

195

CLONAGEM DO GENE LAC4 EM *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* PARA OTIMIZAR A PRODUTIVIDADE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE. Rosa, D. R.; Rech, R.; Ayub, M.A.Z (UFRGS Departamento de Tecnologia de Alimentos – ICTA).

O trabalho visa desenvolver uma cepa de levedura *Kluyveromyces marxianus* recombinante para aumentar a produtividade enzimática de β -galactosidase através da sub-clonagem dos genes LAC4 e LAC12. Estes genes codificam, respectivamente, as enzimas β -galactosidase e lactose-permease, e estão em um cassete que se encontra no plasmídeo pICLAC4-12, flanqueado pelas enzimas *SmaI* e *SstI*. O cassete que possui 12kb será inserido no sítio *SalI* do plasmídeo pE1 que será testado como vetor de expressão. O plasmídeo pE1 é derivado do plasmídeo circular 1.6 μ m pKD1, isolado de *Kluyveromyces drosophilarum* e é estável em *Kluyveromyces marxianus*. O isolamento do fragmento LAC4-12 foi feito com a clivagem do plasmídeo com as enzimas *SmaI* e *SstI* e o uso de um kit comercial de extração de DNA de gel de agarose. Foi realizado um Klenow-filling e o fragmento está pronto para ser inserido no plasmídeo pE1. No pE1 foi feita a clivagem com *SalI* e também um Klenow-filling. A ligação do fragmento no vetor está sendo feita com o uso da enzima T4 DNAligase, e quando o plasmídeo estiver pronto será amplificado em *E.coli* e depois inserido em *K. marxianus*. Após obtivermos a levedura recombinante serão feitos testes de estabilidade e de produtividade de β -galactosidase, inicialmente em incubadora orbital e após em biorreator. (Apoio Fapergs).