

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE AROMA,
PELA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DOS GENES
LIPOXIGENASE 1 E HIDROPERÓXIDO LIASE DE VEGETAL
EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.**

Janaina Nicanuzia dos Prazeres

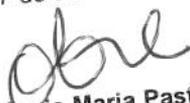
**Profa. Dra. Gláucia M. Pastore
Orientadora**

**Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira
Co-orientador**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Janaina Nicanuzia Dos Prazeres**, aprovado pela Comissão Julgadora em 17 de abril de 2002.

Campinas, 17 de abril de 2002


Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente da Banca

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências de Alimentos.

2002

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
P899p
V _____ EX _____
TOMBO BCI 49159
PROC 16.837/0.0
C _____ DX _____
PREÇO R\$11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00167677-4

BIB ID 241030

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P899p Prazeres, Janaina Nicanuzia dos
Produção de compostos voláteis de aroma, pela expressão heteróloga dos genes lipoxigenase 1 e hidroperóxido liase de vegetal em *Saccharomyces cerevisiae* / Janaina Nicanuzia dos Prazeres. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Aroma. 3. Cromatografia gasosa. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra. Gláucia M. Pastore

149182

UNICAMP – Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos



Assinatura

Profa. Dra. Hélia H. Sato

053031

UNICAMP – Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos



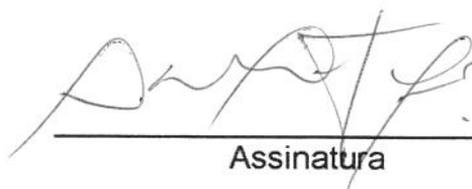
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

278971

UNICAMP – Instituto de Biologia

Departamento de Genética e Evolução



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Michel G. A. Vicentz

UNICAMP – Instituto de Biologia

Departamento de Genética e Evolução

Assinatura

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

200222471

Aos meus pais, Altino e Onofra, que além de me darem a oportunidade de chegar até aqui, foram responsáveis pela minha formação como um todo;

A minha irmã, Jaquelina, pelo incentivo e amizade;

À Frampton, meu namorado, pela força, estímulo, companheirismo e paciência;

À Hiroshi pela grande amizade e incentivo;

dedico este trabalho.

“Até aqui nos ajudou o Senhor.”

Samuel 7:12b

Agradecimentos

A Profa. Dra. Gláucia M. Pastore pela orientação e oportunidade a mim dada para desenvolver este trabalho;

Ao Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira pela coorientação e grande incentivo que me deu para vencer os obstáculos durante o desenvolvimento do Mestrado;

Ao Prof. Dr. Marcelo M. Texeira, à Profa. Dra. Hélia H. Sato e ao Prof. Dr. Michel G. A. Vicentz pela participação no exame de qualificação, correções e sugestões apresentadas.

Aos professores dos cursos de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, e Genética do Instituto de Biologia/UNICAMP, por fazerem parte da minha formação.

Aos companheiros dos laboratórios de Bioaromas e Bioquímica, Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, e dos laboratórios do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia/UNICAMP, pela agradável convivência e pela grande colaboração e paciência ao compartilharem as técnicas e conhecimentos que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Em especial agradeço aos meus colegas de trabalho Denise, Juliana, Sandra, Márcio, Eliane, Odalys, Marcos e Ana Paula por suas colaborações, paciência e estímulo.

Aos técnicos (as) Daniela, Cleber e Eliane, e funcionárias Dora, Beatriz, Andréa e Edna pela colaboração e disponibilidade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação e da Secretaria de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela disponibilidade e gentileza.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado.

4.2.1 – Extração de RNA	28
4.2.2 – Reação RT-PCR	29
4.2.3 – Obtenção das construções pYES2-LOX-1 e pYES2-HPL para clonagem e expressão em <i>S. cerevisiae</i>	30
Clonagem dos genes <i>LOX-1</i> e <i>HPL</i> no plasmídeo pGEM-T Easy	30
Extração de DNA plasmidial	31
Clonagem dos genes <i>LOX-1</i> e <i>HPL</i> no vetor pYES2	31
Transformação de levedura	32
4.2.4 – Seqüenciamento dos genes	33
4.2.5 – Reação de PCR para detecção dos genes nas colônias de leveduras	33
4.2.6 – Indução para expressão de proteínas recombinantes	34
4.2.7 – Extração de RNA total de levedura para <i>Northern Blot</i>	34
4.2.8 – Hibridação com sonda de DNA (<i>Northern Blot</i>)	35
Pré-Hibridação	35
Síntese da sonda	36
Hibridação	36
Lavagens e exposição das membranas	37
4.2.9 – Indução para produção de compostos voláteis vegetais	37
4.2.10 – Análise dos Compostos Voláteis por “Purge and Trap”	37

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 – Clonagem dos genes <i>LOX-1</i> e <i>HPL</i>	40
5.2 – Construção dos vetores de expressão (em pYES 2) e clonagem em bactérias DH5 α	43
5.3 – Seqüenciamento dos genes	47
5.4 – Obtenção dos clones em leveduras INVSc-1	54
5.5 – Verificação do padrão de expressão por <i>Northern blot</i>	55
5.6 – Verificação da produção hexanal por cromatografia gasosa	58
6 – CONCLUSÕES	65
7 – PERSPECTIVAS FUTURAS	66
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Tabela 1: Exemplos de compostos de aroma derivados de constituintes celulares (WHITEHEAD, 1998)	5
Tabela 2: Atividades fisiológicas dos hidro(pero)xi de ácidos graxos C ₁₈ em plantas (GRECHKIN, 1998).	11
Tabela 3 : Condições de Extração dos Voláteis por “Purge and Trap”	38
Tabela 4: Resultado do Northern blot para as sondas <i>LOX-1</i> e <i>HPL</i> (como na Figura 14).	65
Figura 1: Esquema da biossíntese de n-hexanal a partir de ácido linoléico via <i>LOX</i> e <i>HPL</i> (SWIFT, 1999; BATE <i>et al.</i> , 1998; BERGER, 1997).	9
Figura 2: Lipoxigenase catalisando a oxigenação do ácido linoléico a 13(S)-hidroperóxido e 9(S)-hidroperóxido (GRECHKIN, 1998).	12
Figura 3: Formação de compostos voláteis aromáticos nos tecidos vegetais pela ação das enzimas <i>LOX</i> e <i>HPL</i> e suas diferentes especificidades pelo substrato (TERANISHI <i>et al.</i> , 1999; SWIFT, 1999).	15
Figura 4: Esquema da cadeia de repressão por glicose e sua influência sobre outras fontes de carbono (maltose e galactose). – repressão e + derrepressão (OLSSON <i>et al.</i> , 2000).	20
Figura 5: RNA total (2 µL) de sementes imaturas de soja.	40
Figura 6: cDNA do gene <i>LOX-1</i> de soja obtido por reação de RT-PCR a partir de RNA total de sementes imaturas de soja.	41

Figura 7: RNA total (2 μ L) de frutos verdes de pimentão.	42
Figura 8: DNA do gene <i>HPL</i> de pimentão obtido por reação de RT-PCR a partir de RNA total de frutos verdes de pimentão.	42
Figura 9: DNAs plasmidiais digeridos com enzimas de restrição.	45
Figura 10: Esquema das duas construções, pYES2-LOX-1 e pYES2-HPL	46
Figura 11: DNAs obtidos após digestão com enzimas de restrição.	47
Figura 12: Apresentação de algumas das seqüências que produziram alinhamentos significativos com o cDNA de <i>LOX-1</i> .	49
Figura 13: Resultado do alinhamento entre as seqüências do cDNA de <i>LOX-1</i> (Seq 1) e do gene <i>LOX-1</i> de <i>Glycine max</i> (Seq 2).	51
Figura 14: Apresentação de algumas das seqüências que produziram alinhamentos significativos com o cDNA de <i>HPL</i> .	52
Figura 15: Resultado do alinhamento entre as seqüências do cDNA de <i>HPL</i> (Seq 1) e do gene <i>HPL</i> de <i>Capisicum annuum</i> (Seq 2).	53
Figura 16: PCR de colônias de leveduras recombinantes.	55
Figura 17: <i>Northern blot</i> com as sondas <i>LOX-1</i> e <i>HPL</i> , e o RNA total extraído das leveduras após indução.	57
Figura 18: Curva padrão do hexanal.	58
Figura 19: Análise da produção de hexanal por cromatografia gasosa.	59
Figura 20: Curva de crescimento de colônias de leveduras duplo recombinante (<i>LOX/HPL</i>) e controle (pYES).	60
Figura 21: Curva padrão do hexanal.	61

Figura 22: Análise da produção de hexanal por cromatografia gasosa.	61
Figura 23: Curva padrão do hexanal.	64
Figura 24: Análise da produção de hexanal por cromatografia gasosa.	64
Figura 25: <i>Northern blot</i> realizado com as sondas <i>LOX-1</i> e <i>HPL</i> para as colônias controles pYES2, HPL, LOX, LOX+HPL, e as colônias duplo recombinantes 1 a 10.	65

RESUMO

Lipoxigenases (LOX) catalizam a oxigenação de ácidos graxos polinsaturados, como o ácido linoléico, em hidroperóxidos, os quais via a ação sequencial das hidroperóxido liases produzem os compostos voláteis de aroma responsáveis pelo aroma de frescor de frutas, como o aldeído C6, hexanal.

Os cDNAs que codificam a lipoxigenase, isoenzima 1, e hidroperóxido liase foram expressados em *Saccharomyces cerevisiae*, através do vetor pYES 2 (construções pYES2-LOX-1 e pYES2-HPL).

A análise da seqüência parcial de nucleotídeos do cDNA de *LOX-1* mostrou 96-99 % de similaridade com *LOX-1* de soja (*Glycine max*), enquanto que a análise da seqüência completa de nucleotídeos do cDNA de *HPL* mostrou 97% de similaridade com *HPL* de pimentão (*Capsicum annuum*).

A análise de *Northern blot* foi usada para caracterizar a expressão dos dois genes em *S. cerevisiae* duplo recombinantes. A primeira análise pelo *Northern blot* mostrou que ambos os genes foram expressos após 4 horas de indução, contudo a segunda análise mostrou que somente um dos dois foram expressos nas leveduras duplo recombinantes, o que demonstrou uma baixa estabilidade dos vetores.

A análise de cromatografia gasosa foi usada para medir as quantidades de hexanal produzido. A produção de hexanal foi limitada em todas as leveduras estudadas, inclusive nos controles. Isto pode estar relacionado à expressão de apenas um dos genes nas *S. cerevisiae* duplo recombinantes.

SUMMARY

Lipoxygenase (LOX) catalyze the oxigenation of polyinsaturated fatty acids , such as linoleic acid, into hydroperoxides, which, via the sequential action of hydroperoxide lyases (HPL), produce the aroma volatile compounds responsible for the fresh fruit flavor, notably the C6 aldehyde, the hexanal.

The cDNAs encoding soybean lipoxygenase isoenzyme 1 and hydroperoxide lyase were expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, using the pYES 2 vector (pYES2-LOX-1 and pYES2-HPL constructions).

Analysis of partial nucleotide sequence of *LOX-1* cDNA showed 96-99 % similarity with *LOX-1* soybean (*Glycine max*), while *HPL* cDNA full nucleotide sequence analysis showed 97 % similarity with *HPL* bell pepper (*Capsicum annuum*).

Northern blot analysis was used to characterize the expression patterns for two genes in double recombinant *S. cerevisiae*. The first Northern blot analysis showed that both genes were expressed after 4 hours, however the second analysis showed that only one of them were expressed in the double recombinant yeast, what may suggest a low vector stability.

Gas chromatography analysis was used to measure quantities of hexanal production, which was limited in all yeasts studied, including the controls. Limited hexanal production can be related to the only one gene expression in the double recombinant *S. cerevisiae*.

1 – INTRODUÇÃO

Os compostos voláteis de aroma são substâncias que estimulam o paladar e o olfato, e têm grande importância para a indústria de alimentos, cosméticos e farmacêuticos. Há um constante aumento de demanda por aromas naturais, criando numerosas oportunidades para a síntese enzimática competir com a síntese química tradicional, como também o uso de métodos biotecnológicos envolvendo microrganismos para produção de compostos aromáticos naturais. Também tem-se observado que há uma grande aceitabilidade pelo uso de enzimas para produção de aditivos em alimentos em alguns países.

Por longo tempo, as plantas foram as maiores fontes de compostos aromatizantes. Contudo, eles estão presentes em baixas concentrações e seu isolamento é difícil e dispendioso. Além disso, o suprimento do material vegetal é influenciado por variações sazonais, variedades do clima, riscos de doenças de plantas, estabilidade sócio-política de regiões de produção e restrições comerciais. Apesar de muitos aromatizantes sintéticos estarem disponíveis em preços muito baixos, o consumidor prefere compostos naturais, particularmente aqueles que são consumidos freqüentemente.

Nos tecidos vegetais os voláteis C6 e C9, como n-hexanal, 2-hexenal, 2-nonenal caracterizam o “green note”, ou seja determinam o frescor de frutas e vegetais. Todos estes voláteis são amplamente usados como aditivos em alimentos.

Estes compostos são derivados enzimaticamente do ácido linoléico ou linolênico. O caminho biossintético para produção destes voláteis se dá primeiramente pela ação da lipoxigenase, que catalisa a oxidação destes ácidos graxos para produzir derivados hidroperóxidos. A transformação desses hidroperóxidos a álcoois e aldeídos voláteis se dá pela clivagem enzimática através da hidroperóxido liase.

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante agora permite a produção de proteínas e peptídeos em larga escala em leveduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, com isso proteínas de interesse farmacêutico e industrial

de difícil ou impossível obtenção pelos métodos tradicionais podem agora ser produzidas. Proteínas com novas propriedades também podem ser produzidas em larga escala. Devido ao aumento de demanda, o gene para uma proteína de interesse pode ser clonado e expressado a altos níveis em um organismo hospedeiro adequado .

As leveduras têm sido usadas na indústria de fermentação e panificação por séculos, e suas propriedades de crescimento e metabolismo em larga escala têm sido bem estudados. Então, a expressão de algumas proteínas recombinantes é uma adequada escolha que combina custo-eficiência método de produção com a habilidade de modificação pós-transcricional em uma maneira apropriada. Além disso, há extensivas informações sobre a segurança da *S. cerevisiae* como um organismo GRAS (Generally Regarded As Safe) para o seu uso na indústria de fermentação.

Em face às características favoráveis que as leveduras *S. cerevisiae* apresentam para a expressão de proteínas heterólogas, e a grande demanda por compostos voláteis de aroma vegetais, fez-se desejável expressar as enzimas lipoxigenase e hidroperóxido liase neste organismo.

Os objetivos deste trabalho foram inserir os genes das enzimas lipoxigenase 1 (LOX1) de sementes imaturas de soja e hidroperóxido liase (HPL) de pimentão em *S. cerevisiae*, usando um vetor de expressão em levedura, contendo um promotor induzível, GAL1 (induzido por galactose). Além disso, em meio de cultura apropriado, contendo ácido linoléico como substrato, verificar a expressão dos dois genes e a síntese do composto volátil de aroma vegetal, hexanal. A quantificação e identificação dos compostos produzidos pelo processo fermentativo foi realizada por "Purge and Trap Dynamic Headspace" acoplado a Cromatografia Gasosa.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Compostos voláteis de aroma

Os compostos voláteis de aroma são substâncias que estimulam o paladar e o olfato, e têm grande importância para a indústria de alimentos, cosméticos e farmacêuticos. O mercado mundial de aromas soma aproximadamente 25% do mercado total de aditivos (LOMASCOLO *et al.*, 1999). As vendas nos Estados Unidos da América foram estimadas em US\$675 milhões em 1991, e na Comunidade Européia em US\$376 milhões em 1994. Europa e Estados Unidos detêm aproximadamente 70% do mercado mundial de aroma, enquanto que Brasil, China, Indonésia e Malásia estão entre os países de nichos de mercado em potencial, uma vez que registram uma taxa de crescimento de 10% ao ano (ATHAYDE, 1999).

Apesar das dificuldades em obter estatísticas sobre o mercado de aromas brasileiro, estima-se que esteja em torno de US\$ 150 milhões. Os parâmetros de mercado são baseados no consumo dos principais segmentos onde o ingrediente é aplicado: sorvete, laticínios e panificação (ATHAYDE, 1999).

O sabor é uma resposta integrada a uma mistura de estímulos, estando principalmente relacionado com o gosto e o aroma. O gosto é devido aos componentes não voláteis que são basicamente descritos como salgado, doce, azedo e amargo. Por outro lado, o aroma possui maior complexidade, o qual é devido a vários compostos voláteis, sendo que estes compostos determinam o sabor característico dos alimentos.

Esses aditivos são utilizados pela indústria nas formas de extratos, oleorresinas e óleos essenciais e compostos sintéticos semelhantes aos naturais, cujas funções principais são: criação de um sabor inexistente naturalmente nos produtos, potencialização ou reposição do sabor de ingredientes básicos perdidos durante

processamento e mascarar sabores indesejáveis, como o leite de soja aromatizado, por exemplo (ATHAYDE, 1999).

Aromas podem ser divididos em dois grupos, baseados no caminho no qual eles são formados (WHITEHEAD, 1998). Aromas primários consistem de compostos organolepticamente ativos presentes em alimentos crus que são sintetizados por vias bioquímicas definidas. Aromas secundários são formados por reações químicas, ou pela interação entre vários compostos do alimento como ácidos graxos, carboidratos, etc., que acontecem durante o cozimento e/ou processamento.

Quase todos os tipos de constituintes celulares podem ser metabolizados e/ou degradados a um ou mais tipos de compostos de aroma (Tabela 1, WHITEHEAD, 1998). Os aromas primários, como os terpenos, são sintetizados puramente por vias anabólicas, enquanto outros, como os aldeídos e lactonas, são resultado da quebra catabólica dos constituintes celulares que ocorre durante metabolismo celular normal ou após injúria. Aromas secundários são formados por processos não-enzimáticos de um ou mais materiais primários. Em alguns casos, o mesmo composto pode ser formado de um aroma primário ou secundário.

Compostos de aroma são classificados como “naturais” quando são obtidos de fontes naturais seja por processo físico ou fermentativo. Estes incluem a utilização de enzimas (REHBOCK *et al.*, 1998). Segundo TYRREL (1995), existem 3 categorias de aromas naturais:

1. Materiais que são formados durante o metabolismo natural de animais e plantas que podem ser usados na forma seca ou extraídos e refinados;
2. Compostos de aroma formados durante a ação enzimática e por microrganismos;
3. Compostos de aroma básicos formados durante o processamento térmico de ingredientes naturais.

Tabela 1: Exemplos de compostos de aroma derivados de constituintes celulares (WHITEHEAD, 1998)

PRECURSOR	GRUPO QUÍMICO DO AROMA	EXEMPLOS	DESCRIÇÃO DO ODOR
Ácido Mevalônico	Monoterpenos	(S)-(+)-Carvona	“Caraway, “spicy”
	Sesquiterpenos	(+)-“Nootkatone”	“Grapefruit”
Carotenóides	Iononas	β -Ionona	“Cedar wood-like”
	Damasconas	β -Damascenona	Doce, madeira
Carboidratos (Celulose/amido/ açúcares)	Furanonas	Furaneol®	Queimado, caramelo, fruta
	Piranonas	Maltol	Caramelo
Gorduras (ácidos graxos)	Aldeídos	Hexanal	Verde, frutal
		2-(E),6-(Z)-Nonadienal	Verde, pepino/ melão
	Álcoois	(R)-(-)-1-octen-3-ol	Cogumelo
	Lactonas	(R)-(+)- γ -Decalactona	Pêssego
	Metil cetonas	Undecanona	“Blue cheese”
	Ciclopentanonas	(+)-cis-metil jasmonatos	Floral, frutal
	Lignina	Fenóis	Vanilina
2,6-dimetoxifenol			Fumaça, bálsamo
Proteínas (aminoácidos)	Ácidos	Ácido fenilacético	Mel
		(S)-(+)-ácido metilbutírico	Frutal, queijo
	Aldeídos	3-(metiltio)-propanal	Carne, sulfúrico
Vitaminas (B ₁)	Indoles	Indola	Fecal, “nutty”
	Tiazol	5-hidroxi-etil-4-metil-tiazole	Carne, “sulfury”
Álcoois + ácidos	Éster	Etil- heptanoata	Frutal, “cogna”
Açúcares +	Aldeídos	Isovaleraldeídos	Chocolate
Aminoácidos	Pirazinas	2,3,5-Timetilpirazina	“Roasted”, café
	Tiazole	2-Acetiltiazole	“Roasted”, “crusty”

Um aumento de demanda por aromas naturais tem criado numerosas oportunidades para a síntese enzimática competir com a síntese química tradicional (WHITEHEAD, 1998; WNUK *et al.*, 1983). Além deste aumento de demanda por produtos naturais, tem-se observado que há uma grande aceitabilidade do uso de enzimas para a produção de alimentos em alguns países (HOBAN, 1999).

Atualmente, as indústrias de ingredientes têm realizado inúmeras pesquisas para desenvolver novos compostos de sabor e aroma, principalmente aqueles naturais, que podem ser obtidos por processos físicos, enzimáticos ou por biotecnologia (ATHAYDE, 1999).

A biotecnologia pode, então, desempenhar um papel chave para satisfazer este aumento de demanda (LOMASCOLO *et al.*, 1999). Fungos superiores como os basidiomicetos representam um importante grupo que gera uma ampla quantidade de compostos aromáticos e apresentam um grande potencial biotecnológico para produzir aromas naturais *de novo* ou por biotransformação para serem utilizados como aditivos fornecendo ou realçando o sabor e aroma de alimentos.

A utilização de microrganismos em alimentos para produção de aromas já é conhecida há centenas de anos. Desde o advento da cerveja, vinho, queijo, além de outros produtos fermentados, processos microbiológicos têm tradicionalmente desempenhado papel fundamental no desenvolvimento de misturas complexas de aroma em alimentos. As raízes da moderna biotecnologia desenvolveram-se a partir de níveis artesanais, levando a formação de grandes indústrias (BRIGIDO, 2000).

Microrganismos fornecem uma interessante oportunidade no sentido de melhorar as metodologias já existentes na produção de aromas. Vários estudos têm sido realizados envolvendo microrganismos para produção de compostos aromáticos naturais (LOMASCOLO *et al.*, 1999; MUSSINAN & HOFFMAN, 1999; WHITEHEAD, 1998; HADAR & DOSORETZ, 1991). PASTORE *et al.* (1994) estudaram oito linhagens de *Neurospora* sp isoladas de "Beiju" de várias regiões do Estado do Maranhão, Brasil. Foram estudadas também linhagens de *Neurospora* sp cedidas pela NRRL (Northern Regional Research Laboratory, USDA, Peoria, Illinois,

USA) e linhagens isoladas do solo do Estado de São Paulo. O meio de cultura de *Neurospora* ATCC46892 e os outros meios de cultura das outras linhagens isoladas de Beiju apresentaram aroma de frutas, porém as linhagens da coleção de culturas NRRL e as isoladas de solo do Estado de São Paulo não produziram aroma de frutas. A linhagem *Neurospora sitophila* ATCC46892 produziu etil hexanoato (59 ppm), 3-metil-1-butanol, 1-octen-3-ol, acetato de etila e etanol. Etil hexanoato tem um forte aroma de frutas e todos os meios de cultura de *Neurospora* sp isolados a partir de Beiju apresentaram aroma de frutas devido ao etil hexanoato. A linhagem *Neurospora sitophila* ATCC46892 também produziu 40 ppm de 1-octen-3-ol que tem aroma de cogumelo.

BRIGIDO (2000) estudou vários parâmetros fermentativos para a produção de compostos voláteis de aroma por linhagens de *Neurospora* sp, isoladas de Beiju, de várias regiões do Estado do Maranhão. Três das linhagens, *Neurospora* sp1, *Neurospora* sp2, *Neurospora* sp5 produziram aroma bastante agradável de frutas e de cogumelo, variando apenas a intensidade, dependendo do meio de cultura utilizado. Os parâmetros considerados foram a composição do meio de cultura, concentração inicial de esporos, temperatura e adição de precursor. Os principais compostos obtidos foram aldeídos (acetaldeído), ésteres (acetato de etila, butirato de etila e hexanoato de etila) e álcoois (álcool isoamílico e 1-octen-3-ol).

2.2 – Compostos voláteis de aroma vegetais

Nos últimos anos tem aumentado o interesse na produção de compostos naturais, o que tem despertado numerosas pesquisas no isolamento e identificação de um grande número de voláteis em vegetais, como também pela extração de compostos de fontes naturais ou através de processos que possam ser denominados “naturais”, principalmente para a indústria de aromas para alimentos e bebidas (CASS *et al.*, 2000; TERANISHI *et al.*, 1999). A química do aroma dos vegetais tem sido o assunto de numerosas e excelentes revisões. Contudo, embora muitos voláteis tenham sido identificados nos vegetais, poucos trabalhos têm sido

feitos elucidando o caminho biossintético de sua formação e a contribuição relativa dos componentes individuais para o aroma característico ou agradável (TERANISHI *et al.*, 1999).

Os compostos de aroma podem ser obtidos de uma variedade de caminhos metabólicos nos sistemas vegetais; destes a via dos lipídeos desempenham um importante papel. Por exemplo, alguns produtos voláteis são derivados de ácidos graxos polinsaturados através da ação de várias enzimas. O Hexanal, organolepticamente conhecido por processar o “green note” dos vegetais, e por isso de interesse comercial, é derivado do ácido linoléico pela ação sequencial das enzimas lipoxigenase e hidroperóxido liase (CASS *et al.*, 2000).

Na biotecnologia dos aromas, a lipoxigenase (LOX) e a hidroperóxido liase (HPL) são as enzimas vegetais mais importantes usadas na indústria para produção do aroma natural que caracteriza o “green note”, ou seja, determinam o frescor de frutas e vegetais (SWIFT, 1999; TERANISHI *et al.*, 1999; BATE *et al.*, 1998; BERGER *et al.*, 1997; MATSUI *et al.*, 1996). Estas enzimas podem produzir uma ampla variedade de compostos aromáticos que podem ser usados como aditivos em alimentos, entre eles aldeídos, álcoois, ácidos e ésteres, gerados da degradação oxidativa dos ácidos linoléico e linolênico.

Nos tecidos vegetais os principais voláteis aromáticos, derivados da quebra enzimática do ácido linoléico ou do ácido linolênico, são compostos C6, como hexanal, 2-hexenal, 3-hexenal, e C9, como 3-nonenal, 2-nonenal, 3,6-nonadienal. O hexanal é o componente chave do aroma de frescor do tomate. O 2-nonenal e o 2,6-nonadienal são os compostos de impacto do pepino caracterizando o “green note”, ou seja determinam o frescor deste vegetal. O 3,6-nonadienal tem odor de melão (SWIFT, 1999; TERANISHI *et al.*, 1999; BATE *et al.*, 1998; BERGER *et al.*, 1997; MATSUI *et al.*, 1996).

O caminho geral biossintético dos compostos voláteis ocorre através de três passos (ASSAF *et al.*, 1997, 1995; HADAR & DOSORETZ, 1991). A Figura 1 ilustra os passos 2 e 3 da síntese do composto volátil hexanal.

1. hidrólise de lipídeos a ácidos graxos insaturados (principalmente ácidos linoléico e linolênico) por acil hidrolases.

2. hidroxidação de ácidos graxos polinsaturados, onde as LOXs são enzimas chave. LOXs catalisam a oxidação de ácidos graxos contendo um sistema cis, cis-1,4-pentadieno para produzir derivados conjugados hidroxidienos.

3. transformação de hidroxídios (HPODs) a álcoois e aldeídos voláteis pela clivagem enzimática com HPL, oxidorredutases (álcool desidrogenases), isomerases (cis-trans isomerases), enzimas redutoras de ligações duplas e enzimas formadoras de ésteres.

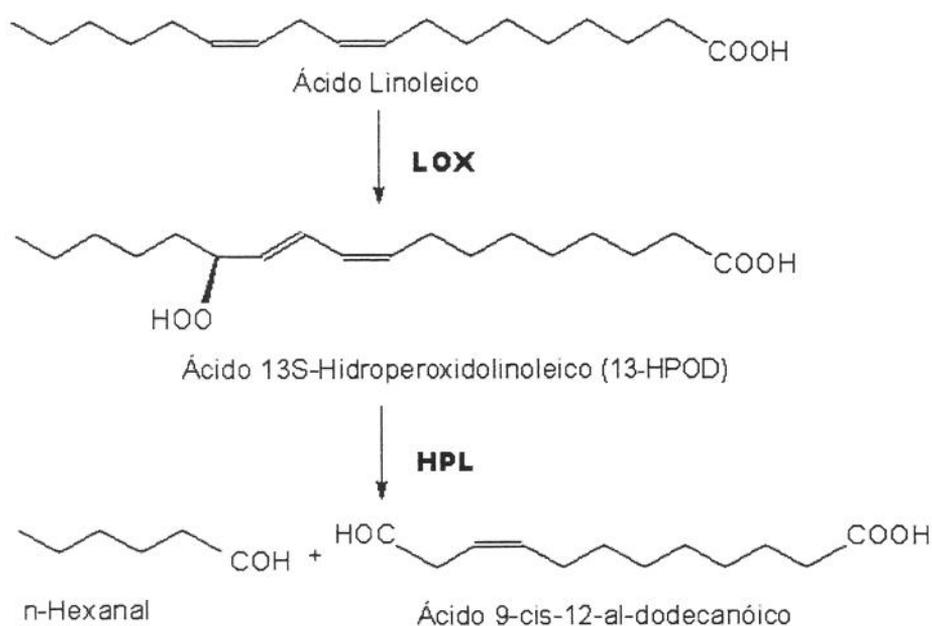


Figura 1: Esquema da biossíntese de n-hexanal a partir de ácido linoléico via LOX e HPL (SWIFT, 1999; BATE *et al.*, 1998; BERGER, 1997).

Alguns caminhos metabólicos para a síntese de compostos voláteis de aroma têm sido melhor estudados através de sistemas multienzimáticos, os quais constituem essencialmente de enzimas ligadas, imobilizadas, a uma membrana ou matriz, e estas enzimas catalisam um grupo de reações químicas consecutivas.

GARGOURI & LEGOY (1997) estudaram a bioconversão de ácidos graxos polinsaturados de triacilgliceróis a hidroxídios através de um sistema

bienzimático constituído de lipase e lipoxigenase. Os triacilgliceróis foram solubilizados em octano e hidrolizado pela lipase na interface com a fase aquosa. Os ácidos graxos polinsaturados foram então transferidos a fase aquosa e reagiram com a lipoxigenase. Os produtos da segunda reação, os hidroperóxidos, eram hidrofílicos e desta forma mantidos na fase aquosa. O desenvolvimento das duas reações enzimáticas sucessivas no meio foi estudado em um reator multifásico. Uma alta produção de hidroperóxidos foi obtida especialmente quando usou-se trilinoléico como substrato na presença de lipase de *Mucor javanicus* e lipoxigenase 1 de soja.

CASS *et al.* (2000) desenvolveram um sistema de reator "Hollow-Fiber" onde enzimas endógenas, lipoxigenase e hidroperóxido liase, extraídas de frutos de tomate, foram imobilizadas para produzir hexanal de ácido linoléico. Quando foi utilizado substrato exógeno na concentração de 16 mM numa pressão transmembrana de 70 kPa, a produção de hexanal foi cerca de 5,1 µg/min. Os autores também verificaram que este sistema de reator pode ser usado por períodos de até uma semana e tem se mostrado estável neste período.

2.2.1 – Lipoxigenases

Lipoxigenases (LOX, E.C. 1.13.11.12) são enzimas dioxigenases difundidas em organismos aeróbicos, incluindo plantas (GRECHKIN, 1998) como soja (FORNAROLI *et al.*, 1999; RICKERT & KLINMAN, 1999; WANG *et al.*, 1999; BERRY *et al.*, 1998, 1997; KATO *et al.*, 1991; YENOFKY *et al.*, 1988; SHIBATA *et al.*, 1987), pepino (FEUSSNER *et al.*, 1997; TERANISHI *et al.*, 1999), tomate (TERANISHI *et al.*, 1999; SUURMEIJER *et al.*, 1998), ervilha (WU *et al.*, 1995; KNUST & VON WETTSTEIN, 1992), como também nos tecidos de animais e fungos (LOMASCOLO *et al.*, 1999; BISAOWSHI & KERMASHA, 1998; ASSAF *et al.*, 1997, 1995; HADAR & DOSORETS, 1991; WURZENBERGER & GROSH, 1984).

Os substratos predominantes das LOXs nos vegetais são ácidos linoléicos e linolênicos. A especificidade da ação das LOXs, a disponibilidade destas enzimas, e

do metabolismo dos hidroperóxidos determinam a diversidade dos produtos da via LOX. O papel funcional das LOXs em plantas é ainda bastante desconhecido, contudo o metabolismo dos ácidos graxos está relacionado ao crescimento e desenvolvimento, senescência e resposta a doenças e machucados (SUURMEIJER *et al.*, 1998). Quando envolvida na cascata dos ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 3$, as lipoxigenases produzem uma variedade de compostos que podem funcionar como sinalizadores ou substâncias de defesa. Além disso, em frutas e outros produtos de alimento vegetal, LOX desempenha um importante papel de produção de compostos voláteis aromáticos (TERANISHI *et al.*, 1999; SUURMEIJER *et al.*, 1998; BERGER, 1997). A Tabela 2 mostra a função de alguns dos produtos diretamente produzidos pelas lipoxigenases em plantas, segundo GRECHKIN (1998).

Tabela 2: Atividades fisiológicas dos hidro(pero)xi de ácidos graxos C_{18} em plantas (GRECHKIN, 1998).

Hidroperóxidos e hidroxí derivados de ácidos graxos C_{18}	Atividade Fisiológica
13(S)-HPOT	- ativação da síntese de inibidores de proteinases induzidas em feridas de plantas
9(S)-HPOT	- fungitoxidade para diferentes patógenos de plantas
13(S)-HPO	- fungitoxidade para patógeno de arroz <i>Pyricularia oryzae</i>
9(S)-HPO	- fungitoxidade para patógeno de arroz <i>Pyricularia oryzae</i>
HPOT – 13(S)-hidroperóxi-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatrienóico	
HPOD – 13(S)-hidroperóxi-9(Z),11(E)-octadecadienóico	

Uma definição para a lipoxigenase, de acordo com a “Enzyme Classification” é linoleato:oxigênio oxido-redutase (GRECHKIN, 1998). O alvo de ataque destas enzimas é o sistema 1,4(Z,Z)-pentadienóico (BERGER, 1997; GRECHKIN, 1998) (ou 1,4 cis-cis-pentadieno (KATO *et al.*, 1992), como mostrado na Figura 2. A catálise da LOX inclui três estágios: (1) remoção do hidrogênio estereoespecífico do grupo metileno entre duas ligações duplas; (2) rearranjo antarafacial alílico do radical

livre resultante; (3) ligação do oxigênio molecular ao radical 2(E),4(Z)-pentadienil-1. O estágio 1 é considerado limitante da catálise da LOX.

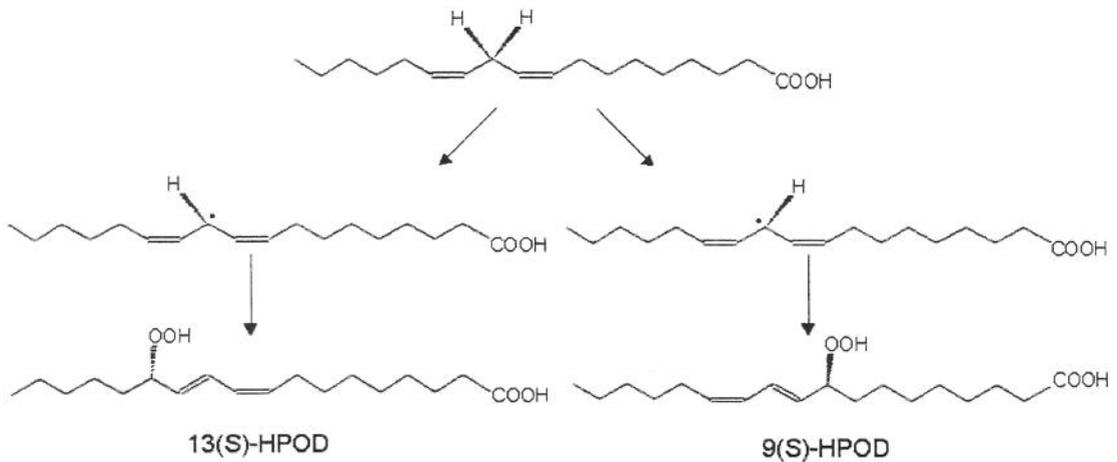


Figura 2: Lipoxigenase catalisando a oxigenação do ácido linoléico a 13(S)-hidroperóxido e 9(S)-hidroperóxido (GRECHKIN, 1998).

Os principais substratos para LOX em plantas e fungos são C 18:2, ω6 (linoleato) e C 18:3, ω3 (linolenato). Estes substratos são convertidos a intermediários cis/trans hidroperoxidienos que servem como substrato de outras enzimas em uma variedade de caminhos do metabolismo secundário (WANG *et al.*, 1999; KATO *et al.*, 1992; KNUST *et al.*, 1992). Muitas LOXs reportadas exibem alta regioespecificidade, e linoleato e linolenato podem ser transformados em 13 ou 9-hidroperóxidos. A regioespecificidade da ação da LOX é alterada pelas condições de pH e concentração de oxigênio do meio (GRECHKIN, 1998). Dependendo da fonte e das isoenzimas presentes, a incorporação de oxigênio pode ocorrer preferencialmente no C-9 (tomate), no C-13 (uva, LOX1 de soja), no C-9 ou no C-13 não especificamente (oliva e LOX 2 e LOX3 de soja) (SWIFT, 1999; TERANISHI *et al.*, 1999; BERGER *et al.*, 1997; SHIBATA *et al.*, 1987).

A lipoxigenase foi primeiramente descrita em 1932, em soja, e posteriormente em 1947, foi purificada e cristalizada (SHIBATA *et al.*, 1987). A soja contém três

isoenzimas: LOX-1 que apresenta atividade ótima em pH ótimo 9-10 e produz seletivamente 13-hidroperóxidos; e as isoenzimas LOX-2 e LOX-3 que são mais ativas em pH 6-7 e produzem uma mistura de hidroperóxidos isômeros de posição (SWIFT, 1999; SHIBATA *et al.*, 1987). Todas estas isoenzimas são proteínas monoméricas.

Dificuldades no isolamento de quantidades significativas de LOX na forma pura, faz desejável produzir organismos recombinantes que expressem grandes quantidades desta enzima para investigar as suas características bioquímicas e explorar as suas múltiplas funções. Nos últimos anos, cDNAs e clones genômicos que codificam isoenzimas de lipoxigenase têm sido isolados e sequenciados. (KNUST & WETTSTEIN, 1992; EALING & CASEY, 1989, 1988; SHIBATA *et al.*, 1987; YENOFISKY *et al.*, 1988; CASEY *et al.*, 1999). Três isoenzimas de soja foram estudadas, LOX-1, LOX-2 e LOX-3, as quais contêm 838, 865 e 859 resíduos de aminoácidos, e pesos moleculares de 94, 97 e 96 kDa, respectivamente (GRECHKIN, 1998; SHIBATA *et al.*, 1987). A isoenzima LOX-1 demonstrou uma preferência pelo carbono 13 como sítio para hidroperoxidação, em contraste com LOX-2 e LOX-3, as quais utilizam carbono 9 ou 13 (SHIBATA *et al.*, 1987). A LOX-1 de soja na forma cristalina está disponível comercialmente, e tem demonstrado ter atividade sobre ácido linoléico (28 g/L) a 4 atm de pressão de O₂, produzindo 80% de ácido 13(S)-13-hidroperoxi-9,11-octadecadienóico (SWIFT, 1999).

Vários suportes têm sido usados para imobilizar lipoxigenase, algumas vezes em combinação com um co-solvente orgânico. Usando LOX de soja imobilizada em matriz carbonildiimidazole-ativado, 80% de 13-hidroperóxido de ácido linoléico foi produzido em um sistema de duas fases isooctano-água, com 2 g/L de ácido linoléico disponível.

KNUST & WETTSTEIN (1992) citaram alguns trabalhos onde isoenzimas de sementes de ervilha foram clonadas. As isoenzimas das sementes obtidas mostraram 93% de similaridade entre LOX-3 de soja e ervilha, e 91% de similaridade entre LOX-2 de soja e ervilha. O peso molecular das isoenzimas LOX-2 e LOX-3 de ervilha foram estimadas em 97134 e 97628 daltons, respectivamente.

Para a expressão de duas isoenzimas de sementes de ervilha em *Saccharomyces cerevisiae*, KNUST & WETTSTEIN (1992) usaram dois diferentes promotores de levedura, um promotor constitutivo forte, fosfoglicerato quinase (PGK), e um promotor induzível (GAL 1), o qual regula o gene galactocinase, pela adição de galactose ao meio. Ambos promotores foram usados com sucesso para a síntese das proteínas heterólogas ativas em levedura.

Para determinar a importância da lipoxigenase na geração dos aldeídos e álcoois voláteis C6 e compostos de aroma, dois genes antisense LOX foram construídos para dois dos três genes LOX de tomate (*TomloxA* e *TomloxB*) e transferidos para plantas de tomate (GRIFFITHS *et al.*, 1999). Níveis reduzidos de mRNAs de *TomloxA* e *TomloxB* (2-20% do tipo selvagem) foram detectados nos frutos transgênicos contendo os genes antisense comparado com as plantas não-transformadas. Contudo, a análise dos voláteis de aroma indicou que não havia alterações significativas. Isto sugeriu que pequenos níveis de LOX são suficientes para a geração dos aldeídos e álcoois C6 ou que a isoforma *TomloxC*, na ausência de *TomloxA* e *TomloxB*, é responsável pela produção destes compostos.

2.2.2 – Hidroperóxido liases

As hidroperóxido liases são tão importantes quanto as lipoxigenases na biossíntese de aldeídos e álcoois voláteis, os quais constituem o aroma característico de frutas, vegetais e folhas verdes, e portanto possui ampla aplicação na indústria de alimentos para a produção de aditivos de aroma (BATE *et al.*, 1998; MATSUI *et al.*, 1996; SHIBATA *et al.*, 1995).

Apesar de sua longa história e grande importância, as HPLs ainda não foram registradas na classificação da “Enzyme Classification” (GRECHKIN, 1998). Estas enzimas estão amplamente distribuídas nos tecidos vegetais (SWIFT, 1999; GRECHKIN, 1998), como tomate, alfafa (NOODERMEER *et al.*, 1999), melancia, folhas de chá, tabaco, pepino, soja, banana, *Arabidopsis thaliana* (BATE *et al.*, 1998;

LAUDERT *et al.*, 1996), girassol (ITOH & VICK, 1999), “mung bean” (REHBOCK *et al.*, 1998), pimentão (MATSUI *et al.*, 1996; SHIBATA *et al.*, 1995), nos tecidos de fungos (ASSAF *et al.*, 1997, 1995; HADAR & DOSORETS, 1991; WURZENBERGER & GROSH, 1984).

As hidroperóxido liases catalisam a clivagem de hidroperóxidos de ácidos graxos entre o carbono hidroperóxido e o grupo vizinho metino de dupla ligação, gerando aldeídos e ω -oxo-ácidos. (GRECHKIN, 1998; MATSUI *et al.*, 1996). O esquema geral da conversão de hidroperóxidos de ácido linolênico e linoléico é apresentado na Figura 3.

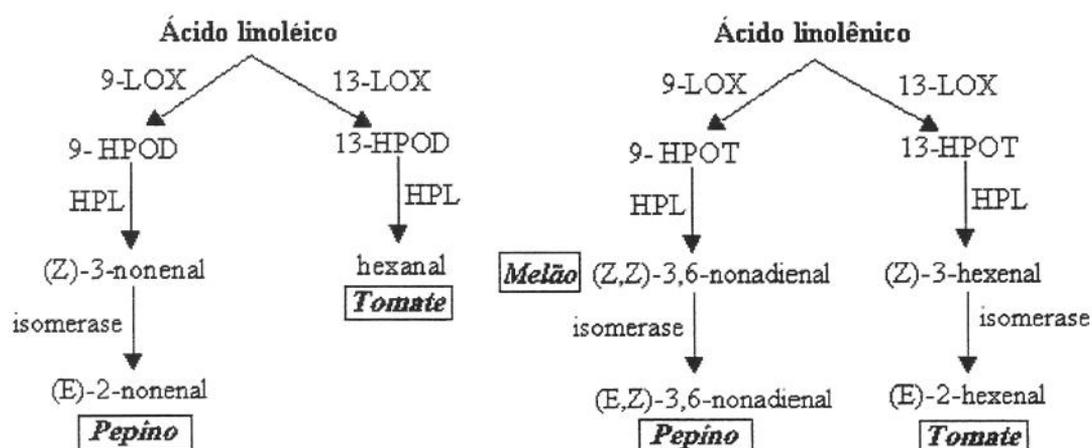


Figura 3: Formação de compostos voláteis aromáticos nos tecidos vegetais pela ação das enzimas LOX e HPL e suas diferentes especificidades pelo substrato (TERANISHI *et al.*, 1999; SWIFT, 1999).

Muitas das HPLs agem regioespecificamente utilizando 13 e 9-hidroperóxidos, e normalmente corresponde a regioespecificidade das LOXs no mesmo tecido. Baseados na especificidade ao substrato as HPLs podem ser divididas em três classes nos tecidos vegetais: 9-, 13- e HPLs não específicas. Esta especificidade ao substrato determina a composição do aroma em muitos vegetais a despeito da ação específica da LOX. Por exemplo, no tomate, LOX forma preferencialmente 9-hidroperóxidos (9HPOD) ainda que a HPL especificamente clive 13HPOD levando a

produção de C6-aldeídos como o hexanal (Figura 1) o qual é o componente chave do aroma de frescor do tomate (TERANISHI *et al.*, 1999). Em pimentão a HPL também exibe especificidade pelo 13HPOT, produzindo (Z)-3-hexenal (MATSUI *et al.*, 1996). Em contraste o C9 carbonil desempenha um importante papel no aroma de pepino, onde o (z)-3-nonenal é rapidamente rearranjado a (E)-2-nonenal. O composto (Z,Z)-3,6-nonadienal tem odor de melão e pode ser convertido a (E,Z)-2,6-nonadienal que caracteriza o composto de impacto do pepino. A Figura 3 ilustra as reações de formação de voláteis a partir dos ácidos linoléico e linolênico.

Muitas HPLs são enzimas ligadas a membrana. A HPL de melancia apresenta-se como exceção, sendo proteína solúvel com massa molecular de 250 kDa. As HPLs de folhas de chá e espinafre estão localizadas em tilacóides de cloroplasto. As enzimas de frutas de pepino e tomate têm localização extraplastidial e massa molecular de 200 kDa.

Foi constatado que a HPL de soja se apresenta na forma de tetrâmero, de 4 subunidades de 62 kDa. Um recente trabalho identificou HPL de frutos de pimentão como Citocromo P450, e o cDNA desta enzima codificou 480 aminoácidos (GRECHKIN, 1998).

A HPL de folha de chá foi purificada e revelou que é provavelmente uma proteína monomérica com massa molecular de 55 kDa. Este dado permite propor que HPLs de massa molecular entre 200-250 kDa são compostas de algumas subunidades (SWIFT, 1999; GRECHKIN, 1998). A HPL de folha de chá foi inibida por anti-oxidantes como BHA e ácido nordihidroguaiarético, os quais são conhecidos como potenciais inibidores de lipoxigenase, e foi também inibida por altas concentrações de seu substrato o 13-hidroperóxido de ácido linoléico (SWIFT, 1999). Duas isoenzimas de HPL de pimentão foram purificadas, ambas apresentando trímeros de subunidades de 55k Da. Estas isoenzimas foram inibidas por anti-oxidantes lipofílicos como α -tocoferol e ácido nordihidroguaiarético.

SHIBATA *et al.* (1995) purificaram HPL de frutos de pimentão para estudar as propriedades da enzima. Eles conseguiram separar duas frações com atividade para

HPL, as quais foram denominadas de HPL I e HPL II. Estas duas enzimas apresentaram atividade em pH ao redor de 5,5. Em gel SDS-poliacrilamida, a separação por eletroforese, mostrou que ambas as isoformas apresentaram massas moleculares de 55 kDa para cada subunidade, e massa de 170 kDa, por gel filtração, sugerindo que elas apresentam trimeros de 55 kDa.

Eles também estudaram os efeitos de alguns reagentes na atividade das enzimas purificadas. As atividade de HPL I e HPL II foram consideravelmente inibidas pelo ácido nordihidroguaiarético e α -tocoferol, ambos considerados antioxidantes lipofílicos. Também foi verificado que 13-hidroperóxidos são substratos para as isoenzimas, enquanto que 9-hidroperóxidos não apresentaram atividade.

Muitos trabalhos têm descrito a ampla distribuição destas enzimas em plantas, e seu envolvimento na biossíntese de aldeídos e álcoois voláteis, os quais são importantes para a caracterização de aroma de frutas, vegetais e folhas verdes (MATSUI *et al.*, 1996; SHIBATA *et al.*, 1995). Contudo, o papel fisiológico destas enzimas ainda não está muito bem elucidado. Já se sabe que (Z)-3-hexenol e (E)-2-hexenal foram sintetizados durante resposta de hipersensibilidade-resistência de "kidney-bean", e que (E)-2-hexenal é um agente anti-bacteriano amplamente efetivo (MATSUI *et al.*, 1996).

Embora algumas HPLs já tenham sido purificadas de folhas de chá, de sementes e folhas de soja, e parcialmente caracterizadas, pouco se conhece de sua estrutura, mecanismo de reação, localização celular e sua função fisiológica. A análise espectrofotométrica de enzimas purificadas de frutos de pimentão (*Capsicum annum* L.) revelou que a enzima é uma proteína heme possuindo um heme b (protoheme IX) como grupo prostético. Embora as espécies heme e propriedades espectrofotométricas assemelhem-se grandemente a um típico citocromo P-450, pouco se conhece das características essenciais no diagnóstico das HPLs como membros da família P-450. Apesar de algumas evidências apontarem HPL como P-450, MATSUI *et al.* (1996) clonaram cDNA que codifica hidroperóxido liase de frutos imaturos de pimentão para determinar a estrutura primária da enzima. Eles

verificaram que este cDNA codifica 480 aminoácidos e compartilha homologia com P-450s, principalmente no C-terminal. A mais próxima relação de P450 é a enzima aleno óxido sintetase (CYP 74^A) com a qual apresentou 40% de identidade.

BATE *et al.* (1998) realizaram a caracterização bioquímica e molecular de um gene *Arabidopsis* que é homólogo ao gene de HPL clonado em pimentão. A seqüência deduzida da proteína, a partir da seqüência do gene, indicou que este gene codifica um citocromo P-450 com uma estrutura similar a de aleno óxido sintetase. Este gene foi clonado em um vetor de expressão e expressado em *E. coli* para demonstrar atividade da hidropéroxido liase. A atividade significativa foi evidente quando ácido 13-(S)-hidropéroxido-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatrienóico (HPOT) foi usado como substrato, enquanto que a atividade com ácido 13(S)-hidropéroxido-9(Z),11(E)-octadecadienóico (HPOD) foi aproximadamente dez vezes menor. A análise dos voláteis por cromatografia gasosa-espectrometria de massa, após adição do substrato ao extrato de *E. coli* expressando a proteína, confirmou a atividade da enzima pela produção de cis-3-hexenal, enquanto que a atividade de hexanal foi limitada.

2.3 – Expressão de proteínas heterólogas em *Saccharomyces cerevisiae*

Com o advento da biologia molecular e do desenvolvimento das técnicas de engenharia genética, tornou-se possível a manipulação de genes. Através da transformação genética de um organismo é possível fazer com que ele apresente novas características que até então não eram expressas. Da mesma forma, é possível eliminar características não desejáveis.

O desenvolvimento da genética de leveduras, sua bioquímica, fisiologia e processos de engenharia, proporcionaram as bases para um rápido progresso na biotecnologia moderna. A tecnologia do DNA recombinante agora permite a produção de proteínas e peptídeos em larga escala. O aumento ou redireção do fluxo metabólico ou alteração da via metabólica pode ser realizada pelo uso da

tecnologia do DNA recombinante (JIN *et al.*, 1997). Proteínas de interesse farmacêutico e industrial de difícil ou impossível obtenção pelos métodos tradicionais podem agora ser produzidas. Proteínas com novas propriedades também podem ser produzidas em larga escala. Devido ao aumento de demanda, o gene para uma proteína de interesse pode ser clonado e expressado a altos níveis em um organismo hospedeiro adequado (KING *et al.*, 1988).

Entre uma variedade de sistemas hospedeiros, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o eucarioto mais amplamente utilizado para produção de proteínas heterólogas. O sucesso desta levedura para tal finalidade pode ser atribuído ao largo conhecimento que se tem deste organismo, o qual tem sido extensivamente caracterizado geneticamente e seu genoma completamente sequenciado (LUNDBLAD, 1997; SMITH, 1998). A *S. cerevisiae* oferece algumas vantagens para a expressão de genes heterólogos. Como um microrganismo unicelular, retém a vantagem de um sistema bacteriano em relação a fácil manipulação genética e crescimento, possui DNA nuclear haplóide, 3,5 vezes maior do que o de *E. coli*, ainda considerado um genoma pequeno, além de mostrar algumas características de eucariotos superiores. Diferentemente do sistema procarioto, há muitas evidências de que processos celulares são mecanicamente conservados entre diferentes organismos eucariotos e *S. cerevisiae* (LUNDBLAD, 1997). Sua organização subcelular eucariótica capacita essas células de carrear um preciso processamento e modificações pós-transcricionais, eventos requeridos para produzir proteínas ativas. (SONG & CHUNG, 1999; BUCKHOLZ & GLEESON, 1991). Estes organismos também possuem um sistema bem definido para secreção de proteínas para o meio extracelular, ou a expressão intracelular pode ser utilizada para acumular altos níveis de proteínas, comumente cerca de 5% do conteúdo total de proteínas celulares (KING *et al.*, 1988). Em casos excepcionais, o acúmulo de proteínas pode ser muito superior, como para o antígeno da hepatite B, e para superóxido dismutase, aos quais 40 % e 30-70% do conteúdo protéico celular tem sido obtido.

As células de leveduras mostram uma notável preferência por glicose (e alguns outros poucos açúcares) como fonte de carbono. Na presença de glicose, uma variedade de caminhos metabólicos são afetados, resultando em inumeráveis mudanças no metabolismo intermediário, cofatores e produtos finais (ROLLAND *et al.*, 2001). A repressão por glicose é uma consequência de um complexo fenômeno regulatório, onde a glicose externa é detectada e através de um caminho de transdução a expressão de alguns genes é reprimida (OLSSON *et al.*, 2000). A repressão por glicose exerce sua regulação em nível de gene, ligando-se a proteínas regulatórias na região dos genes regulados. Um complexo de proteínas (Mig1, Ssn6 e Tup1) liga-se ao promotor dos genes que são reprimidos. As proteínas Ssn6 e Tup1 são responsáveis pela real inibição, enquanto Mig1 é responsável pela ligação ao DNA e direciona o complexo de proteínas para os respectivos promotores (Figura 4). A regulação das enzimas envolvidas na conversão da galactose a glicose-6-fosfato está sob duplo controle: a expressão do gene é reprimida por glicose e induzida por galactose.

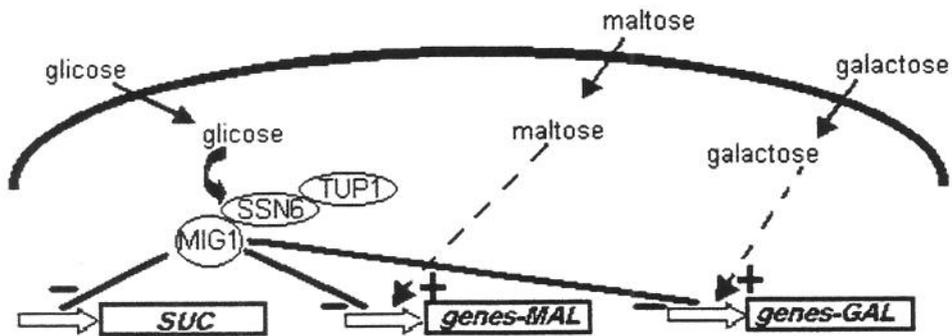


Figura 4: Esquema da cadeia de repressão por glicose e sua influência sobre outras fontes de carbono (maltose e galactose). – repressão e + desrepressão (OLSSON *et al.*, 2000).

Leveduras tipo selvagem são prototróficas, isto é, são nutricionalmente auto-suficientes, capazes de crescer em meio mínimo. Estudos de genética clássica identificaram algumas linhagens de leveduras auxotróficas, as quais requerem suplementação nutricional para crescimento em meio mínimo. Os requerimentos nutricionais destas linhagens são as bases para a seleção de leveduras

transformadas com sucesso. Portanto, um gene pode ser inserido em um plasmídeo que complemente um ou mais genes defectivos em um hospedeiro auxotrófico, e o recombinante pode ser facilmente selecionado em meio mínimo. Então, uma linhagem que requer leucina (LEU 2) irá crescer sobre meio mínimo se ela “abrigar” um plasmídeo expressando o gene LEU 2. Os marcadores de seleção mais comumente encontrados em levedura são para leucina (LEU 2), uracila (URA 3), histidina (HIS 3) e triptofano (TRP 1) (SMITH, 1998).

Muitos vetores (ou plasmídeos) de clonagem de leveduras têm sido construídos para suprir o crescimento das técnicas de biologia molecular. Os vetores são agrupados em cinco classes gerais, baseado no modelo de replicação na levedura: YIp, YRp, YCp, YEp e Ylp, e todos estes podem ser mantidos tanto em *E. coli* quanto em *S. cerevisiae*. A classe de plasmídeos de replicação circulares, YEp (“yeast episomal plasmids”), contêm seqüências de um plasmídeo que ocorre naturalmente em levedura chamado de 2 μ m. Estas seqüências 2 μ m permitem replicação extracromossomal e confere alta freqüência de transformação (cerca de 10⁴ a 10⁵ transformantes/ μ g de DNA). Estes plasmídeos são comumente usados para grandes níveis de expressão de um gene em levedura, devido a sua habilidade de propagar-se relativamente de forma estável através das mitoses e meioses em alto número de cópias (20 a 50 cópias). Vetores YEp variam na proporção de DNA 2 μ m que eles carregam, embora muitos carreguem apenas as seqüências essenciais para a replicação autônoma (LUNDBLAD, 1997).

O vetor de expressão pYES 2 (Invitrogen) com 5,9 Kb, é designado para induzir expressão de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae*. Características deste vetor permitem a fácil clonagem de um gene de interesse e seleção dos transformantes por complementação com uracila. O pYES 2 possui os seguintes elementos:

- Promotor GAL 1 de levedura, induzido por galactose para expressão de altos níveis de proteína heteróloga em levedura e reprimido por glicose;

- Seqüência "2 μ origin" (2 μ m) que permite replicação extracromossomal e confere alta freqüência de transformação e relativa estabilidade através das divisões celulares em alto número de cópias;
- Um sítio versátil de multipla clonagem para clonagem simplificada;
- Terminador transcricional CYC 1 (C terminal) para a eficiente terminação do mRNA;
- Gene URA 3 para seleção dos transformantes em levedura hospedeira com genótipo *ura3* (ou seja, levedura deficiente no gene URA 3);
- Gene de resistência a ampicilina para seleção em *E. coli* (veja MAPA 1, Materiais e Métodos, item 4.1.4).

O gene URA 3 codifica a orotidina-5'fosfato descarboxilase, uma enzima que é requerida para a biossíntese de uracila. Células *ura3*⁻ (ou *ura5*⁻) podem ser selecionadas em meio mínimo contendo FOA (ácido 5-fluoro-orótico). Células URA3⁺ morrem porque o FOA parece ser convertido em um composto tóxico, 5-fluorouracila, pela ação da descarboxilase, enquanto que *ura3*⁻ são resistentes. O procedimento de seleção pelo FOA pode ser usado para produzir marcadores *ura3* em linhagens de leveduras haplóides por mutação (www.dbb.urmc.rochester.edu).

As leveduras têm sido usadas na indústria de fermentação e panificação por séculos, e suas propriedades de crescimento e metabolismo em larga escala têm sido bem estudados. Então, a expressão de algumas proteínas recombinantes é uma escolha adequada que combina custo-eficiência e método de produção com a habilidade de modificação pós-transcricional em uma maneira apropriada.

Somado ao fato de que a *S. cerevisiae* é um organismo de fácil manipulação genética, o seu cultivo e manuseio para a indústria já são bastante conhecidos, apresentando a grande vantagem de exigirem curto tempo de produção, podendo ser produzidos em qualquer época do ano, utilizando, geralmente, substratos de baixo custo, além de demanda de espaço relativamente pequeno para o processo

fermentativo. Também tem apresentado boa adaptação a condições aeróbicas e anaeróbicas. Além disso, há extensivas informações sobre a segurança da *S. cerevisiae* como um organismo GRAS (Generally Regarded As Safe) para o seu uso na indústria de fermentação.

3 – OBJETIVOS

Este projeto teve por objetivo geral desenvolver um modelo de expressão de proteínas heterólogas responsáveis pela síntese de aroma vegetal em *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos Específicos:

1. Clonar os cDNAs de lipoxigenase 1 (LOX-1) de sementes imaturas de soja e hidroperóxido liase (HPL) de fruto de pimentão verde;
2. Produzir vetores de expressão baseados no plasmídeo pYES 2 para produção das proteínas LOX-1 e HPL em levedura;
3. Confirmar o padrão de expressão em *Saccharomyces cerevisiae* por *Northern blot*;
4. Cultivar a levedura em meio com um indutor, galactose, e com substrato, ácido linoléico, e verificar a síntese de compostos aromáticos vegetais por cromatografia gasosa.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Materiais

4.1.1 – Materiais biológicos

Sementes imaturas de soja (*Glycine max*) e frutos de pimentão verde (*Capsicum annuum*).

Foi utilizada uma linhagem de *S. cerevisiae*, INVSc-1, para a expressão dos genes.

A linhagem *E. coli* DH5 α F' foi empregada para a clonagem prévia das construções em pYES2.

4.1.2 – Reagentes

Padrões Cromatográficos

Hexanal e butanol (Reagentes Sigma – Grau Analítico).

Oligonucleotídeos

As seqüências dos oligonucleotídeos específicos foram determinadas a partir das seqüências descritas nos trabalhos de SHIBATA (1987), para soja e de MATSUI *et al.* (1996), para pimentão, as quais podem ser encontradas na página do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) através dos números de acesso JO2795 e U51674, respectivamente.

lox-sense: 5'-GGGGTACCTTGGCAAAGATGTTTTTCAGCAGGC-3'

lox-antisense: 5'-ACCGCTCGAGAAACACAGGCTCCCTTAGATAGAGATGCTA-3'

lox-rt: 5'-AAACACAGGCTCCCTTA-3'

lox-sense1-s1: 5'-GAAATGGAACGGGAGAGCG-3'

lox-sense2-s1: 5'-GATGAAGAATTTGCTAGAGAG-3'

lox-antisense -s1: 5'-TCTCTACAGCTTCTTTCCAC-3'

hpl-sense: 5'-GGGGTACCAATGATACCTATAATGAGCTCTGCTCCTCTA-3'

hpl-antisense: 5'-GCTCTAGATCAGCAGGCTTTTTTTCACAGATG-3'

hpl-rt: 5'-TCAGCAGGCTTTTTTTCACA-3'

hpl-sense-s1: 5'-CAGATTAAGAACTTTTTTCATTGGACA-3'

hpl-antisense-s1: 5'-CCCAACTTTTTCCCTCACTTC-3'

4.1.3 – Meios de cultura

Para testes de laboratório, foram utilizados os meios padrões.

Meios de cultura para leveduras

YPD – meio completo (AUSUBEL *et al.*, 2001): 1% de extrato de levedura (yeast extract); 2% de peptona; e 2% de dextrose; 1,5% de ágar para meio sólido.

YPB – meio mínimo (AUSUBEL *et al.*, 2001): 3% de glicose; 0,125% de mistura de aminoácidos (sem uracila); 1% de YNB (Yeast Nitrogen Base – without amino acids); 1,5% de ágar para meio sólido.

YPAD – meio completo (The LiAc Trafo Method Page – www.umanitoba.com): 6% de extrato de levedura (yeast extract); 12% de peptona; 12% de glicose; 0,06% de adenina hemissulfato.

SC – meio mínimo (Invitrogen, EUA, 1998): 0,67% YNB; 2% de fonte de carbono (glicose ou rafinose); 0,01% (adenina, arginina, cisteína, lisina, treonina, triptofano); 0,005% (ácido aspártico, histidina, isoleucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina, valina); 2% de ágar para meio sólido.

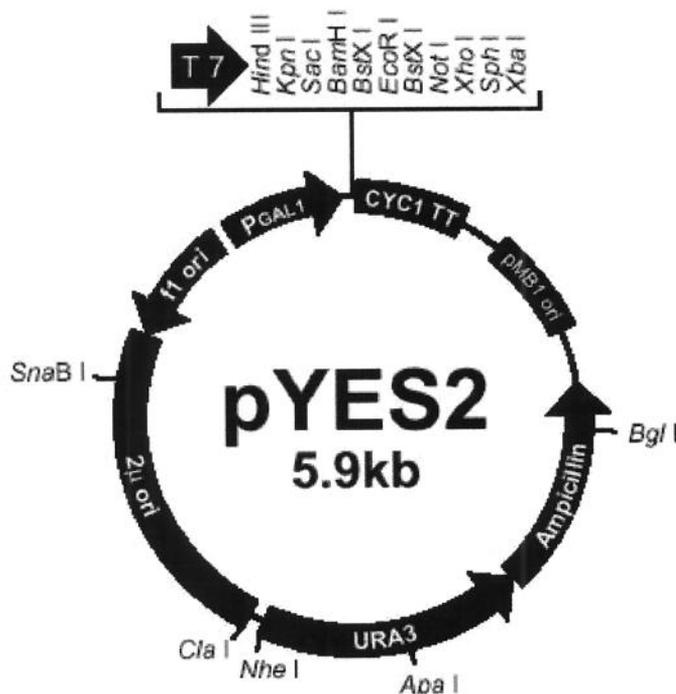
SC – meio de indução (Invitrogen, EUA, 1998): 0,67% YNB; 2% de galactose; 1% de rafinose; 0,01% (adenina, arginina, cisteína, lisina, treonina, triptofano); 0,005% (ácido aspártico, histidina, isoleucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina, valina).

Meios de cultura para bactérias

LB (SAMBROOK *et al.*, 1989): 1% de tripton; 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de NaCl; utilizando para a seleção o antibiótico ampicilina (50 µg/ml).

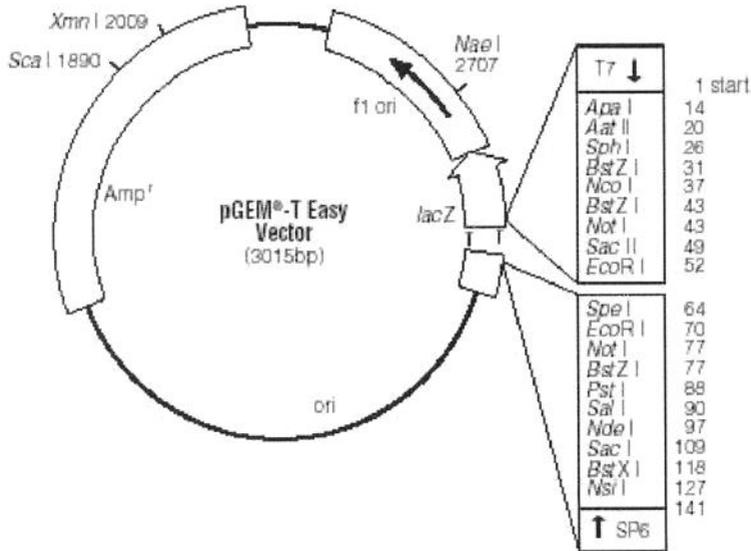
4.1.4 – Plasmídeos

pYES2 (Invitrogen, EUA) – de 5,9 kb. Este plasmídeo contém marca de seleção URA3 para levedura e Amp^R (resistência a ampicilina para bactéria). Permite expressão gênica controlada em levedura na presença de galactose. Veja mapa 1 (www.invitrogen.com).



Mapa 1

pGEM-T Easy (Promega, EUA) – de 3 kb. Este plasmídeo contém marca de seleção Amp^R, permite manipulação em *E. coli* (mapa 2).



Mapa 2

4.2 – Métodos

4.2.1 – Extração de RNA

Toda vidraria a ser utilizada foi queimada (mantida numa estufa a 180 °C por 8 horas) ou tratada com água oxigenada 13 volumes por 15 minutos, para que ficassem livres de RNase. As sementes imaturas de soja, mantidas em freezer a -70°, foram descongeladas em gelo e maceradas em tampão de extração (50 mM TrisHCl pH 8.0; 20 mM EDTA pH 8.0; 50 mM β- mercaptoetanol; 8 M guanidina HCl) (LOGEMANN *et al.*, 1987) e uma pitada de pó de sílica. Após macerar, completou-se o volume de tampão para 700 µl e adicionou-se 700 µl de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico (25:24:1 v/v) e agitou-se vigorosamente em agitador magnético. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm a 4°C e à fase superior adicionou-se 1 volume de Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1 v/v). Centrifugou-se por 15 minutos a 13.000 rpm a 4°C. A fase superior foi precipitada por no mínimo 2 horas a -20°C, com 0.2 volume de NaAc 3M pH 5.0 e 1 volume de etanol absoluto gelado. Centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e acrescentou-se etanol 70%, procedeu-se a

centrifugação, nas mesmas condições. Este último passo foi repetido, e então o precipitado foi ressuspenso em 30 μL de H_2O tratada com 0,1 % DEPC (dietil pirocarbonato) e autoclavada. Ao RNA foi adicionado tampão desnaturante (1x MOPS; 17.5% formaldeído; 50% formamida; 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de EtBr; 15% tampão de carga) e a desnaturação foi realizada a 56°C durante 15 minutos. Posteriormente, o RNA foi quantificado em gel de agarose/formaldeído (1% agarose, 1x MOPS [0.2M MOPS; 50mM NaAc; 10mM EDTA], 2.5% formaldeído).

Para a extração de RNA total do fruto de pimentão verde, pedaços de aproximadamente 1 cm^2 foram colocados em tubos eppendorfs e macerados em tampão de extração, e a extração ocorreu seguindo-se a mesma metodologia descrita para sementes imaturas de soja.

4.2.2 – Reação RT-PCR

A síntese de cDNA, utilizando oligos-RT específicos, foi realizada a partir de RNA total, utilizando transcriptase reversa, segundo orientação do fabricante da enzima (GibcoBRL – Life Technologies). A reação de síntese de cDNA iniciou-se com 4 μL de RNA (1-5 μg), 2,5 μL de oligo-RT, 1 $\text{pmol}/\mu\text{L}$, em volume final de 14 μL , mantido a 70°C, por 10 minutos, e 1 minuto no gelo. Posteriormente, acrescentou-se 0,2 μL de DTT 0,1 M, 0,5 μL de HPRI (inibidor de RNase), 2,5 μL de tampão PCR 10x, 2 μL da mistura dos 4 dNTPs 5mM e 2,5 μL de MgCl_2 , e então mantido a 42°C por 1 minuto, e finalmente acrescentou-se 1 μL da enzima Super Script II, a 42°C por 50 minutos.

Após a síntese do cDNA, este foi amplificado por reação de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando uma Taq DNA polimerase, segundo metodologia do fabricante da enzima (APBiotech, Brasil). A reação se procedeu com 2,5 μL de tampão da enzima 10x, 1 μL da mistura dos 4 dNTPs 5mM, 1,25 μL do oligo-sense 10mM, 1,25 μL do oligo-antisense 10mM, 1 μL da reação RT (cDNA) e 0,5 μL da enzima Taq DNA Polymerase, para um volume final de 25 μL . O programa da

reação de PCR foi 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos (94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento dos oligos por 30 segundos, 72°C por 2 minutos), 72°C por 7 minutos, terminando com 4°C ∞. A eficiência e o tamanho do DNA amplificado foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1x (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA).

O cDNA de HPL foi amplificado com um kit conhecido por Elongase™ Enzyme Mix (LIFE TECHNOLOGIES, USA), o qual consiste de uma mistura de Taq DNA polimerase com DNA polimerase termoestável de *Pyrococcus species*. A reação se procedeu com 2,5 µL de tampão A 5x, acrescido de 2,5 µL de tampão B 5x, 1 µL da mistura dos 4 dNTPs 5mM, 1,25 µL do oligo-sense 10mM, 1,25 µL do oligo-antisense 10mM, 1 µL da reação RT (cDNA) e 1 µL da mistura das enzimas Taq DNA Polymerase e DNA polimerase termoestável de *Pyrococcus species*, 14,5 µL de água Milli Q autoclavada. O programa da reação de PCR se deu como descrito acima.

4.2.3 – Obtenção das construções pYES2-LOX-1 e pYES2-HPL para clonagem e expressão em *S. cerevisiae*

Clonagem dos genes LOX-1 e HPL no plasmídeo pGEM-T Easy

Após a amplificação dos DNAs de LOX-1 e HPL por PCR, estes foram isolados em gel de agarose 0,8%, e o fragmento de DNA correspondente a cada gene foi purificado utilizando-se um kit de extração (Concert Rapid Gel Extraction System – GibcoBRL – Life Technologies). Após purificação, os DNAs de LOX-1 e HPL foram inseridos, isoladamente, no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega, EUA) utilizando-se o kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega, EUA). Os plasmídeos então foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli*, DH5αF', pelo método de choque térmico. As bactérias que continham os plasmídeos recombinantes foram selecionadas em meio de cultura LB sólido contendo ampicilina e X-Gal, segundo SAMBROOK *et al.* (1989).

Extração de DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi feita por lise alcalina (Kit Colunas Qiagen (Qiagen, EUA). As colônias, prováveis recombinantes, foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina, e incubadas "over night" a 37°C, em agitação de 300 rpm. Após incubação, 1,4 mL foi transferido para um tubo eppendorf e centrifugado a 14.000 rpm por 30-60 segundos. O sobrenadante foi descartado, e o procedimento anterior repetido. Ressuspendeu-se as bactérias em 300 µL de solução de extração 1 (Tris-HCl, pH8,0, 50 mM, EDTA, pH8,0, 10 mM, RNase, 100µg/mL). Adicionou-se 300 µL de solução de extração 2 (NaOH 200 mM, SDS 1%), agitou-se suavemente por inversão, e manteve-se a 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 300 µL de solução de extração 3 (acetato de potássio 3 M, ajustado com ácido acético glacial para pH 5,5), e agitou-se suavemente por inversão. Esta mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para novo tubo eppendorf. Foi adicionado 400 µL de isopropanol, e o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e foi acrescentado 700 µL de etanol 70% gelado, o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm, 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado contendo o DNA foi secado e ressuspendido com 20 µL de água Milli Q autoclavada.

Clonagem dos genes LOX-1 e HPL no vetor pYES2

Os DNAs plasmidiais foram então clivados com enzimas de restrição (segundo a instrução do fabricante para cada enzima). Para LOX-1 utilizou-se Kpn I e Xho I, e para HPL, Kpn I e EcoR I. Os insertos foram recuperados através de eletroforese em gel de agarose, e os DNAs purificados com o kit Concert Rapid Gel Extraction System (GibcoBRL – Life Technologies). Os genes foram inseridos no plasmídeo pYES-2 (Invitrogen, EUA) clivado com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para os insertos. As ligações dos DNAs LOX-1 e HPL com os respectivos DNAs plasmidiais, ocorreram com a enzima T4 DNA ligase, segundo orientação do

fabricante da enzima (APBiotech, Brasil). Os plasmídeos recombinantes foram então transformados em células competentes *E. coli* DH5 α F'. Os transformantes foram selecionados através de meio de cultura LB sólido contendo ampicilina, seguindo-se a extração do DNA plasmidial.

Transformação de levedura

Os DNAs plasmidiais, construções pYES2-LOX-1 e pYES2-HPL foram utilizados para transformar leveduras da linhagem INVSc-1 (Invitrogen, EUA). A transformação das leveduras foi feita segundo o método do acetato de lítio (The LiAc Method Page – www.umanitoba.ca).

Uma colônia da linhagem INVSc-1 foi inoculada em 5 mL de meio líquido YPAD, a 28°C, com agitação de 300 rpm, por cerca de 18 horas, até atingir um número de células suficientes para 5x10⁶ células/mL num volume final de 50 mL de meio YPAD. Em seguida o meio de cultura foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, a 4 °C, e a massa celular foi transferida para frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de meio YPAD. Novamente, as células foram mantidas a 28°C, 300 rpm, até atingir o equivalente a 2x10⁷ células/mL. O meio foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 25 mL de água Milli Q estéril, e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de LiAc 100 mM, a suspensão transferida para um tubo eppendorf, centrifugada por 15 segundos e o LiAc removido. As células foram novamente ressuspensas em 500 μ L de LiAc 100 mM, homogeneizadas com agitador magnético, e 50 μ L da suspensão transferida para vários tubos eppendorfs. Foi adicionado em cada tubo eppendorf 240 μ L de PEG (polietileno glicol – PM 3350 (Sigma P3640)) 50%, 36 μ L de LiAc 1 M, 50 μ L de DNA de salmão previamente desnaturado a 95°C por 5 minutos, 2 μ g de DNA plasmidial, para um volume final de 360 μ L. Esta mistura foi homogeneizada com agitador magnético e incubada a 30°C por 30 minutos, e posteriormente a 42°C por 30 minutos. Então, foi centrifugada a 6-

8.000 rpm por 15 segundos, e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 1 mL de água Milli Q estéril, e 200 µL foram plaqueados em meio YPD sólido (meio mínimo). As placas foram incubadas por 2-4 dias em estufa a 30°C.

As leveduras transformadas cresceram em meio de cultura na ausência de uracila. Desta maneira houve uma seleção das colônias transformantes devido a presença do gene *URA3* no vetor.

4.2.4 – Seqüenciamento dos genes

O seqüenciamento dos genes LOX-1 e HPL foi feito utilizando o Kit “Thermo Sequenase” (Amersham, EUA), no seqüenciador automático “ABI PRISM 310 Genetic Analyser” (Applied Biosystems, EUA). Para o seqüenciamento partiu-se de DNA plasmidial, e os oligos utilizados foram: oligo-sense, oligo-antisense, oligo-sense-s1 e oligo-antisense-s1, específicos para cada gene.

A análise das seqüências foi feita por alinhamento com as seqüências descritas dos genes LOX-1 de soja (SHIBATA, 1987), e HPL de pimentão (MATSUI *et al.*, 1996), empregando o programa Blast n (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.2.5 – Reação de PCR para detecção dos genes nas colônias de leveduras

Para confirmação da presença dos genes nos plasmídeos recombinantes, uma amostra das colônias de leveduras transformantes foi transferida, com o auxílio de uma ponteira estéril de pipeta automática, para tubos eppendorfs contendo 40 µL de água Milli Q. A reação se procedeu com a adição de 5 µL da mistura de suspensão celular, 2,5 µL de tampão da enzima 10x, 1 µL da mistura dos 4 dNTPs 10mM, 1 µL do oligo-sense 10mM, 1 µL do oligo-antisense 10mM, e 0,5 µL da enzima Taq DNA

Polymerase, para um volume final de 25 μ L. O programa da reação de PCR foi 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos (94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento dos oligos por 30 segundos, 72°C por 2 minutos), 72°C por 7 minutos, terminando com 4°C ∞ . O produto da reação foi separado em gel de agarose, 0,8%, em tampão TAE 1x.

4.2.6 – Indução para expressão de proteínas recombinantes

Para induzir a expressão das proteínas recombinantes (LOX 1 e HPL) , segundo metodologia descrita no manual do plasmídeo pYES 2 (Invitrogen, EUA), a colônia de levedura INVSc-1, contendo as duas construções pYES2-LOX1 e pYES2-HPL, foi inoculada em meio mínimo (SC) contendo 2% de glicose, e incubada “over night”, a 30°C, a 250-300 rpm, por cerca de 15h, até se obter uma OD_{600nm} de 0,4 para um volume total de 50mL. Para a indução da expressão das proteínas recombinantes, pelo promotor GAL1, a galactose é adicionada ao meio. Então, obtida uma concentração de células suficientes, elas foram transferidas para meio mínimo (SC) contendo 2% de galactose, e incubada nas mesmas condições. Nos períodos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, alíquotas de 2 mL de cultura foram removidas e colocadas em tubos eppendorfs, centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto, e o sobrenadante descartado. As células foram mantidas a -70°C até a extração de RNA.

4.2.7 – Extração de RNA total de levedura para *Northern Blot*

Todo material a ser utilizado foi queimado (mantido a 180 °C por 8 horas) ou tratado com água oxigenada 13 volumes por 15 minutos, para que ficassem livres de RNase. As células mantidas a -70° C, foram descongeladas em gelo, e ressuspensas em 400 μ L de solução TES (2 mL de Tris HCl 10 mM, 4 mL de EDTA 10 mM, 10 mL de SDS 0,5% para um volume final de 200 mL, pH 7,5) e homogeneizadas com agitador magnético. Foi adicionado 400 μ L de fenol ácido e

vortexou-se vigorosamente por 10 segundos. Os tubos foram incubados por 1h a 65°C e ocasionalmente agitados manualmente. Após incubação, os tubos foram mantidos em gelo por 5 minutos e centrifugados em seguida a 14.000 rpm, por 5 minutos a 4°C. A fase aquosa (topo) foi transferida para novo tubo eppendorf, e 400 µL de fenol ácido foi adicionado, e então o tubo foi homogeneizado com agitador magnético, novamente centrifugado, e a fase aquosa transferida para novo eppendorf. Foi adicionado 40 µL de acetato de sódio 3 M, pH5,3 e 1 mL de etanol absoluto gelado, homogeneizado com agitador magnético e centrifugado a 14.000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o RNA lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, e novamente centrifugado, nas mesmas condições. O etanol foi descartado, e o RNA secado em centrífuga a vácuo. O RNA foi então ressuscitado com 20 µL de água tratada com 0,1 % de DEPC e autoclavada. Posteriormente, o RNA foi quantificado em gel de agarose/formaldeído/MOPS.

Após a eletroforese, o gel foi fotografado em UV, e então transferido para uma membrana de nitrocelulose, por capilaridade, utilizando-se SSC 10x. Após a transferência a membrana incubada a 80°C por 2h.

4.2.8 – Hibridação com sonda de DNA (*Northern Blot*)

Pré-Hibridação

As membranas foram pré-hibridadas em solução de pré-hibridação (50% formamida deionizada, 5x SSC, 5x Denhardt's, 50 mM de fosfato de sódio pH 6,8, 1% SDS, e 100 µg/ml DNA de esperma de salmão desnaturado), por 4horas a 42°C (se for a primeira pré-hibridação) e 2horas nas outras vezes, com agitação leve, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Foram utilizados cilindros de hibridação, calculando um volume de 10 mL por membrana.

Síntese da sonda

Os DNAs plasmidiais foram clivados com enzimas de restrição e os insertos foram purificados com o kit Concert Rapid Gel Extraction System (GibcoBRL – Life Technologies) e marcadas com dCTP $\alpha^{32}\text{P}$ pelo método de “Random Priming” utilizando-se o kit “Ready-to-go – DNA labelling beads” (APBiotech, Brasil), segundo orientação do fabricante. O DNA foi adicionado a um volume final de 45 μL de água tratada com 0,1 % de DEPC e autoclavada, e então desnaturado a 95°C por 5 min. Foi acrescentado 5 μL de dCTP $\alpha^{32}\text{P}$, e esta mistura transferida para um tubo do kit Ready-to-go. Foi incubado a 37°C por 1 hora, e a sonda purificada pela coluna G-50 (AP-Biotech, EUA). Foi feita a contagem no cintilador. A eficiência da incorporação da sonda purificada deve variar entre 30-50%, comparando-se com a da sonda não-purificada.

Hibridação

As membranas foram hibridadas em solução de (50% formamida deionizada, 5x SSC, 20 mM de fosfato de sódio pH 6,8, 1% SDS, 5% de Sulfato Dextran). Foram utilizados cilindros de hibridação, calculando um volume de 5 mL por membrana. É importante pré-aquecer essa solução antes de adicioná-la às membranas. O tubo eppendorf contendo a sonda purificada e desnaturada (94°C por 3 minutos, gelo por 5 minutos) foi rapidamente centrifugado a cerca de 5.000 rpm por 30 segundos, e então a sonda foi adicionada ao tubo falcon contendo a solução de hibridação pré-aquecida. A solução de pré-hibridação foi descartada e adicionou-se a de hibridação por 16 horas a 42° C, de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

Lavagens e exposição das membranas

Após hibridação, as sondas foram descartadas e as membranas lavadas em condições de alta estringência, de acordo com protocolo de Desprez *et al.* (1998). Foi utilizado ~200mL de solução pré-aquecida. Foram feitas duas lavagens com 2x SSC, 0,1% SDS; uma lavagem com 1x SSC, 0,1% SDS e duas lavagens com 0,1x SSC, 0,1% SDS; todas por 15 minutos a 65°C.

A utilização do aparelho PhosphorImager – FLA3000 (FUJIFILM) permitiu uma maior sensibilidade e confiabilidade na aquisição dos dados, uma vez que a faixa dinâmica do aparelho para detectar a emissão radioativa dos spots é muito maior que a dos filmes de raio-x.

4.2.9 – Indução para produção de compostos voláteis vegetais

Foi utilizado o mesmo protocolo de indução para expressão de proteínas recombinantes (item 4.2.6) (Invitrogen, EUA). O meio de cultura, após períodos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação, foram filtrados com membranas de 44µm, e os sobrenadantes foram recolhidos e acondicionados em frascos de vidro, lacrados com septo de borracha e tampa de alumínio. Estes frascos foram armazenados a -10° C até a análise cromatográfica. Imediatamente antes da análise cromatográfica, cada frasco foi descongelado, até a temperatura ambiente local (18°C).

4.2.10 – Análise dos Compostos Voláteis por “Purge and Trap”

A análise dos compostos voláteis por cromatografia gasosa foi realizada nas mesmas condições cromatográficas já estabelecidas para outras análises no Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP (BRIGIDO, 2000).

Alíquotas de 1995 μL de amostra acrescida de 5 μL do padrão interno (butanol) foram misturados em um frasco de vidro, e 1 mL desta mistura foi transferida para o frasco amostrador de 5 mL com "frit" do sistema de extração "Purge and Trap". As condições do "Purge and Trap" estão estabelecidas conforme a Tabela 3.

Tabela 3 : Condições de Extração dos Voláteis por "Purge and Trap"

Tempo de pré-aquecimento da amostra	3 minutos
Temperatura da amostra	50°C
Tempo de purga	10 minutos
Temperatura do Trap na purga	30°C
Fluxo de gás de purga (Hélio)	30 mL/minuto
Pré-aquecimento de desorção	185°C
Temperatura de desorção	225°C
Tempo de desorção	2 minutos
Fluxo de gás de arraste na desorção (Hélio)	1 mL/minuto
"Bake time"	10 minutos
"Bake temp"	230°C
Temperatura da linha de transferência	200°C

Foi utilizado Cromatógrafo Gasoso, modelo Hewlett Packard 6890 (HP), utilizando coluna HP- Innovax (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), com detector de ionização de chama (FID), e as condições de análise foram:

- Detector mantido a 250°C e o injetor a 200°C;

- Forno mantido a 30°C por 5 minutos e elevado até 100°C numa razão de 15°C por minuto, permanecendo nesta temperatura por 2 minutos, e foi então aquecido até 200°C numa segunda razão de 10°C por minuto e mantido nesta temperatura final por 5 minutos;

- O gás de arraste utilizado foi o Hélio na vazão de 1 mL por minuto.

Os compostos voláteis presentes no meio de cultura foram identificados pela coincidência do tempo de retenção relativo com aqueles de padrões idênticos, e por co-cromatografia. A quantificação dos compostos foi feita contra padrão interno (butanol), monitorando-os relativamente à curva de calibração de padrões autênticos de hexanal.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Clonagem dos genes *LOX-1* e *HPL*

Para a clonagem do gene lipoxigenase-1 (*LOX-1*) de soja foi extraído o RNA total de sementes imaturas de soja (Figura 5). Segundo o trabalho de SHIBATA *et al.* (1987), as sementes imaturas de soja foram utilizadas como fonte de RNA para construção de uma biblioteca de cDNA, da qual foi obtido o clone de *LOX-1*.

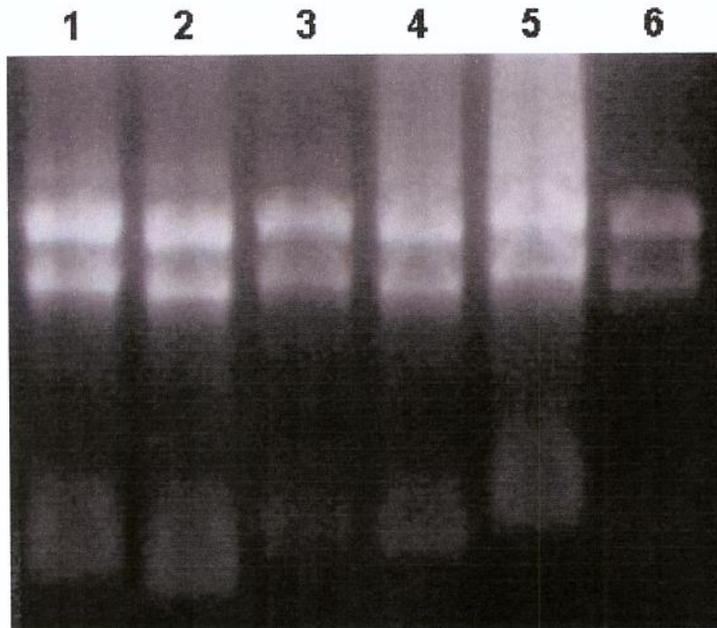


Figura 5: RNA total (2 μ L) de sementes imaturas de soja. 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são diferentes amostras das quais apenas uma foi escolhida para a síntese de cDNA.

A partir do RNA de sementes imaturas de soja foi obtido o cDNA do gene *LOX-1* através da metodologia RT-PCR. Para síntese dos cDNAs foi utilizado um oligonucleotídeo específico para o gene *LOX-1* de soja, e a construção deste oligonucleotídeo foi baseado na seqüência de *LOX-1* publicada por SHIBATA *et al.* (1987). Após a síntese dos cDNAs, foi realizada a reação de amplificação do cDNA

de *LOX-1* por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos, também construídos a partir da seqüência de *LOX-1* (SHIBATA *et al.*, 1987). A Figura 6 mostra que o cDNA de *LOX-1* amplificado pela reação de PCR possui aproximadamente 2,5 Kb, correspondente ao tamanho do gene obtido por SHIBATA *et al.* (1987).

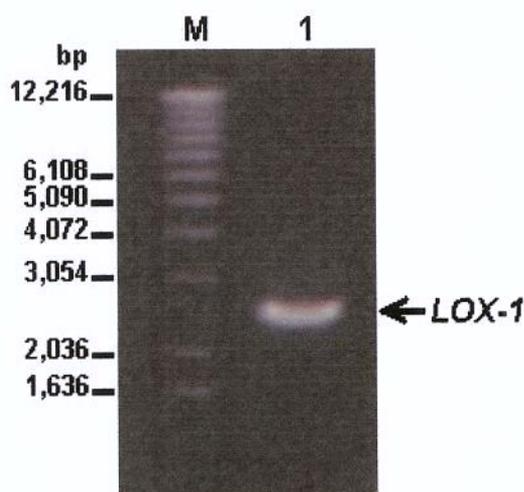


Figura 6: cDNA do gene *LOX-1* de soja obtido pela reação de RT-PCR a partir de RNA total de sementes imaturas de soja. M corresponde ao marcador de peso molecular (Ladder 1 Kb) e 1 a 5 μ L do cDNA, de aproximadamente 2,5 Kb, amplificado pela reação RT-PCR.

Para obter o gene de hidróperóxido liase (*HPL*) de pimentão, o RNA total (Figura 7) foi extraído de frutos verdes de pimentão, mesma fonte utilizada por MATSUI *et al.* (1996).

A partir do RNA total, procedeu-se a reação RT-PCR para a obtenção do cDNA do gene de *HPL*, utilizando-se de oligonucleotídeos construídos a partir da seqüência de *HPL* publicada por MATSUI *et al.* (1996). Na Figura 8 pode-se observar que o tamanho do fragmento de *HPL* obtido foi de aproximadamente 1,5 Kb, correspondendo ao tamanho do gene de *HPL* de pimentão descrito por MATSUI *et al.* (1996).

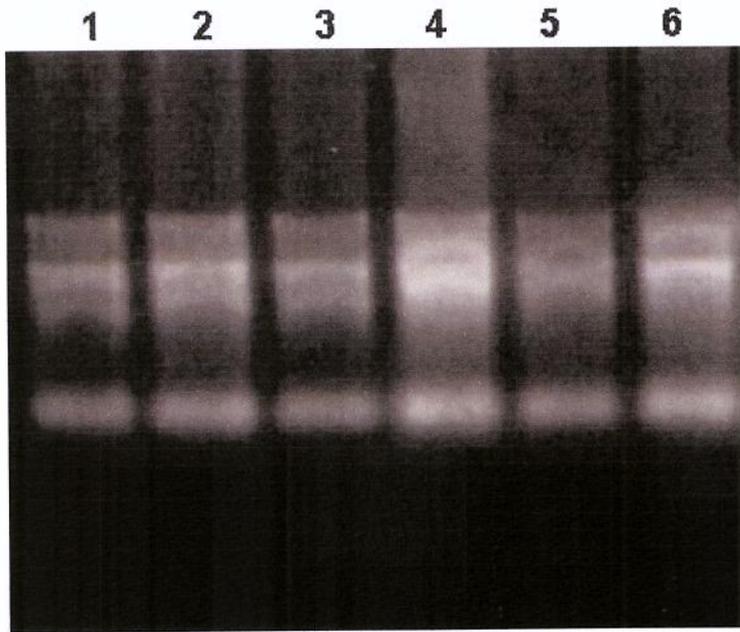


Figura 7: RNA total (2 μ L) de frutos verdes de pimentão. 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são diferentes amostras das quais apenas uma foi escolhida para a síntese de cDNA.

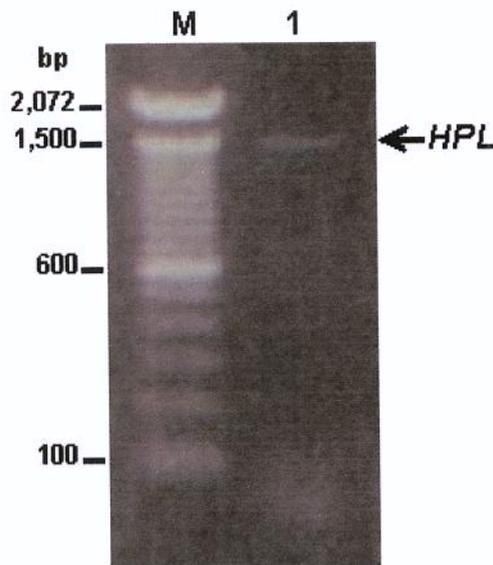


Figura 8: DNA do gene HPL de pimentão obtido por reação de RT-PCR a partir de RNA total de frutos verdes de pimentão. M corresponde ao marcador de peso molecular (Ladder 100 bp) e 1 a 5 μ L do cDNA, de aproximadamente 1,5 Kb, amplificado pela reação RT-PCR.

5.2 – Construção dos vetores de expressão em pYES 2 e clonagem em bactérias DH5 α

Para construir os vetores de expressão pYES2-LOX-1 e pYES2-HPL, foi necessária a clonagem prévia dos cDNAs *LOX-1* e *HPL* no vetor de clonagem pGEM-T Easy, para se obter um grande número de cópias dos cDNAs a serem então clonados no vetor pYES 2.

A clonagem direta dos cDNAs, produzidos por reação de PCR, no vetor pYES 2 foi testada, mas nenhum resultado foi obtido. Por isso, a clonagem prévia no vetor pGEM-T Easy foi realizada. Este vetor de clonagem tem por características principais um gene de resistência a Ampicilina (gene da β -lactamase), que possibilita selecionar as bactérias em meio de crescimento contendo este antibiótico; e uma região de múltiplos sítios de clonagem dentro do gene lac Z. O gene lac Z transcreve a enzima β -galactosidase, a qual pode agir sobre o substrato X-gal, produzindo um “precipitado” azul, possibilitando então distinguir colônias azuis (que não possui nenhum DNA inserido) de colônias brancas (que contém o gene de interesse). Este vetor pode ser clonado em bactérias *E. coli* DH5 α , produzindo um grande número de cópias de DNA plasmidial, que pode ser extraído em quantidades suficientes para digestão com enzimas de restrição e posterior clonagem em outro vetor de expressão.

A ligação dos cDNAs provenientes das reações de PCR no vetor pGEM-T Easy, foi realizada segundo protocolo do fabricante (Promega, USA). Foram feitas duas ligações distintas, uma para o gene *LOX-1* e outra para *HPL*. Posteriormente, bactérias DH5 α foram transformadas por choque térmico, e crescidas em placas em meio LB contendo Ampicilina e X-gal.

As colônias brancas, que possivelmente continham o gene *LOX-1* e o gene *HPL* foram repicadas e crescidas em meio LB líquido, com Ampicilina, para realização da extração do DNA plasmidial, como descrito no item 4.2.3.

Após extração do DNA plasmidial de algumas colônias, os plasmídeos contendo, possivelmente, *LOX-1* e *HPL* foram digeridos com enzimas de restrição específicas. As seqüências destas enzimas de restrição de interesse foram adicionadas as extremidades dos oligonucleotídeos específicos sense e antisense dos dois genes durante a construção destes oligonucleotídeos. Assim foi possível, durante a amplificação por PCR, obter fragmentos de DNA contendo o gene de interesse flanqueado por dois sítios de restrição específicos para duas diferentes enzimas, um sítio em cada extremidade. Este tipo de construção tem a vantagem de permitir a clonagem unidirecional do gene no vetor pYES 2. Os sítios das enzimas utilizados para as construções correspondem a dois sítios de enzimas de restrição presentes no sítio de múltipla clonagem do vetor pYES 2.

O DNA plasmidial contendo *LOX-1* foi digerido com Kpn I e Xho I, como também o DNA plasmidial do pYES 2 foi digerido com as mesmas enzimas. Após digestão os DNAs foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8 %, e os fragmentos correspondentes a *LOX-1* e pYES 2 isolados e purificados. A figura 9A mostra os DNAs de *LOX-1* e pYES 2 após purificação, e observa-se que os tamanhos dos fragmentos de *LOX-1* e pYES 2 correspondem ao esperado, ou seja, aproximadamente 2,5 Kb e 5,5 Kb, respectivamente.

Para o isolamento do gene de *HPL*, procedimentos semelhantes aos do gene *LOX-1* foram utilizados. O DNA plasmidial contendo *HPL* foi digerido com Kpn I e Xba I, contudo observou-se que Xba I não estava sendo uma enzima eficiente para a liberação do fragmento de *HPL* do vetor pGEM-T Easy.

Para contornar este problema o fragmento de *HPL* foi liberado do vetor pela digestão com a enzima Eco RI, e posteriormente digerido com Kpn I para ser então clonado no vetor pYES 2, que também foi digerido com Kpn I e Eco RI. Os fragmentos correspondentes a *HPL* e pYES 2 foram isolados em gel de agarose 0,8%, por eletroforese, e purificados (Figura 9B). Nota-se que foram obtidos fragmentos com tamanhos correspondentes ao esperado, 1,5 Kb para *HPL* e 5,5 Kb para pYES 2.

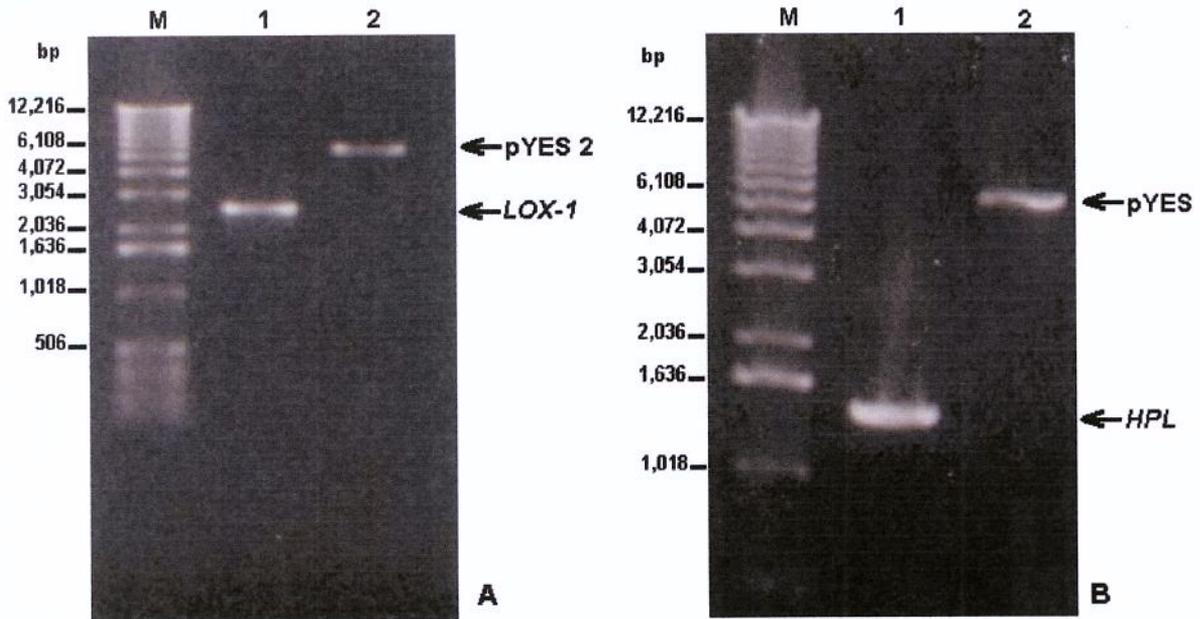


Figura 9: DNAs plasmidiais digeridos com enzimas de restrição. Em A, DNAs isolados e purificados após digestão com as enzimas Kpn I e Xho I, e em B, DNAs isolados e purificados após digestão com EcoRI e Kpn I. M corresponde ao marcador de peso molecular (Ladder 1 Kb); 1A ao DNA de *LOX-1* purificado (5 μ L); 1B ao DNA de *HPL* purificado (5 μ L); 2A e 2B ao DNA de pYES 2 purificado (5 μ L).

Obtidos os DNAs digeridos e purificados, foi feita a construção dos vetores pYES2-*LOX-1* e pYES2-*HPL*, pela ligação destes, como descrito no item 4.2.3. A Figura 10 mostra um esquema das duas construções no vetor pYES 2.

Após ligação vetor-inserto, cada uma das construções foram clonadas em bactérias DH5 α . As colônias resultantes foram repicadas em meio LB líquido, com Ampicilina, para posterior extração do DNA plasmidial.

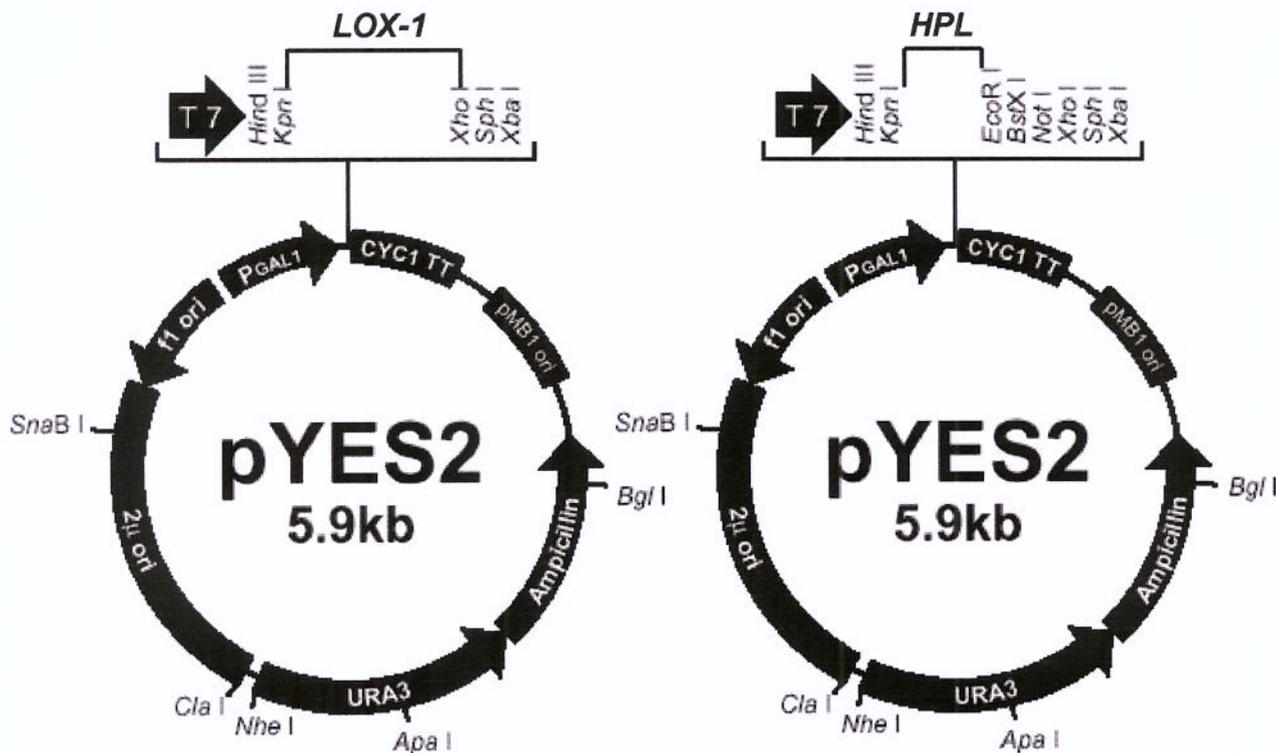


Figura 10: Esquema das duas construções, pYES2-LOX-1 e pYES2-HPL. A Figura 10 ilustra que *LOX-1* está ligado ao vetor pelos sítios de *Kpn I* e *Xho I* e *HPL* pelos sítios *Kpn I* e *Eco RI*. O mapa do vetor pYES 2 está demonstrado em Materiais e Métodos, item 4.1.4.

O DNA plasmidial pYES2-LOX-1 foi digerido com *Kpn I* e *Xho I*, e pYES2-HPL com *Kpn I* e *Eco RI* para confirmação dos clones (Figura 11), onde observa-se que os tamanhos dos fragmentos correspondem ao esperado, aproximadamente 1,5 Kb para *HPL*, 2,5 Kb para *LOX-1* e 5,5 Kb para pYES 2.

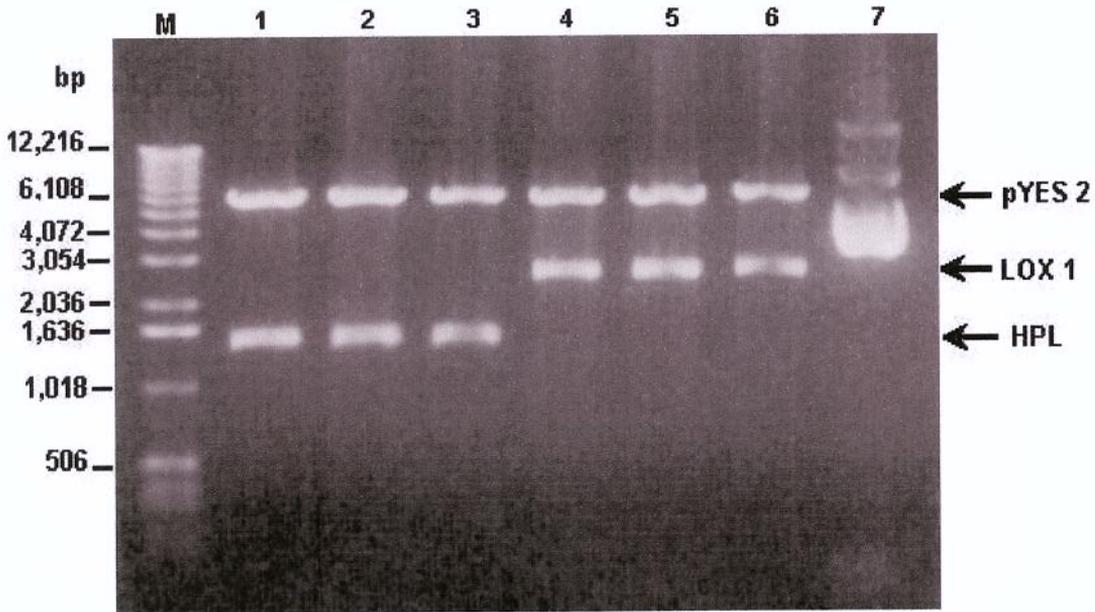


Figura 11: DNAs obtidos após digestão com enzimas de restrição. M: marcador de peso molecular (Ladder 1Kb); 1, 2 e 3: DNAs plasmidiais de três diferentes colônias (pYES2-HPL) digeridos com Kpn I e Eco RI; 4, 5 e 6: DNAs plasmidiais de três diferentes colônias (pYES2-LOX-1) digeridos com Kpn I e Xho I; 7: DNA plasmidial não digerido.

5.3 – Sequenciamento dos genes

Para a confirmação do cDNA *LOX-1*, o sequenciamento parcial (Figura 12) foi realizado e obteve-se 389 bp iniciais do gene e 1493 bp finais. O sequenciamento total do gene está em andamento.

Para confirmar se a seqüência obtida corresponde ao gene *LOX-1*, esta foi submetida a análise pelo programa “Blastn” (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Este programa realiza alinhamentos entre seqüências de nucleotídeos-nucleotídeos, fornecendo alguns dados estatísticos sobre o grau de similaridade encontrada entre as seqüências.

Os alinhamentos são realizados através de uma procura pela base de dados dos programas originais do "BLAST". Os "scores" são pontuações dadas aos alinhamentos entre as seqüências comparadas. Quanto maior forem os "scores", melhor serão os alinhamentos. O primeiro critério de pontuação é um alinhamento sem "gaps", que consiste simplesmente em um par de segmentos de comprimento iguais, um de cada uma das duas seqüências que estão sendo comparadas. O outro critério corresponde às bases que não se diferem entre os alinhamentos. A somatória das pontuações apresentadas a estes critérios determina o "score". Para analisar o quão alto um "score" é provável ser alto por acaso, um modelo de seqüências aleatórias é necessário.

O "E-value" é um valor estatístico dado para a análise dos alinhamentos feitos pelo "Blast". O "E-value" é a probabilidade do alinhamento estar errado, e quanto menor for o "E-value" maior a probabilidade do alinhamento entre as seqüências estar correto.

A análise das seqüências obtidas para *LOX-1* pelo programa "Blastn" está apresentado nas Figuras 12 e 13. A Figura 12 mostra algumas das seqüências que produziram alinhamentos significativos, especialmente as de maiores "scores", e que estas seqüências correspondiam aos genes de lipoxigenase de soja (*Glycine max*). A Figura 12 A apresenta as seqüências que foram alinhadas aos 389 bp iniciais do cDNA de *LOX-1*, e 12 B, aquelas que foram alinhadas aos 1493 bp finais do cDNA de *LOX-1*.

A Figura 13 apresenta o alinhamento entre a seqüência do cDNA de *LOX-1* e a do gene *LOX-1* de soja (*Glycine max*). A primeira seqüência submetida, correspondente aos 389 bp (Figura 13 A) e a segunda, aos 1493 bp finais (Figura 13 B). Os alinhamentos apresentaram 99% e 96% de similaridade, com *LOX-1* de soja, respectivamente, confirmando este ser o gene de lipoxigenase-1 de soja de nosso interesse para a clonagem.

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
gi 18674 emb X67304.1 GMLIPOX1	G.max mRNA for lipoxygenase 1	747	0.0
gi 295117 gb J02795.1 SOYLOX	Soybean lipoxygenase-1 mRNA	747	0.0
gi 505137 dbj D13949.1 SOYL2LA	Glycine max lox2 mRNA for li...	385	e-104
gi 170013 gb J03211.1 SOYLOXB	Soybean lipoxygenase-2 mRNA, ...	385	e-104

A

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
gi 295117 gb J02795.1 SOYLOX	Soybean lipoxygenase-1 mRNA	1626	0.0
gi 18674 emb X67304.1 GMLIPOX1	G.max mRNA for lipoxygenase 1	1610	0.0
gi 170017 gb M16921.1 SOYLOXD	Soybean lipoxygenase-1 mRNA, ...	1126	0.0
gi 170013 gb J03211.1 SOYLOXB	Soybean lipoxygenase-2 mRNA, ...	1035	0.0
gi 505137 dbj D13949.1 SOYL2LA	Glycine max lox2 mRNA for li...	1027	0.0
gi 170015 gb M16876.1 SOYLOXC	Soybean lipoxygenase-1 mRNA, ...	987	0.0

B

Figura 12: Apresentação de algumas das seqüências que produziram alinhamentos significativos com o cDNA de LOX-1. Em A e B, estão apresentadas as seqüências que alinharam com os 389 bp e 1493 bp resultantes do sequenciamento do cDNA de LOX-1, respectivamente.

Seq 1: seqüência do cDNA de LOX-1 submetida	
Seq 2:	gi 18674 emb X67304.1 GMLIPOX1 G.max mRNA for lipoxygenase 1
Score = 747 bits (377), Expect = 0.0	
Identities = 387/389 (99%), Gaps = 1/389 (0%)	
Seq1: 1	ttggtacoccttggcaaaagtatgttttcagcaggccataaatcaaaagggacagtgggtgtt 60
Seq2: 69	ttggtagctttggcaaaag-atgttttcagcaggccataaatcaaaagggacagtgggtgtt 127
Seq1: 61	gatgccaagaatgagttggaagttaaccctgatggctcagcagttgacaacottaatgc 120
Seq1: 128	gatgccaagaatgagttggaagttaaccctgatggctcagcagttgacaacottaatgc 187
Seq2: 121	tttcttgggocgtagtgctccttcagctcattagtgctaccaaggctgatgcacatgg 180
Seq1: 188	tttcttgggocgtagtgctccttcagctcattagtgctaccaaggctgatgcacatgg 247
Seq1: 181	aaaaggaaaagtggaaaggatacgttcttggaggattaataacttcgttaccaacttt 240
Seq2: 248	aaaaggaaaagtggaaaggatacgttcttggaggattaataacttcgttaccaacttt 307
Seq1: 241	gggagcaggagagtctgcattcaatattcattttgaatgggacggaagcatgggaatccc 300
Seq2: 308	gggagcaggagagtctgcattcaatattcattttgaatgggacggaagcatgggaatccc 367
Seq1: 301	cggtgcgttttacataaagaactacatgcaagttgagttcttctcaagagtttgactct 360
Seq2: 368	cggtgcgttttacataaagaactacatgcaagttgagttcttctcaagagtttgactct 427


```

Seq1: 1316 aacaagctcaaggaaattgaggaaaaacttgtgaggaggaacaatgatccgagtctgcag 1375
          |||
Seq2: 2445 aacaagctcaaggaaattgaggaaaaacttgtgaggaggaacaatgatccgagtctgcag 2504

Seq1: 1376 ggcaatcgacttgcccggttcaactgccatacactttgctttatcctagcagtgaggaa 1435
          |||
Seq2: 2505 ggcaatcgacttgcccggttcaactgccatacactttgctttatcctagcagtgaggaa 2564

Seq1: 1436 gggttaacttttaggggaatnaacaaatagcatctctatctaaggagcctgtggttt 1493
          |||
Seq2: 2565 gggttaacttttaggggaatt-ccaaatagcatctctatctaaggagcctgtggttt 2621

```

B

Figura 13: Resultado do alinhamento entre as seqüências do cDNA de *LOX-1* (Seq 1) e do gene *LOX-1* de *Glycine max* (Seq 2). Os números na margem esquerda e direita referem-se ao número de nucleotídeos das seqüências. Em A e B, estão apresentadas os alinhamentos com os 389 bp e 1493 bp do cDNA de *LOX-1*, respectivamente.

O resultado do sequenciamento completo do cDNA de *HPL* foi de 1446 bp. A análise da seqüência obtida para o cDNA de *HPL* pelo programa "Blastn" (www.ncbi.nlm.nih.gov) está apresentado abaixo nas Figuras 14 e 15. Seis seqüências, dentre elas duas de pimentão (*Capsicum annuum*) mostraram uma alta identidade com a seqüência do cDNA de *HPL* que foi submetida ao alinhamento. Apenas uma das seqüências obtidas no "Blastn" foi apresentada devido ao grande espaço que seria demandado para mostrar todo o resultado desta busca. A comparação escolhida para demonstração corresponde a seqüência do cDNA de *HPL* (Seq 1) com a seqüência de *HPL* de *Capsicum annuum* obtida por MATSUI *et al.* (1996) (Seq 2). *HPL* apresentou 97% de similaridade com *HPL* de *Capsicum annuum*, confirmando este ser realmente o gene de hidróperóxido liase de pimentão que buscávamos para a clonagem.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 1272339 gb U51674.1 CAU51674 Capsicum annuum fatty acid ...	2527	0.0
gi 13506710 gb AY028374.1 Capsicum annuum fatty acid hydro...	2462	0.0
gi 14627127 emb AJ310520.1 STU310520 Solanum tuberosum mRNA...	1174	0.0
gi 7677377 gb AF230372.1 AF230372 Lycopersicon esculentum f...	1068	0.0
gi 4850213 emb AJ239065.1 LES239065 Lycopersicon esculentum...	1061	0.0
gi 13506708 gb AY028373.1 Lycopersicon esculentum fatty ac...	1045	0.0

Figura 14: A: Apresentação de algumas das seqüências que produziram alinhamentos significativos com o cDNA de HPL.

Seq 1: seqüência HPL submetida	Comprimento	1446(1 .. 1446)
Seq 2: gi 1272339 gb U51674.1 CAU51674 Capsicum annuum fatty acid hydroperoxide lyase mRNA	Comprimento	1647(1 .. 1647)
Score = 2527 bits (1314), Expect = 0.0 Identities = 1412/1449 (97%), Gaps = 8/1449 (0%)		
Seq 1: 1	aatgatacctataatgagctctgctcctctatcaactgctacaccaatctctccccgt	60
Seq 2: 45	aatgatacctataatgagctctgctcctctatcaactgctacaccaatctctccccgt	104
Seq 1: 61	acgtaaaattccaggagctacgggtttcattattagggccactttgggatcgattana	120
Seq 2: 105	acgtaaaattccaggagctacgggtttcattattagggccactttgggatcgattaga	164
Seq 1: 121	ctataactggttccaaaagctcccagatttcttcagcaagagagtcgaaaagtataacag	180
Seq 2: 165	ctataactggttccaaaagctcccagatttcttcagcaagagagtcgaaaagtataacag	224
Seq 1: 181	cacggtattcagaacgaatgtaccgccttgtttccatttttttggggtgtaaatccaaa	240
Seq 2: 225	cacggtattcagaacgaatgtaccgccttgtttccatttttttggggtgtaaatccaaa	284
Seq 1: 241	tgtagtggcggtactggatgtcaagtcatttgcacatctatttgatagggattgttga	300
Seq 2: 285	tgtagtggcggtactggatgtcaagtcatttgcacatctatttgatagggattgttga	344
Seq 1: 301	gaaagctaagtgtgcttgggtgatttcatgccagtggtgtttatactggatgatgcg	360
Seq 2: 345	gaaagctaagtgtgcttgggtgatttcatgccagtggtgtttatactggatgatgcg	404
Seq 1: 361	ngtttgtgcttatcttgatacttctgaacctaaacataactcagattaaagaacctttcat	420
Seq 2: 405	tgtttgtgcttatcttgatacttctgaacctaaacataactcagatt-aagaacctttcat	463
Seq 1: 421	tggacattcctaanaaagaagttcaaagacatgggtgcctacactagttaaagaacttga	480
Seq 2: 464	tggaca-tcctaa-aaagaagttcaaagacatgggtgcctacactagttaaagaacttga	521
Seq 1: 481	tacactgttcngaacttnttgaatcanatctttcaaaatccanatcancttctctctcc	540
Seq 2: 522	tacactgttcggaactt-ttgaatcagatctttcaaaatccaaatcagcttctctctcc	580
Seq 1: 541	ctgcattgnaaaaattcctcttcaacttcttctccttaacttctcggggcogatccat	600
Seq 2: 581	ctgcattgnaaaaattcctcttcaacttcttctccttaacttctcggggcogatccat	640

Seq 1: 601	cagcctcaccgganatagccaaactctggcttcgcctatcttgatgcatggctagctattc	660
Seq 2: 641	cagcctcaccggagatagccaactctggcttcgcctatcttgatgcatggctagctattc	700
Seq 1: 661	aactancacctactgtagcattgngttcttcaaccoccttgaaaaaatcttcgtccact	720
Seq 2: 701	aactagcacctactgtagcattggttcttcaaccoccttgagaaatcttcgtccact	760
Seq 1: 721	cttttccataccocctatcttcttgnccggggagggttacaaaaaactcattaagttgtga	780
Seq 2: 761	cttttccataccocctatcttcttgtcggagggttacgaaaaaactcattaagttgtga	820
Seq 1: 781	aaagtgaagctaagggaagtgttaacgagggcacaacagactttcagctaactgaataan	840
Seq 2: 821	aaagtgaagctaagggaagtgttaacgagggcacaacagactttcagctaactgaacaag	880
Seq 1: 841	aagcattcataaccttttgttcattcttggattcaatgctttggggggnttcaccatt	900
Seq 2: 881	aagcattcataaccttttgttcattcttggattcaatgcttt-tggtggttcaccatt	939
Seq 1: 901	ttcttgccaacccttctgggaaaccttggaaacnaaaaaatgctganatgcaagag-aa	959
Seq 2: 940	ttcttgccaacccttctgggaaaccttggagacgagaaaaatgctgagatgcaagagaaa	999
Seq 1: 960	ctgagaaaagaatgagggaaaagttgggacaaatcaagaaaatttgag-tttgagagt	1018
Seq 2: 1000	ctgagaaaagaatgagggaaaagttgggacaaatcaagaaaacttgagttttgagagt	1059
Seq 1: 1019	gtaaaagaaatggaactggttcagtcctttgtttatgaatcacttaggctaagcccacca	1078
Seq 2: 1060	gtaaaagaaatggaactggttcagtcctttgtttatgaatcacttaggctaagcccacca	1119
Seq 1: 1079	gtgccaagtcaatatgcaagagcaagaaaagacttcatgctcagttcacatgattcagtt	1138
Seq 2: 1120	gtgccaagtcaatatgcaagagcaagaaaagacttcatgctcagttcacatgattcagtt	1179
Seq 1: 1139	tacgaaatcaagaaagtgaaacttctttgtggttaccagccattagtgatgaaagatcca	1198
Seq 2: 1180	tacgaaatcaagaaagtgaaacttctttgtggttaccagccattagtgatgaaagatcca	1239
Seq 1: 1199	aagggtttgatgaacctgaaaagtttatggttgagaggtttacaaaggagaaagggaaa	1258
Seq 2: 1240	aagggtttgatgaacctgaaaagtttatggttgagaggtttacaaaggagaaagggaaa	1299
Seq 1: 1259	gaattgctgaattatgttttggctaatgggtccacagactgggagacctactgaatca	1318
Seq 2: 1300	gaattgctgaattatgttttggctaatgggtccacagactgggagacctactgaatca	1359
Seq 1: 1319	aacaagcaatgtgctgct-aggatgcggttactcttantgcttctttgattgtggcttac	1377
Seq 2: 1360	aacaagcaatgtgctgctaaaggatgcggttactcttactgcttctttgattgtggcttac	1419
Seq 1: 1378	atcttccaaaagatgattctgtgagttctcatctggttcaactcacatctgtgaaaaaa	1437
Seq 2: 1420	atcttccaaaagatgattctgtgagttctcatctggttcaactcacatctgtgaaaaaa	1479
Seq 1: 1438	gctgctga	1446
Seq 2: 1480	gctgctga	1488

Figura 15: Resultado do alinhamento entre as seqüências do cDNA de *HPL* (Seq 1) e do gene *HPL* de *Capsicum annuum* (Seq 2). Os números na margem esquerda e direita referem-se ao número de nucleotídeos das seqüências.

5.4 – Obtenção dos clones em leveduras INVSc-1

Após a confirmação de que as construções pYES2-LOX1 e pYES2-HPL estavam corretas e que as seqüências dos cDNAs correspondiam realmente aos genes de lipoxigenase 1 de soja e hidroperóxido liase de pimentão, respectivamente, foi feita a transformação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem INVSc-1, como descrito no item 4.2.3.

Após a transformação, as leveduras foram crescidas em meio seletivo, sem uracila, selecionando assim as leveduras transformantes. Contudo, para se saber se as leveduras transformantes continham os dois plasmídeos recombinantes, pYES2-LOX1 e pYES2-HPL, foi realizada uma reação de PCR de colônia (Figura 16), utilizando-se os oligonucleotídeos específicos, sense e anti-sense, para ambos os genes. Tomou-se o cuidado de utilizar dois controles positivos para cada uma das construções, o primeiro controle foi leveduras transformadas com apenas uma das construções, separadamente, e o segundo, utilizar DNA plasmidial como controle da reação de PCR.

Com a reação de PCR realizada com colônias de leveduras (Figura 16) foi possível selecionar as colônias duplo recombinantes que seriam utilizadas para os testes de expressão, posteriormente. Observou-se que as colônias duplos recombinantes tiveram resultado positivo para ambos os genes, algumas com maior quantidade de DNA amplificado (colônias 3, 4) do que outras. Isto pode sugerir que há uma quantidade maior de cópias de DNA plasmidial nestas colônias do que naquelas em que a amplificação do DNA foi menor.

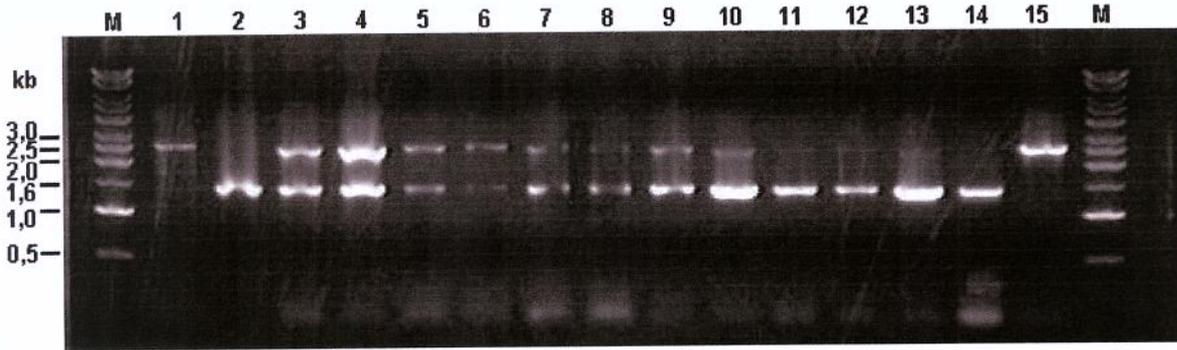


Figura 16: PCR de colônias de leveduras recombinantes. 1, colônia recombinante pYES2-LOX-1 (controle) e 2, colônia recombinante pYES2-HPL (controle); 3 a 13, colônias possivelmente duplo recombinante; 14, DNA plasmidial pYES2-HPL (controle) e 15, DNA plasmidial pYES2-LOX-1 (controle).

5.5 – Verificação do padrão de expressão por *Northern blot*

Para verificar a expressão dos genes LOX-1 e HPL na levedura *S. cerevisiae*, utilizou-se o protocolo descrito no manual do vetor pYES 2 para expressão de proteínas recombinantes (Invitrogen, USA).

No vetor pYES 2, a indução da expressão de genes heterólogos se dá pela ativação do promotor GAL 1, pela adição de galactose ao meio de cultura e remoção de glicose. O promotor GAL 1 é influenciado por um complexo fenômeno regulatório, onde a glicose, via um caminho de transdução reprime a expressão de alguns genes regulados pelo promotor GAL 1, contudo este pode ser induzido por galactose, permitindo a expressão dos genes (OLSSON *et al.*, 2000).

Para então verificar a expressão dos genes *LOX-1* e *HPL*, nas leveduras recombinantes, estas inicialmente foram crescidas em meio com glicose, para se ter um aumento de massa celular, e posteriormente, este meio foi substituído por um outro contendo como fonte de carbono galactose, para ativação do promotor GAL 1 e indução da expressão dos mRNAs. Amostras celulares foram recolhidas em intervalos tempo de 0, 4, 8, 24 e 30h, da levedura controle, transformada com

pYES 2 (pYES) e das leveduras duplo recombinantes, pYES2-LOX-1 + pYES2-HPL (L+H). O RNA total das amostras de leveduras foi extraído para realização do *Northern blot*. Foram utilizadas como sondas cDNAs de LOX-1 e HPL produzidas como descrito no item 4.2.8.

A Figura 17 apresenta três fotos: em A e B o *Northern blot* para as sondas LOX-1 e HPL, respectivamente, e em C o RNA total extraído das colônias de leveduras controle e recombinantes, nos intervalos de tempo de indução já mencionados. As fotos do *Northern blot* mostram que as sondas LOX-1 e HPL hibridaram contra o RNA da colônia duplo recombinante (LOX/HPL) após 4 e 2 horas de indução, respectivamente, demonstrando que ambos os genes estavam sendo expressos. Em intervalos de tempos inferiores a estes, não ocorreu hibridação com ambas as sondas, o que já era esperado, pois não havia tempo suficiente para que o promotor GAL 1 fosse derreprimido por galactose, e por isso, os genes LOX-1 e HPL não estariam sendo expressos. Ocorreram hibridações inespecíficas com ambas as sondas, entretanto não foi possível identificar estas bandas inespecíficas.

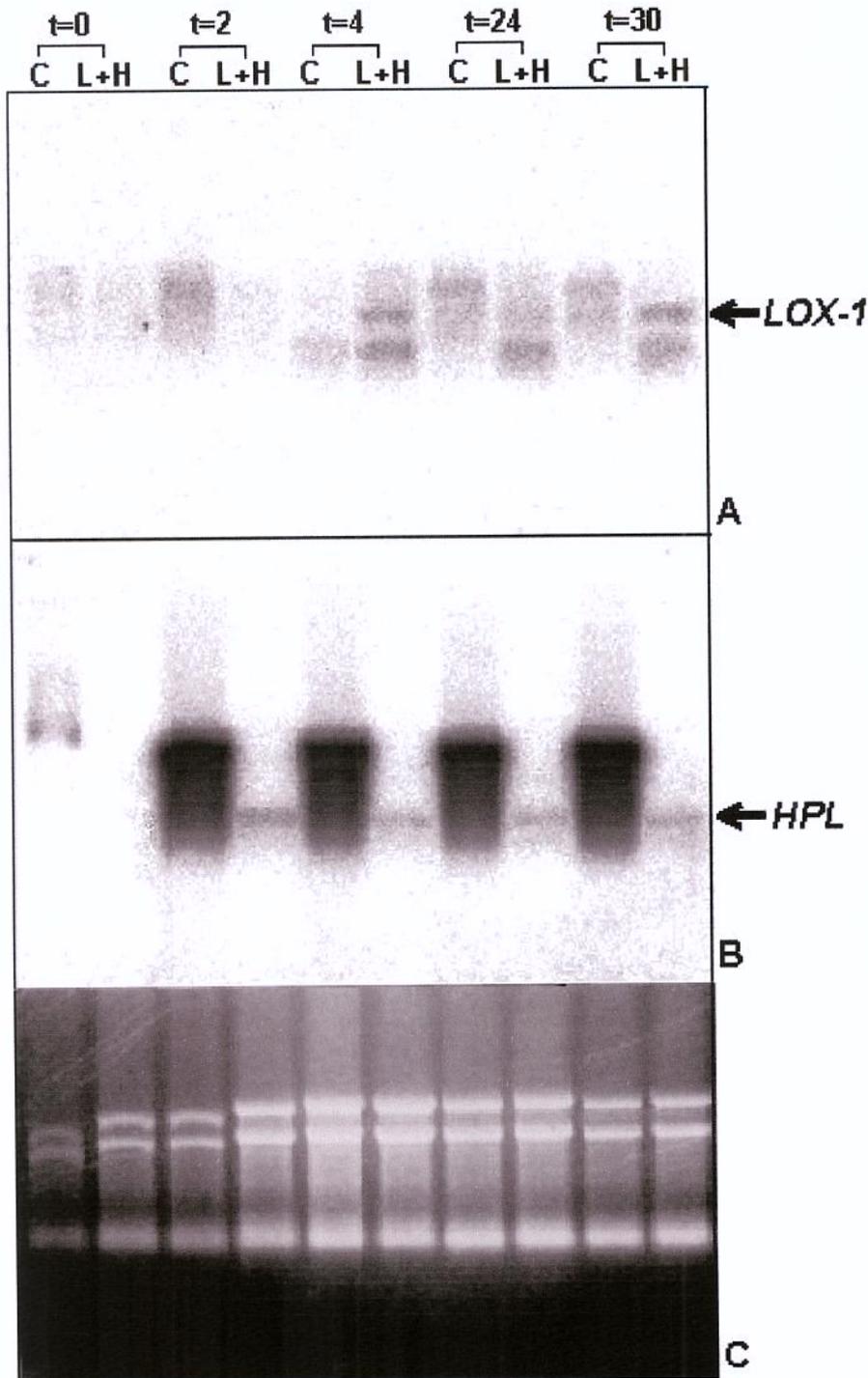


Figura 17: *Northern blot* com as sondas LOX-1 e HPL, e o RNA total extraído das leveduras após indução. As fotos A e B correspondem ao *Northern blot* realizado para as sondas LOX-1 e HPL, respectivamente, e a foto C, ao RNA total extraído das leveduras após 0, 2, 4, 24 e 30h de indução.

5.6 – Verificação da produção hexanal por cromatografia gasosa

Partindo-se da observação de que os dois genes estavam sendo expressos, foi possível iniciar os experimentos para verificar a produção do composto volátil de aroma vegetal, o hexanal. A indução da expressão dos genes *LOX-1* e *HPL* para produção de hexanal foi feita como anteriormente para a análise da expressão de mRNA por *Northern blot*.

Para verificar se as duas enzimas estavam ativas e sintetizando hexanal, amostras do sobrenadante das culturas de uma levedura recombinante (*LOX/HPL*) e uma controle (*pYES 2*) foram recolhidas em triplicatas nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas após indução com galactose, como descrito no item 4.2.9.

Para iniciar as análises cromatográficas, uma curva padrão para diferentes concentrações de hexanal foi construída, utilizando 5 μ L de butanol como padrão interno (Figura 18). As concentrações de hexanal foram calculadas em μ g/mL, e para a construção da curva padrão foram consideradas as áreas dos picos analisados no cromatograma.

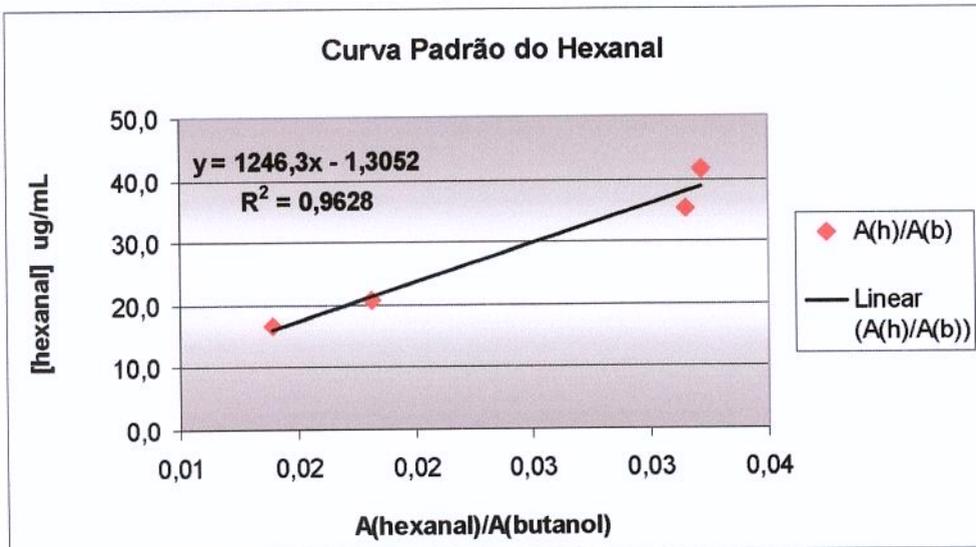


Figura 18: Curva padrão do hexanal. Utilizou-se como padrão interno 5 μ L de butanol. As concentrações do hexanal foram calculadas em μ g/mL.

As análises cromatográficas foram realizadas para todas as amostras, e as concentrações de hexanal produzidas pelas colônias de leveduras foram calculadas em $\mu\text{g/mL}$ a partir da curva padrão estabelecida para o hexanal (Figura 18). Foi realizada também a co-cromatografia das amostras com o padrão hexanal para confirmação das análises. A Figura 19 mostra a produção de hexanal pelas colônias de leveduras estudadas. Pode-se observar nesta figura que não houve grandes variações na produção de hexanal entre as leveduras controle (pYES 2) e duplo recombinante (LOX/HPL), diferentemente do esperado, que seria uma maior produção de hexanal pela levedura recombinante em relação ao controle.

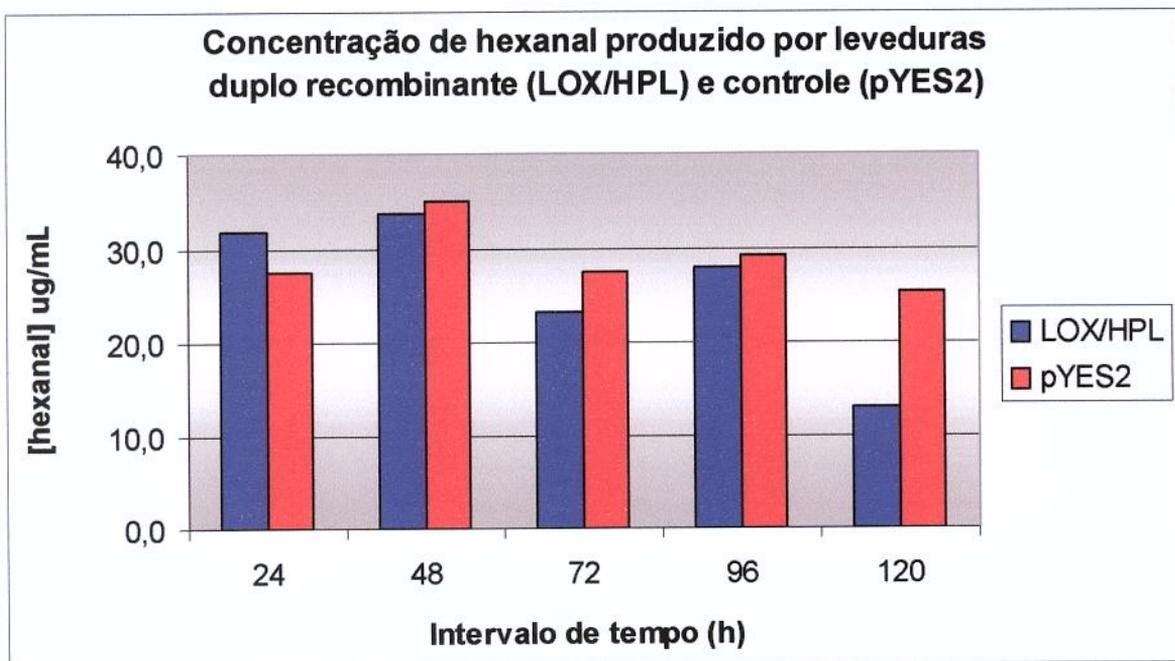


Figura 19: Análise da produção de hexanal por cromatografia gasosa. Amostras recolhidas do meio de cultura de leveduras duplo recombinantes (LOX/HPL) e controle (pYES2) foram recolhidas após 24, 48, 72, 96 e 120 h de indução para análise. A concentração de hexanal ($\mu\text{g/mL}$) foi determinada pela razão entre a área do pico de hexanal e a área do pico do padrão interno (butanol), segundo a curva padrão estabelecida (Figura 18).

Um segundo experimento foi realizado seguindo as mesmas condições para confirmar os resultados encontrados. Desta vez, tomou-se o cuidado de construir uma curva de crescimento (Figura 20) das colônias de leveduras que seriam analisadas, para garantir que todas as leveduras seriam colocadas em meio indutor (ou seja, com galactose) quando estivessem no final da fase log (ou exponencial) de crescimento. Pode-se verificar que o crescimento das colônias de levedura eram similares e que o final da fase log de crescimento ocorreu aproximadamente após 5 horas.

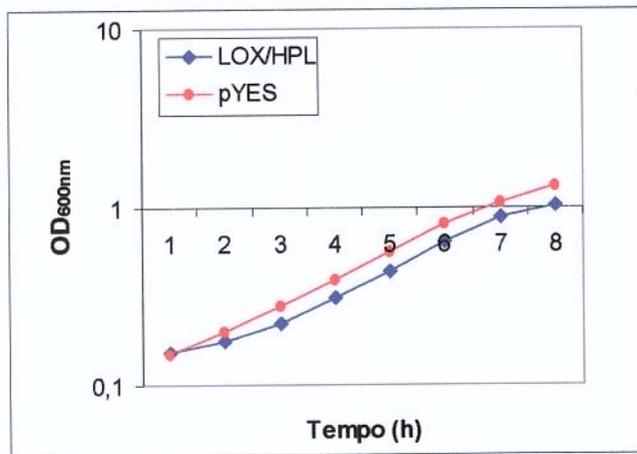


Figura 20: Curva de crescimento de colônias de leveduras duplo recombinante (LOX/HPL) e controle (pYES). A cada 1h foi tomada a leitura da absorbância a 600nm do meio de cultura celular das leveduras, e o gráfico foi construído com os valores de OD obtidos em escala logarítmica.

Após 5 horas de crescimento uma mesma quantidade de massa celular de leveduras foi transferida para 5 frascos Erlenmeyer com 15 mL de meio indutor (com galactose e ácido linoléico) e a cada 24 h eram recolhidas amostras tanto para a análise cromatográfica quanto para *Northern blot* até atingir 120 h. Para a análise cromatográfica foi necessária a construção de uma nova curva padrão (Figura 21) que melhor se adequasse para o cálculo das concentrações de hexanal (Figura 22).

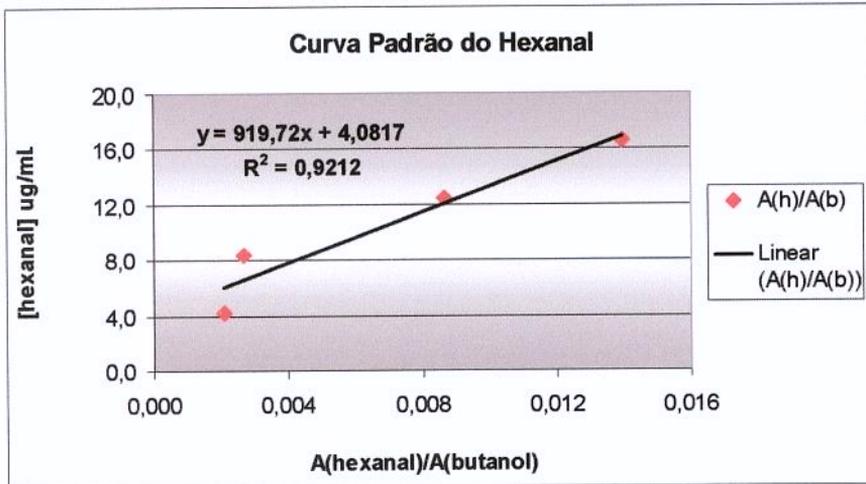


Figura 21: Curva padrão do hexanal. Utilizou-se como padrão interno 5 μ L de butanol. As concentrações do hexanal foram calculadas em μ g/mL.

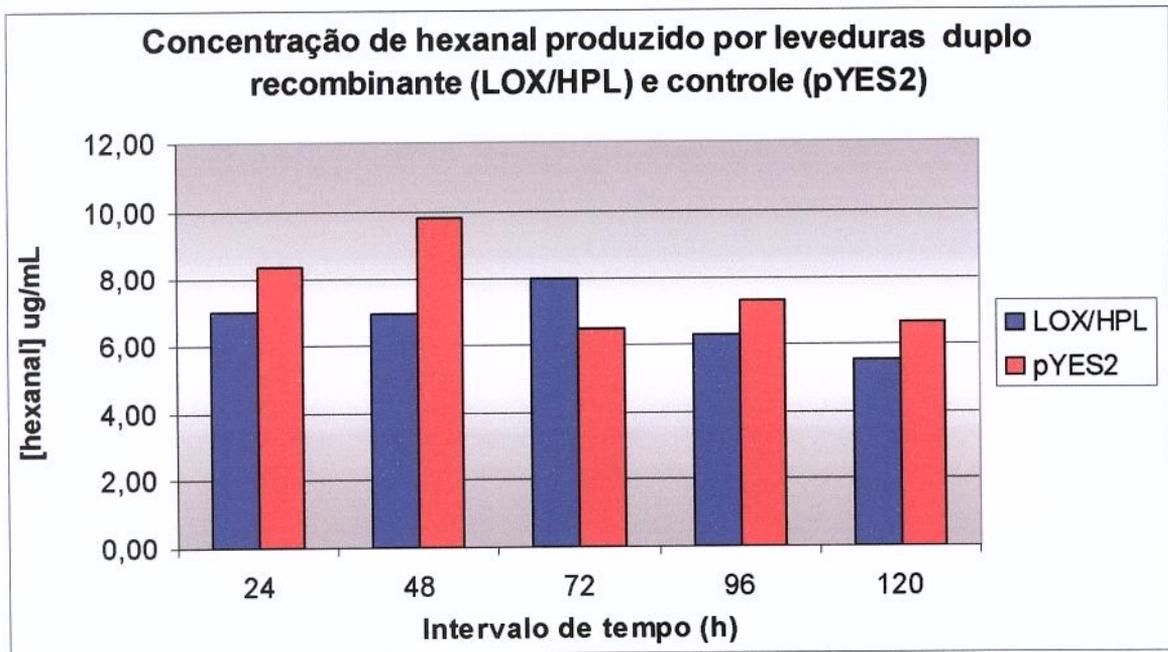


Figura 22: Análise da produção de hexanal por cromatografia gasosa. Amostras recolhidas do meio de cultura de leveduras duplo recombinantes (LOX/HPL) e controle (pYES2) foram recolhidas após 24, 48, 72, 96 e 120 h de indução para análise. A concentração de hexanal (μ g/mL) foi determinada pela razão entre a área do pico de hexanal e a área do pico do padrão interno (butanol), segundo a curva padrão estabelecida (Figura22).

Os resultados deste segundo experimento (Figura 22) confirmaram os resultados encontrados anteriormente. Não ocorreram grandes variações nas quantidades de hexanal produzidas pela levedura recombinante (LOX/HPL) e controle (pYES). Esta observação levantou algumas questões para se tentar avaliar qual seria o motivo da baixa produção de hexanal, entre elas a estabilidade dos vetores recombinantes (pYES2-LOX-1 e pYES2-HPL) nas leveduras transformadas. Será que os vetores recombinantes estariam se mantendo estáveis dentro da levedura, ou durante as divisões celulares estes estariam sendo “eliminados” ?

Os vetores são mantidos na levedura devido a uma pressão de seleção, onde a levedura *ura⁻* somente crescerá em meio seletivo (sem uracila) se ela possuir um vetor *ura⁺*. Além disso, sabe-se que os vetores da classe YEp, como o pYES 2, possuem uma seqüência 2 μ m (LUNDBLAD, 1997) que permite replicação extracromossomal e confere alta freqüência de transformação (cerca de 10⁴ a 10⁵ transformantes/ μ g de DNA), além de conferir a habilidade de propagar relativamente estável através das divisões celulares em grande número de cópias (20 a 50 cópias).

Então, um terceiro experimento foi realizado, seguindo os mesmos princípios que os experimentos anteriores, contudo várias colônias duplo recombinantes foram analisadas após 24 h de indução. Amostras para as análises cromatográficas e *Northern blot* foram recolhidas.

As colônias controles foram: levedura transformada apenas com pYES 2 (pYES2), leveduras transformadas com apenas uma das construções pYES2-LOX-1 (LOX) ou pYES2-HPL (HPL). Um terceiro controle foi inocular em um mesmo meio de cultura uma colônia de levedura transformada com a construção pYES2-LOX-1 com uma outra transformada com a construção pYES2-HPL (e esta mistura foi denominada LOX+HPL). Também foram inoculadas, nas mesmas condições, 10 colônias de leveduras duplo recombinantes.

A Figura 24 mostra as análises cromatográficas realizadas para estas colônias de leveduras. As concentrações de hexanal foram calculadas em $\mu\text{g/mL}$ segundo a curva padrão (Figura 23). Na Figura 24 permite observar que mais uma vez não ocorreu variações muito grandes na produção de hexanal entre as leveduras duplo recombinantes e controles. Apesar da colônia 4 ter produzido $56,56 \mu\text{g/ml}$ de hexanal comparado a produção do controle (pYES2) que foi de $33,97 \mu\text{g/ml}$, não podemos afirmar que esta produção superior de hexanal tenha sido devido aos genes *LOX-1* e *HPL*, pois a análise do *Northern blot* para a colônia 4 (Figura 25) mostra que havia expressão de apenas um dos genes, o *HPL*.

A Tabela 4 e Figura 25 mostram os resultados das análises feitas por *Northern blot* para as duas sondas *LOX-1* e *HPL*, onde verificou-se que apenas um dos genes estava sendo expresso nas leveduras duplo recombinante. Isto nos leva a pensar que o composto de aroma vegetal, hexanal, não estava sendo sintetizado, provavelmente, devido a não expressão de um dos dois genes. Também é possível verificar que quando dois vetores com a mesma marca de seleção são inseridos numa mesma célula, esta condição era pouco estável, e pelo menos um dos vetores pode ter sido “expulso” pela levedura. Vale acrescentar que antes do experimento ser realizado, sempre foi realizada uma reação de PCR de colônia de levedura para que apenas colônias duplo recombinante fossem testadas, e se após algumas horas de experimento não se observou a expressão de um dos genes pelo *Northern blot*, provavelmente isso seja devido a perda de um dos vetores recombinantes pela levedura durante suas divisões celulares.

Observou-se também na Figura 24 que quando duas leveduras recombinantes, uma pYES2-*LOX-1* e outra pYES2-*HPL*, foram inoculadas no mesmo meio de cultura, não ocorreu variação muito grande de produção de hexanal em relação aos controles (pYES2, *LOX* e *HPL*). Neste caso, algumas hipóteses podem ser levantadas: (1) os dois genes foram expressos mas as proteínas não foram traduzidas; ou (2) as duas proteínas foram traduzidas, mas estão sendo degradadas por proteases da própria levedura.

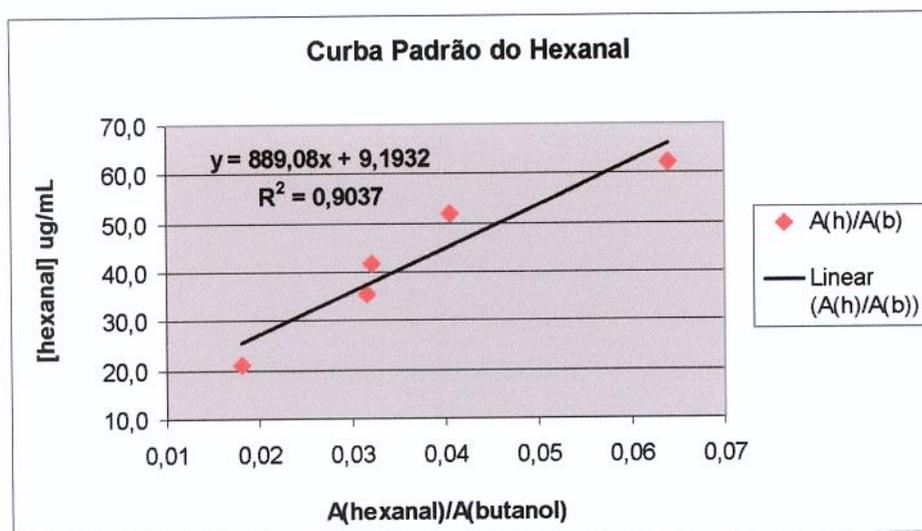


Figura 23: Curva padrão do hexanal. Utilizou-se como padrão interno 5 µL de butanol. As concentrações do hexanal foram calculadas em µg/mL.

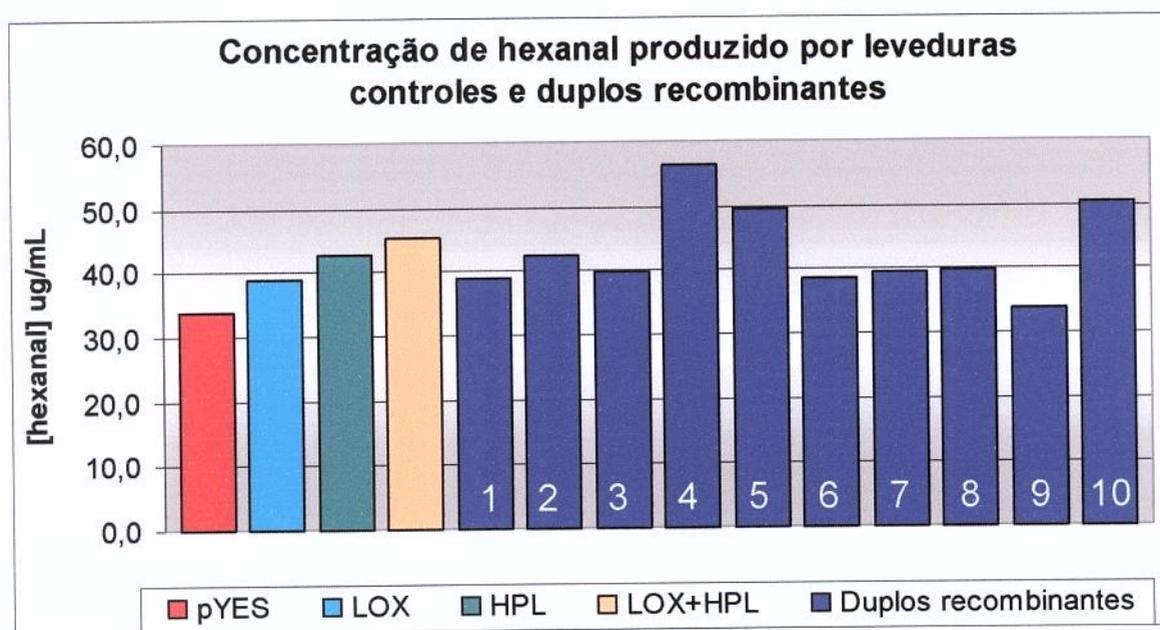


Figura 24: Análise da produção de hexanal por cromatografia gasosa. Amostras recolhidas do meio de cultura de leveduras controles (pYES, LOX e HPL, e LOX+HPL) e duplo recombinantes (1 a 10) foram recolhidas após 24 h de indução. A concentração de hexanal (µg/mL) foi determinada pela razão entre a área do pico de hexanal e a área do pico do padrão interno (butanol), segundo a curva padrão estabelecida (Figura 23).

Tabela 4: Resultado do *Northern blot* para as sondas LOX-1 e HPL (como na Figura 25). O símbolo + representa as amostras nas quais as sondas hibridaram contra o RNA da levedura, e indicam onde os genes *LOX-1* e *HPL* estariam sendo expressos.

	pYES	HPL	LOX	LOX+HPL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sonda LOX-1			+	+		+			+					
Sonda HPL		+		+	+		+	+		+	+	+	+	+

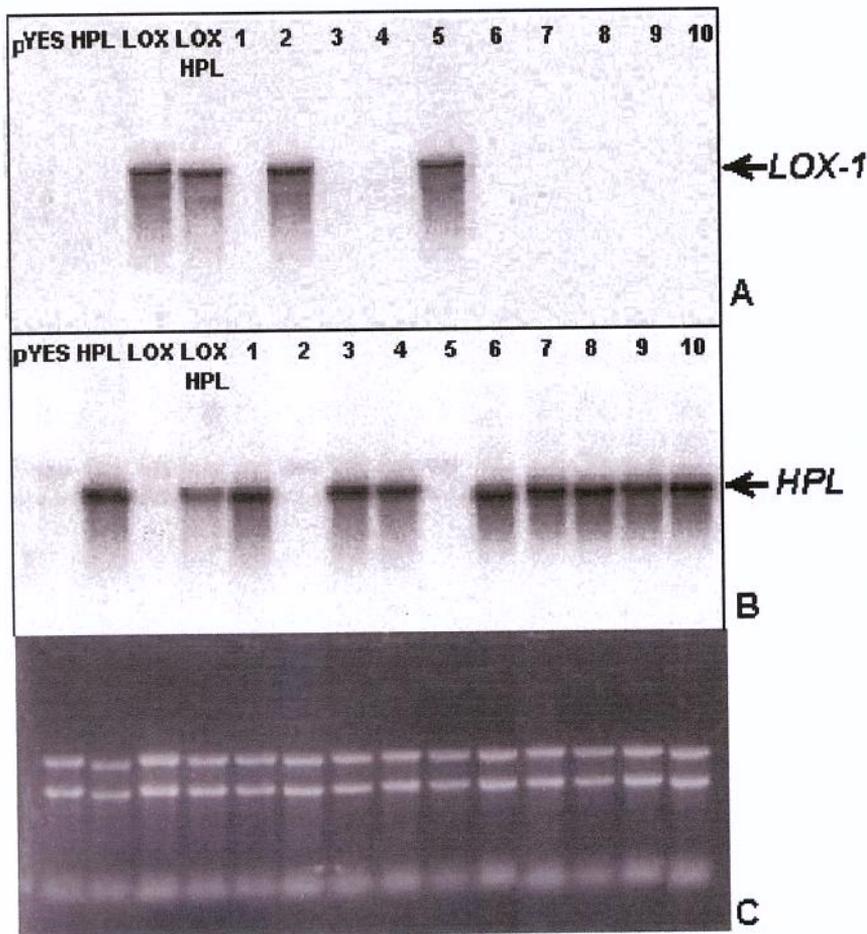


Figura 20: *Northern blot* realizado com as sondas LOX-1 e HPL para as colônias controles pYES2, HPL, LOX, LOX+HPL, e as colônias duplo recombinantes 1 a 10. As setas indicam onde as sondas hibridaram contra os RNAs extraídos das leveduras após 24 h de indução.

6 – CONCLUSÕES

Os dois genes responsáveis pela expressão de lipoxigenase-1 (LOX-1) e hidroperóxido liase (HPL), enzimas envolvidas na síntese de compostos voláteis de aroma vegetal, como o hexanal, foram clonados e os tamanhos dos cDNAs obtidos para ambos os genes corresponderam ao esperado, cerca de 2,5 Kb para *LOX-1* (SHIBATA *et al.*, 1987) e cerca de 1,5 Kb para *HPL* (MATSUI *et al.*, 1996). As análises dos sequenciamentos dos cDNAs de *LOX-1* e *HPL* mostraram uma similaridade de 96-99 % e 97 % entre os genes de *LOX-1* de soja (*Glycine max*) e *HPL* de pimentão (*Capsicum annuum*), respectivamente.

A partir do vetor pYES2, foi possível construir vetores de expressão para ambos os genes, pYES2-LOX-1 e pYES2-HPL, e a confirmação das construções por teste de restrição e sequenciamento mostrou que a expressão dos genes em *Saccharomyces cerevisiae* seria possível.

Um importante fato que indicou uma grande chance de produzir hexanal através da expressão de *LOX-1* e *HPL* em *S. cerevisiae* foi o resultado positivo do *Northern blot*, onde a expressão de ambos os genes foi induzida após quatro e duas horas na presença de galactose, respectivamente. Contudo, as análises cromatográficas não revelaram grandes diferenças de produção de hexanal entre as leveduras duplo recombinantes e controle, exceção a uma das colônias que produziu 56,56 µg/mL de hexanal em comparação a 33,97 µg/mL produzidos pelo controle. Entretanto, esta produção superior de hexanal não pode ser atribuída aos dois genes recombinantes, pois a análise do *Northern blot* revelou que os vetores recombinantes apresentaram baixa estabilidade nas leveduras recombinantes, e apenas um dos genes estavam sendo expressos.

A síntese de hexanal pela levedura duplo recombinante não foi possível, provavelmente, devido a eliminação de um dos vetores de expressão pela levedura, pois para sintetizar este composto de aroma faz-se necessária a expressão dos dois genes, para que as enzimas lipoxigenase-1 e hidroperóxido liase possam transformar ácido linoléico em hexanal.

7 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Para que seja possível sintetizar hexanal pela expressão dos genes LOX-1 e HPL em *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de ácido linoléico, outras estratégias de clonagem poderão ser testadas. Uma estratégia poderá ser utilizar mais um vetor de expressão compatível com pYES2, com um marcador de seleção diferente de URA-3, para que a estabilidade de ambos os vetores dentro da levedura seja maior, e permita a expressão dos dois genes ao mesmo tempo, durante longo período de fermentação.

Outra estratégia seria utilizar vetores de expressão que permitam sintetizar as enzimas lipoxigenases e hidroperóxido liase ligadas a uma pequena cauda de histidina, e purificá-las. Isto possibilitará realizar testes de *Western blot*, onde anticorpos contra a cauda de histidina poderão reagir, mostrando que as duas enzimas estão sendo traduzidas e estão estáveis na levedura.

Será interessante verificar a atividade enzimática de cada uma das enzimas purificadas, utilizando-se lipoxigenase e hidroperóxido liase purificadas comercialmente como controles positivos.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSAF, S.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C.G. 1-Octen-3-ol and 13-hydroperoxylinoleate are products of distinct pathways in the oxidative breakdown of linoleic acid by *Pleurotus pulmonarius*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21, p.484-490, 1997.
- ASSAF, S.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C.G. Biosynthesis of 13-hydroperoxylinoleate, 10-oxo-8-decenoic acid, and 1-octen-3-ol from linoleic acid by a mycelial-pellet homogenate of *Pleurotus pulmonarius*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.43, p.2173-2178, 1995.
- ATHAYDE, A. Ingredientes. Inovações do setor acompanham as tendências de mercado por alimentos saudáveis. **Engenharia de Alimentos**, v.5, n.25, p.14-18, 1999.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; J.G.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. Current Protocols in Molecular Biology, v.1-4. John Wiley & Sons, Inc., USA, 2001.
- BATE, N.J.; SIVASANKAR, S.; MOXON, C.; RILEY, J.M.C.; THOMPSON, J.E.; ROTHSTEIN, S.J. Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. **Plant Physiology**, v.117, p.1393-1400, 1998.
- BERGER, R.G. (1997). Biotechnology of Aroma Compounds, Springer - Verlag Berlin Heidelberg, Berlin - Germany.
- BERRY, H.; DÉBAT, H.; LARRETA-GARDE, V. Excess substrate inhibition of soybean lipoxygenase-1 mainly oxygen-dependent. **FEBS Letters**, v.408, p.324-326, 1997.

- BERRY, H.; DÉBAT, H.; LARRETA-GARDE, V. Oxygen concentration determines regiospecificity in soybean lipoxygenase-1 reaction via a branched kinetic scheme. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.5, p.2769-2776, 1998.
- BISAKOWSHI, B.; KERMASHA, S. Characterization of Purified Lipoxygenase extracts from *Fusarium proliferatum*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.46, p.2382-2388, 1998.
- BRIGIDO, B.M. **Produção de compostos voláteis de aroma por novas linhagens de *Neurospora sp.*** Campinas, 2000. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
- BUCKHOLZ, R.G.; GLEESON, M.A.G. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Biotechnology (N.Y)**, v.9, n.11, p.1067-1072, 1991.
- CASEY, R.; WEST, S.I.; HARDY, D.; ROBINSON, D.S.; WU, Z.; HUGHES, R.K. New frontiers in food enzymology: recombinant lipoxygenases. **Trends in Food & Technology**, v.10, p.297-302, 1999.
- CASS, B.J.; SCHADE, F.; ROBINSON, C.W.; THOMPSON, J.E.; LEGGE, R.L. Production of tomato flavor volatiles from a crude enzyme preparation using a hollow-fiber reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67,n.3, p.372-377, 2000.
- EALING, P.M.; CASEY,R. The cDNA cloning of a Pea (*Pisum sativum*) seed lipoxygenase. Sequence comparisons of two major Pea sed lipoxigenases isoforms. **Biochemistry Journal**, v.264, p.929-932 (1989).
- EALING, P.M.; CASEY,R. The complete amino acids sequence of a Pea (*Pisum sativum*) seed lipoxygenase predicted from a near full-length cDNA. **Biochemistry Journal**, v.253, p.915-918 (1988).
- FEUSSNER, I.; KÜHN, H.; WASTERACK, C. Do specific linoleate 13-lipoxygenases initiate β -oxidation? **FEBS Letters**, v.406, p.1-5, 1997.

- FORNAROLI, S.; PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; VIANELLO, A.; MACRÌ, F. Purification of a plasma membrane-bound lipoxygenase from soybean cotyledons. **Plant Science**, v.145, p.1-10, 1999.
- GARGOURI, M.; LEGOY, M. D. Bienzomatic reaction for hydroperoxide production in a multiphasic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21, p.79-84, 1997.
- GRECHKIN, A. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. **Prog. Lipid Research**, v.37, n.5, p.317-352, 1998.
- GRIFFITHS, A.; PRESTAGE, S.; LINFORTH, R.; ZHANG, J.; TAYLOR, A.; GRIERSON, D. Fruit-specific lipoxygenase suppression in antisense-transgenic tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v.17, p.163-173, 1999.
- HADAR, Y.; DOSORETZ, C.G. Mushroom mycelium as a potential source of food flavour. **Trends in Food Science & Technology**, September, p.214-218, 1991.
- HOBAN, T.J. Consumer Acceptance of Biotechnology in the United States and Japan. **Food Technology**, v.53, n.5, p.50-53, 1999.
- ITOH, A. & VICK, B.A. The purification and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase in sunflower. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1436, p.531-540, 1999.
- JIN, S.; YE, K.; SHIMIZU, K. Metabolic flux distributions in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* during foreign protein production. **Journal of Biotechnology**, v.54, p.161-174, 1997.
- KATO, T.; OHTA, H.; TANAKA, K.; SHIBATA, D. Appearance of New lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. **Plant Physiology**, v.98, p.324-330, 1992.
- KING, D.J.; WALTON, F.; SMITH, B.W.; DUNN, M.; YARRANTON, G.T. Recovery of recombinant proteins from yeast. **Biochemical Society Transactions – IBBG MEETING**, v.16, p.1083-1085, 1988.

- KNUST, B.; VON WETTSTEIN, D. Expression and secretion of pea-seed lipoxygenase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.342-351, 1992.
- LAUDERT, D.; PFANNSCHMIDT, U.; LOTTSPREICH, F.; HOLLÄNDER-CZYTKO, H.; WEILER, E.W. Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. **Plant Molecular Biology**, v.31, p.323-335, 1996.
- LOMASCOLO, A.; STENTELAIRE, C.; ASTHER, M.; LESAGE-MEESSEN, L. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. **Trends in Biotechnology**, v.17, p.282-289, 1999.
- LONEGEMANN J., SHELL J., WILLMITZER L. **Analytical Biochemistry**, v.163, p.16-20, 1987.
- LUNDBLAD, V. *Saccharomyces cerevisiae* – Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 13. John Wiley & Sons, Inc. 1997.
- MATSUI, K.; SHIBUTANI, M.; HASE, T.; KAJIWARA, T. Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide is a cytochrom P450 (CYP74B). **FEBS Letters**, v.394, p.21-24, 1996.
- MUSSINAN, C.J.; HOFFMAN, P.G. Naturalness Decision Tree. **Food Technology**, v.53, n.5, p.54, 1999.
- NOORDERMEER, M.A.; VELDINK, G.A.; VLIEGENTHART, J.F.G. Alfafa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z:2E-enal isomerase. **FEBS Letters**, v.443, p.201-204, 1999.
- OLSSON, L. & NIELSEN, J. The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.785-792, 2000.

- PASTORE, G.M.; PARK, Y.K; MIN, D.B. Production of Fruity Aroma by *Neurospora* from Beiju. **Mycol. Res.** v.98, p.1300-1302, 1994.
- REHBOCK, B.; GANßER, D.; BERGER, R.G. Efficient generation of 2E-hexenal by a hydroperoxide lyase from mung bean seedlings. **Food Chemistry**, v.63, n.2, p.161-165, 1998.
- RICKERT, K.W.; KLINMAN, J.P. Nature of hydrogen transfer in soybean lipoxygenase 1: separation of primary and secondary isotope effects. **Biochemistry**, v.38, p.12218-12228, 1999.
- ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v.26, n.5, p.310-317, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning – A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, San Diego, CA, 1989.
- SHIBATA, D.; STECZKO, J.; DIXON, J.E.; HERMODSON, M.; YAZDANPARAST, R.; AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase-1. **The Journal Biological Chemistry**, v.262, n.21, p.10080-10085, 1987.
- SHIBATA, Y.; MATSUI, K.; KAJIWARA, T.; HATANAKA, A. Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits. **Plant Cell Physiology**, v.36, n.1, p.147-156, 1995.
- SMITH, C. Cookbook for eukaryotic protein expression: yeast, insect, and plant expression systems. **The Scientist**, v.12[22], n.20, p.1-7, 1998.
- SONG, G.Y.; CHUNG, B.H. Overproduction of human parathyroid hormone by fed-batch culture of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking yeast aspartic protease 3. **Process Biochemistry**, v.35, p.503-508, 1999.
- SUURMEIJER, C.N.S.P.; PÉREZ-GIABERT, M.; VAN DER HIJDEN, H.T.W.M.; VELDINK, G.A.; Vliegenthart, J.F.G. Purification, product characterization

- and kinetic properties of soluble tomato lipoxygenase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.36, n.9, p.657-663, 1998.
- SWIFT, K.A.D. Current Topics in Flavours and Fragrances. Towards a New Millennium of Discovery - Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, USA, 1999.
- TERANISHI, R.; WICK, E.L.; HORNSTEIN, I. Flavor Chemistry. Thirty Years of Progress - Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York – USA, 1999.
- TYRREL, M. Advances in Natural Flavour and Materials. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p.13-21, 1995.
- WANG, C.; CROFT, K.P.C., JÄRLFORS, U.; HILDEBRAND, D.F. Subcellular localization studies indicate that lipoxygenases 1 to 6 are not involved in lipid mobilization during soybean germination. **Plant Physiology**, v.120, p.227-235, 1999.
- WHITEHEAD, I.M. Challenges to biocatalysis from flavor chemistry. **Food Technology**, v.52, n.2, p.40-46, 1998.
- WNUK, S.; KINASTOWSKI, S.; KAMINSKI, E. Synthesis and analysis of 1-octen-3-ol, the main flavour component of mushrooms. **Nahrung**, v.27, n.5, p. 479-486, 1983.
- WU, Z.; ROBINSON, S.; DOMONEY, C.; CASEY, R. High-performance liquid chromatographic analysis of the products of linoleic acid oxidation catalyzed by Pea (*Pisum sativum*) seed lipoxygenases. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.43, p.337-342, 1995.
- WURZENBERGER, M. & GROSH, W. Stereochemistry of the cleavage of the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid to 1-octen-3-ol by a hydroperoxide lyase from mushrooms (*Psalliota bispora*). **Biochimica et Biophysica Acta**, v.795, p.163-165, 1984.

YENOFKY, R.L.; FINE, M.; LIU, C. Isolation and characterization of soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-3 gene. **Molecular and General Genetics**, v.211, p.215-222, 1988.