda mais feliz.

À minha “mãe” divinopolitana **Arlete**. Encontrar você nessa vida foi uma das maiores bênçãos ocorridas. Você é maravilhosa, obrigada por me acolher como uma filha e estar sempre presente, diariamente. O amor que sinto por você é um dos mais puros e verdadeiros.

À minha prima **Fernanda Pereira**, por me trazer sempre ao racional. Por me ensinar as normas técnicas de revisão textual; por me impulsionar na escrita, cursos, concursos; por me ajudar a acreditar em meu potencial científico. Nunca esquecerei de todas as revisões e eu sempre serei grata!

À **Dra. Liliam Midori Ide**, minha amiga e ex-orientadora. Você tem o meu carinho e respeito. Com você aprendi a rotina laboratorial: a importância dos procedimentos serem seguidos com cautela, a acurácia científica, o respeito com o ser experimental e com os experimentos, a importância de uma boa escrita acadêmica. Mas também sobre como uma conversa, um *yakisoba* ou um vinho fazem a diferença para o nosso coração.

Ao meu orientador, **Dr. Aleksandro Sobreira Galdino**. Eu sou imensamente grata pela oportunidade, por ter confiado em mim. Uma “menina” que você conheceu *in silico* por meio do universo das Patentes e que o vínculo foi-se tornando mais forte. Com você obtive ensinamentos que levarei sempre em minha jornada, além dos que estão e estarão em meu currículo. Gratidão imensa por todos os conhecimentos e experiências compartilhadas.

À todos os companheiros do **LABIOM** (Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos), por todo carinho, amizade, apoio profissional ou não. Vocês foram essenciais para eu vencer essa jornada, obrigada por tudo que vocês fizeram por mim.

Ao **André**, meu primeiro presente de Divinópolis. Gosto tanto da nossa amizade e sou muito feliz por termos vivido essa fase da pós-graduação juntos. Obrigada também por suas pacientes explicações e por sempre ser minha dupla nas disciplinas.

Ao **Me. Jonatas**, por ter se tornado este grande companheiro dentro e fora do laboratório. Você é um amigo muito especial! Obrigada por ter tornado meus dias mais leves e tranquilos; por todas as instruções, contribuições e revisões. Por todo o cuidado e generosidade comigo!

À **Dra. Thais**, por ser uma companheira muito doce e tranquila, por sempre ter uma palavra de paz quando a situação parece ser a mais difícil. Você é uma grande amiga, obrigada por tudo que você somou em minha vida profissional e pessoal, sou muito grata por termos conhecido uma a outra.

À **Dra. Laís**. Seu nome já era tão acessível para mim que eu posso dizê-lo completo agora... Uma mulher incrível, humilde, de cérebro e coração gigantescos. Obrigada por todas as experiências compartilhadas comigo e todo apoio dirigido a mim!

À **Ma. Michelli**, pessoa sempre solícita a nos ajudar, explicar e ouvir. Sou muito grata pelas trocas positivas que tivemos. A microbiologia é linda e leve com a sua companhia.

À **Dra. Juliana**, pelas parcerias em produções científicas teóricas e laboratoriais, conversas, compartilhamento de experiências e “puxões de orelha”.

Ao **Me. Renato Ramos Godoi**, pela colaboração para o desenho racional da enzima  $\alpha$ -amilase e por todas as explicações adicionais, conversas e amizade construída.

À **Dra. Marina Q. R. Branco Rodrigues**, pela colaboração para o desenho racional da enzima  $\alpha$ -amilase e pelas explicações teóricas detalhadas, carregadas com o charme da sua delicadeza.

Ao **Dr. Daniel Bonoto Gonçalves**, por permitir a utilização de alguns reagentes e equipamentos do laboratório do qual é coordenador, Laboratório de Processos Biotecnológicos e Purificação de Macromoléculas.



À **Soraia Alves**, secretária do PMBqBM, sempre solícita e disposta a nos ajudar de imediato e da melhor forma possível.

À **Dra. Maria de Lourdes Borba Magalhães**, ao **Dr. Leonardo Henrique Franca de Lima**, à **Dra. Nayara Delgado André Bortoleto**, à **Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães**, ao **Dr. Jefferson Luiz Princival**, ao **Dr. Daniel Bonoto Gonçalves** e ao **Dr. Adriano Guimarães Parreira**, por vocês aceitarem o meu convite em participar de um dos momentos mais importantes e especiais para mim, como membros da minha Banca de Mestrado.

Ao meu amigo **Weliton Pugas**, por ter tornado a minha vida em Divinópolis mais leve. Mais que as oportunidades profissionais “fora da caixinha”, você me proporcionou risos e sorrisos. Obrigada pelas trocas profissionais, pessoais e espirituais. Vou levar você sempre comigo.

À professora **Dra. Valéria Ernestânia Chaves**, por ter se tornado uma amiga nesse período do mestrado. Algumas almas se reconhecem nesse plano e sou feliz por termos nos encontrado durante minha passagem pelo CCO.

Às minhas amigas **Ma. Monique Macedo** e **Ma. Fernanda Souza**, por todas as trocas durante este processo. Vocês somam muito ao meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Ao meu grande amigo e incentivador da pesquisa científica, **Me. Vinícius Sperandei**. Obrigada por todo apoio e perseverança.

Ao meu ex-*classmate*, **Me. Filipe Resende**. Gratidão por todas as discussões pessoais e científicas.

À minha amiga **Erika Howadik**, meu presentinho da EF para a vida. Tenho muito o que agradecer por sua amizade e companheirismo durante toda essa jornada iniciada antes mesmo da aprovação do mestrado. Você acompanhou de perto minhas batalhas e aflições, e fez-se presente; sendo cuidado, carinho e atenção. Você é potência em forma de mulher!

À minha mini-oncinha, companheira fiel de *homeoffice*, **Soneca**. O amor que eu sinto por esse ser de outra espécie é imensurável e incompreensível. Que me ensina todos os dias a ver o mundo de uma outra forma: respeitando o corpo e vivendo o presente da melhor forma, como sendo tudo o que temos... porque realmente é.

À baiana mais “arretada” que Lagoa Dourada conhece... **Maricélia**. Você foi primordial para eu não desistir, sempre otimista e serena, acreditando em mim e me incentivando. Obrigada por tudo, eu gosto muito você! A quarentena seria gélida sem sua companhia.

Às minhas companheiras de repúblicas divinopolitanas: **Maria Juliana, Jaque, Maria, Simone e Sarah**. Sempre tive para mim que precisamos de um lar e não apenas uma casa. Obrigada por vocês terem sido a minha família durante o período em que estivemos juntas.

Ao meu grupo da Nutrição, em que juntos formamos o “Quarteto Fantástico UFMG-2021”, **Isadora, Stefany e Gustavo**. Obrigada por todo o incentivo, conversas e discussões. Vocês são incríveis! Por - independente da distância - serem amigos: apoiar, compreender, ouvir, aconselhar.

Ao **Igor Rodrigues**, por todo o apoio desde o momento em que nos conhecemos. Incentivando, vibrando positivamente e sendo ponto de paz... O amor está na calma e nos pequenos detalhes.

Aos meus grandes amigos lagoenses, da infância para a vida: **Flávia, Isabella, Christian e Mariana**. Por compreenderem minha ausência física, por entenderem e apoiarem a minha incessante busca pelos meus sonhos.

À todos que, de alguma forma, contrubuíram para que a execução deste trabalho tornasse possível. O meu muito obrigada!

*“Somos do tamanho dos nossos sonhos.”*

Fernando Pessoa

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A expressão de proteínas por meio de sistemas heterólogos é uma alternativa para produção de enzimas. Os modelos disponíveis apresentam maquinário adequado para aumentar os níveis de produção de uma determinada proteína, permitindo que a produção seja mais rápida e com níveis de produções superiores aos sistemas nativos, além de fornecer segurança biológica ao produto. **OBJETIVO:** O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver uma cepa recombinante de *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) para a produção da enzima  $\alpha$ -amilase de *Cryptococcus flavus* (Amy1), utilizando metanol como única fonte de carbono. **JUSTIFICATIVA:** A Amy1 apresenta características interessantes para o setor biotecnológico, como estabilidade térmica, manutenção da sua atividade funcional em uma ampla faixa de pH e alta afinidade pelo substrato. **MATERIAL E MÉTODOS:** A sequência de nucleotídeos que codifica Amy1 foi otimizada com a sequência de códons preferenciais para a expressão em *K. phaffii*, seguido por síntese in vitro e clonagem no vetor de expressão pPICZ $\alpha$ -B. A partir disso, fez-se a amplificação do material genético e a transformação da levedura com o plasmídeo recombinante. Em seguida, o potencial de hidrólise do amido dos clones recombinantes foi avaliado qualitativa e quantitativamente, utilizando o método de FUWA. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** O ensaio em placa de degradação de amido mostrou que Amy1 foi expressa com sucesso em vários clones analisados, e a atividade amilolítica extracelular aumentou durante o crescimento na fermentação, atingindo um valor máximo (5,45/5,64 U/mL) em 46h de incubação. Esses valores, embora ainda iniciais, são superiores aos já encontrados na literatura. **CONCLUSÃO:** Os resultados preliminares mostraram que o gene foi clonado e expresso com sucesso em células de *K. phaffii*. No entanto, é necessário realizar mais estudos sobre as condições de expressão. Portanto, este estudo foi capaz de desenvolver cepas recombinantes de *K. phaffii* com potenciais de aplicação na degradação industrial do amido.

**PALAVRAS-CHAVE:** Engenharia Genética. DNA Recombinante. Enzimologia.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The expression of proteins through heterologous systems is an alternative for enzyme production. The available models have adequate machinery to increase the production levels of a certain protein, allow a faster production and with production levels superior to wild systems, and provide biological safety to the product. **OBJECTIVE:** The main goal of this study was to develop a recombinant *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) strain for the production of *Cryptococcus flavus*  $\alpha$ -amylase (Amy1), using methanol as a sole carbon source. **BACKGROUND:** Amy1 presents interesting characteristics from a biotechnological point of view, such as thermal stability, maintenance of its functional activity in a wide pH range and high affinity for the substrate. **MATERIAL AND METHODS:** The nucleotide sequence encoding Amy1 was optimized with codon usage biased for expression in *K. phaffii*. The resulting recombinant plasmid was used to transform yeasts cells. Potential recombinant clones were then evaluated for their ability to degrade starch using FUWA method protocol qualitatively and quantitatively. **DISCUSSION AND RESULTS:** The starch-degrading plate assay showed that Amy1 was successfully expressed in several clones and extracellular amylolytic activity increased during growth in fermentation, reaching a maximal value (5.45/5.64 U/mL) at 46h of incubation. These values were higher than those found in the literature. **CONCLUSION:** Preliminary results showed that the gene was successfully cloned and expressed in *K. phaffii* cells. However, additional studies on expression conditions need to be conducted. Therefore, this study was able to develop a recombinant *K. phaffii* strain with potential application in industrial starch degradation.

**KEYWORDS:** Genetic Engineering. Recombinant DNA. Enzymology.