



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2025**

Produção heteróloga de uma endoglucanase de *Moniliophthora perniciosa* em células de *E. coli*

Alice Carmo Oliveira¹; Helio Mitoshi Kamida²; Humberto Fonseca de Freitas³

1. Alice Carmo Oliveira, PROBIC/UEFS, CIENCIAS BIOLOGICAS, e-mail: alicemelg14@gmail.com
2. Helio Mitoshi Kamida, DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, e-mail: hmkamida@uefs.br
3. Humberto Fonseca de Freitas, DEPARTAMENTO DE FÁRMACIA, e-mail: humbarato@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: DNA recombinante; celulase; hidrólise enzimática;

INTRODUÇÃO

A utilização de materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana de açúcar, apresenta-se como uma alternativa estratégica para a produção de biocombustíveis, embora sua composição complexa e a associação entre biopolímeros imponham barreiras ao aproveitamento industrial em larga escala (Delabona *et al.*, 2012). Nesse contexto, os bioprocessos têm se consolidado como área promissora, explorando microrganismos produtores de celulasas para a geração de bioetanol, destacando-se fungos filamentosos como *Moniliophthora perniciosa*, que dispõe de um arcabouço enzimático eficiente na degradação da parede vegetal. Contudo, o isolamento direto do fungo não garante produção significativa de enzimas, exigindo o emprego de técnicas de DNA recombinante para produção heteróloga em *Escherichia coli*, que viabiliza a síntese de enzimas essenciais na conversão da celulose em açúcares fermentescíveis. Nesse cenário, a produção recombinante de uma endoglucanase de *M. perniciosa* em cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Star configura-se como estratégia eficiente para ampliar a produção de bioetanol, contribuindo para superar desafios do setor sucroenergético e consolidando alternativas acessíveis e ambientalmente responsáveis.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Células de *E. coli* BL21 (DE3) Star foram cultivadas em ágar Luria-Bertani (LB-Ágar) suplementado com ampicilina, e uma colônia isolada foi inoculada em meio líquido, mantida sob agitação até atingir OD₆₀₀ de 0,6. A cultura foi resfriada, centrifugada e lavada com soluções de MgCl₂ e CaCl₂, resultando em células competentes que foram

aliquotadas e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O vetor pET-32a-EG45 contendo o gene da endoglucanase GH45 foi introduzido por transformação via choque térmico, e as colônias transformadas foram cultivadas em ágar LB com antibiótico ampicilina $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ (LB seletivo). Para indução da expressão, células recombinantes foram cultivadas em caldo LB e submetidas à adição de IPTG em diferentes concentrações ($0,1\text{--}1\text{ mM}$), temperaturas ($18\text{--}37\text{ }^{\circ}\text{C}$) e tempos de indução ($4\text{--}48\text{ h}$), visando determinar as melhores condições. Após a indução, as células foram lisadas por sonicação e as proteínas analisadas por SDS-PAGE 14%. Nas condições de maior expressão, a proteína foi produzida em maior escala e purificada em coluna HisTrap com gradiente de imidazol ($20\text{--}500\text{ mM}$). As frações obtidas foram avaliadas por SDS-PAGE, e a proteína de interesse foi posteriormente dialisada em tampão Tris-HCl pH 7,0 (20 mM) e concentrada em filtros de ultrafiltração de 10 kDa (Centricon).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Os procedimentos de competência e transformação das células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star com o plasmídeo pET-32a-EG45, desenhado por Santana (2020) foram bem sucedidos estabelecendo uma base sólida para a expressão heteróloga da endoglucanase GH45. Isto significa que o processo de competência, induzido por tratamento com sais de cálcio, mostrou-se eficiente ao permitir a captação e internalização do DNA exógeno, posteriormente confirmado pela transformação bem-sucedida. A presença de colônias resistentes em meio suplementado com ampicilina validou experimentalmente a manutenção do plasmídeo recombinante pelas células hospedeiras.

Em continuidade, nos ensaios de expressão em pequena escala, diferentes condições experimentais foram avaliadas quanto à influência da temperatura, concentração de IPTG e tempo de indução. Em $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, observou-se expressão restrita às frações insolúveis, possivelmente pela formação de corpos de inclusão. Este tipo de formação é indesejável porque resulta da agregação de proteínas mal enoveladas o que exige a solubilização e reenovelamento das proteínas agregadas, reduzindo seu rendimento e bioatividade (Pouresmaeil e Azizi-Dargahlou, 2023). Já em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, ocorreu expressão solúvel em quantidade muito baixa para o desenvolvimento de outras etapas do projeto. Em contrapartida, a temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentou resultados expressivos e consistentes. Nas condições de indução prolongada ($24\text{ e }48\text{ h}$), foi possível observar bandas nítidas de aproximadamente 38 kDa , correspondentes à endoglucanase do

estudo, tanto em frações insolúveis quanto em solúveis, apesar da ocorrência de autoindução no controle negativo (ausente de IPTG) (Figura 1).

Notadamente, a concentração de 0,5 mM de IPTG após 48 h de indução proporcionou maior intensidade de bandas na fração solúvel, indicando maior eficiência na produção da proteína de interesse em sua forma ativa e menos sujeita à agregação. Afinal, a expressão heteróloga de proteínas fúngicas em sistemas bacterianos frequentemente enfrenta limitações relacionadas ao enovelamento adequado e à formação de agregados insolúveis, comumente denominados corpos de inclusão (Francis e Page, 2010). Assim, o resultado torna-se condizente com relatos prévios de que temperaturas reduzidas minimizam a propensão ao enovelamento incorreto e, conseqüentemente, à agregação proteica (Sorensen e Mortensen, 2005).

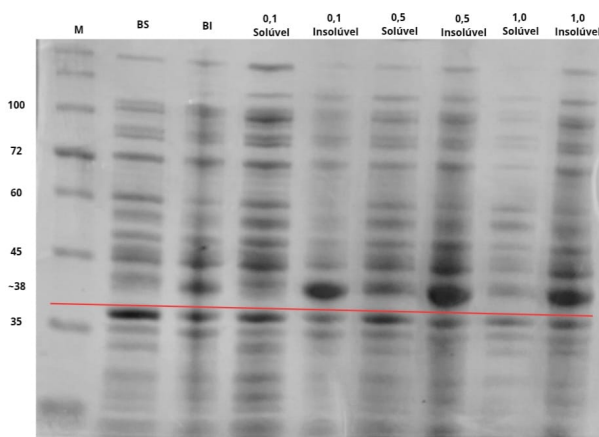


Figura 1: Desempenho da expressão da endoglucanase (~38 kDa) em pequena escala em 18 °C, após 48 horas de indução, com concentrações de IPTG em mM. **M** - Marcador molecular; **BS** - Branco solúvel; **BI** - Branco insolúvel;

Na análise por SDS-PAGE dos resultados de purificação por coluna cromatográfica de níquel, confirmou-se a eluição da endoglucanase em frações correspondentes ao gradiente de imidazol de 100 mM a 200 mM, evidenciando sua afinidade pela matriz. Apesar da recuperação eficiente da proteína alvo, observou-se também a presença de bandas adicionais, indicativas de co-purificação de proteínas bacterianas endógenas, possivelmente ligadas de forma inespecífica aos íons metálicos da resina (Figura 2). Ainda assim, a fração contendo a proteína apresenta-se majoritária e com pureza superior a 70-80%.

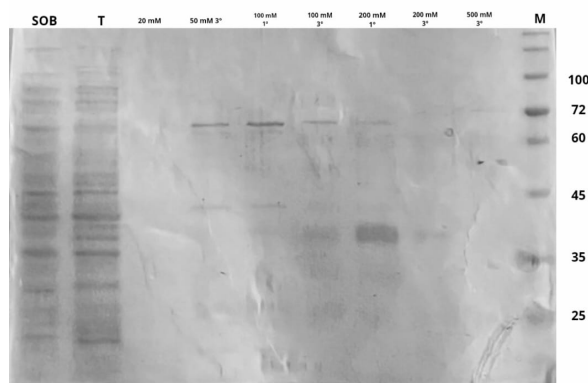


Figura 2: Análise em gel SDS-PAGE 14% das frações obtidas durante o processo de purificação da endoglucanase. **M** - Marcador molecular; **SOB** - Sobrenadante; **T** - Tampão Binding Buffer sem imidazol; **1°** - Primeira coleta; **3°** - Terceira coleta.

A proteína foi concentrada e quantificada a 280 nm, resultando em uma absorbância de 0,380, que corresponde a um rendimento de aproximadamente 3,0 mg/L de cultura, valor modesto que pode refletir perdas no processo de eluição ou co-purificação de impurezas. Ainda assim, o resultado confirma a recuperação da proteína alvo e estabelece uma base sólida para otimizações futuras visando maior eficiência no processo de produção heteróloga da proteína.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Em síntese, os resultados obtidos confirmam a viabilidade da estratégia adotada para a produção recombinante da endoglucanase em *E. coli* BL21 (DE3) Star. A escolha da condição ótima de indução mostrou-se determinante para a obtenção de maior proporção da proteína solúvel, enquanto a purificação demonstrou eficácia na recuperação da enzima, embora sejam necessárias otimizações adicionais para reduzir a presença de contaminantes. Ademais, o rendimento da proteína obtido foi satisfatório, resultado diretamente associado à otimização das condições experimentais, o que evidencia um desempenho positivo considerando-se o desafio inerente à expressão heteróloga de uma enzima de origem fúngica em um organismo bacteriano.

REFERÊNCIAS

- FRANCIS, Dana M.; PAGE, Rebecca. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. Current protocols in protein science, v. 61, n. 1, p. 5.24. 1-5.24. 29, 2010.
- POURESMAEIL, Mahin; AZIZI-DARGAHLU, Shahn timer. Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. Archives of microbiology, v. 205, n. 5, p. 212, 2023.
- SØRENSEN, Hans Peter; MORTENSEN, Kim Kusk. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Journal of biotechnology, v. 115, n. 2, p. 113-128, 2005.