



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 da enzima lignina peroxidase da espécie *Trametes villosa* em células de *E. coli*

Tiago Sandes Galvão¹; Helio Mitoshi Kamida²

1. Tiago Sandes Galvão, PIBITI/CNPq, CIENCIAS BIOLOGICAS, e-mail: tsgalvao15@gmail.com

2. Helio Mitoshi Kamida, DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, e-mail: hmkamida@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: lignase; basidiomiceto; resíduos agroindustriais

INTRODUÇÃO

O Brasil, maior produtor mundial de cana-de-açúcar, gera grandes volumes de bagaço como subproduto, dos quais cerca de 15 milhões de toneladas são excedentes anuais. Esse resíduo, rico em lignina, celulose e hemicelulose, possui grande potencial industrial, mas sua estrutura complexa dificulta o aproveitamento dos açúcares fermentáveis, essenciais para a produção de biocombustíveis como o etanol de segunda geração. Fungos do gênero *Trametes*, especialmente *Trametes villosa*, destacam-se na degradação da lignina por meio de enzimas ligninolíticas como LiPs, MnPs e Lacs. Com o recente sequenciamento do genoma de *T. villosa* e o avanço das tecnologias de DNA recombinante, torna-se possível produzir essas enzimas em larga escala por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, abrindo caminho para processos mais sustentáveis e eficientes na conversão de biomassa lignocelulósica. Este trabalho, portanto, propõe a produção da enzima lignina peroxidase (LiP) de *T. villosa* em *E. coli*, como alternativa biotecnológica promissora para a indústria de bioetanol.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Desenho do gene sintético e primers específicos

Os *primers* para o gene da enzima lignina peroxidase em estudo foram desenhados a partir da sequência parcial nucleotídica já obtida pelo grupo de pesquisa do LAPEM, a partir do genoma de *Trametes villosa*. A partir da sequência, foram definidos os sítios de restrição a serem adicionados no vetor de expressão selecionado para o trabalho pET32a e o gene sintético foi adquirido de forma terceirizada. As

sequências dos primers desenhados foram avaliadas pela ferramenta online OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies®) e verificadas as temperaturas de anelamento (T_m) e formação de estruturas secundárias e sequência codificante do gene sintético foi otimizado para *E. coli*.

Transformação do Clone

O vetor pET32a com o inserto referente a enzima lignina peroxidase foi transformado na cepa BL21 de *E. coli* e cultivado em meio LB-Agar (Luria-Bertani) acrescida de antibiótico Ampicilina.

Teste de indução para expressão das proteínas recombinantes

Uma unidade formadora de colônia foi cultivada em meio líquido LB (Luria-Bertani) sobre agitação acrescida do antibiótico necessário ao vetor. Em seguida os competentes transformados serão induzidos à expressão da proteína recombinante com a adição de IPTG. Foram testadas diferentes concentrações de IPTG (0,05-2 mM), e diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 37 °C) e tempos de indução para selecionar a condição ótima de expressão da proteína. Em seguida as amostras foram visualizadas em gel de SDS-PAGE, segundo descrito por Laemmli (1970).

Teste de solubilidade e expressão

Após a identificação se a proteína é expressa na fração solúvel ou insolúvel pelo gel de SDS-PAGE a mesma foi purificada utilizando uma coluna cromatográfica HisTrap HP em diferentes concentrações de Imidazol (50mM, 150mM, 250mM e 500mM). Para confirmação de qual fração a proteína foi melhor purificada será feita através do gel de SDS-PAGE. Em seguida a proteína será dialisada com Tris a 20 mM e concentrada com Centricon.

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

Após a análise e pureza verificada em SDS-PAGE, pode-se determinar expressão em fração solúvel, com condições otimizadas de expressão solúvel alcançadas com 0,5 mM de IPTG a 18°C por 24 horas, embora uma parte significativa da proteína tenha sido expressa na fração insolúvel. Foi possível alcançar uma expressão de alta intensidade com a fração insolúvel, possibilitando a purificação neste estado (Fig 1). A eluição durante a purificação cromatográfica por afinidade foi efetivamente alcançada com 150 mM de imidazol. Essa purificação, apesar de apresentar impurezas, apresentou uma

expressão visível, podendo ser atestada sua viabilidade (Fig 2). Resultados preliminares indicam a produção heteróloga bem-sucedida de pelo menos uma construção da enzima lignina peroxidase (LiP) de *Trametes villosa* em células de *E. coli*. Essa abordagem promissora visa a futura disponibilização da enzima para aplicações no processamento de resíduos agroindustriais.



Figura 1: Expressão da proteína em SDS-PAGE. Alternadas em diferentes concentrações em estado solúvel (S) e insolúvel (I), organizada pela concentração de IPTG das amostras, em ordem crescente: 0 (controle); 0,1; 0,5; e 1,0.

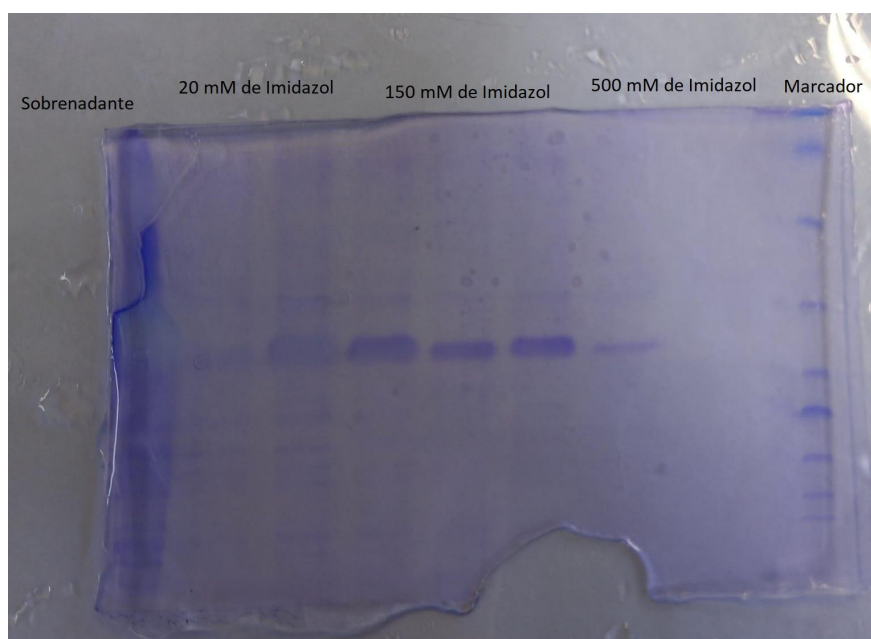


Figura 2: Purificação da proteína expresso em SDS-PAGE, organizadas em diferentes concentrações de imidazol.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Foi possível mostrar durante o projeto que a produção heteróloga da enzima lignina peroxidase (LiP) de *Trametes villosa* em *Escherichia coli* mostrou-se viável em sua expressão na fração insolúvel. As condições otimizadas de indução (0,5 mM de IPTG a 18 °C por 24 horas) e a purificação eficiente por cromatografia de afinidade demonstram o potencial dessa estratégia biotecnológica. Esses resultados preliminares reforçam a possibilidade de utilização da LiP recombinante no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, contribuindo para processos sustentáveis e para o avanço da produção de etanol de segunda geração e outros bioprodutos de interesse industrial.

REFERÊNCIAS

- BIOTECHBRASIL. Tecnologia de ponta pode impulsionar a produção de álcool no Brasil. 2006. Disponível em: <<http://www.biotec-ahg.com.br/index.php/acervo-de-materias/biocombustiveis/231-tecnologia-de-ponta-pode-impulsionar-a-producao-de-alcool-no-brasil>>. Acesso em: 27 out. 2013.
- CONESA A., PUNT P.J., VAN DEN HONDEL C.A. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*. v. 93, p. 143-158, 2002.
- EMBRAPA: Árvore do conhecimento – Cana de açúcar. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html>>. Acesso em: 23 julho. 2024.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C., GREEN, P. Base-calling of automated sequences traces using phred. I. Accuracy assessment, *Genome Res*. v. 8, p. 175–185, 1998.
- FROHMAN et al., 1988 GOUVEIA S, FERNÁNDEZ-COSTAS C, SANROMÁN M.A., MOLDES D. Polymerisation of Kraft lignin from black liquors by laccase from *Myceliophthora thermophila*: Effect of operational conditions and black liquor. *Bioresource Technology*. v. 131, p. 288-294. 2013.
- GUILLÉN F., MUÑOZ C., GÓMEZ-TORIBIO V., MARTÍNEZ A.T., MARTÍNEZ M.J. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 66, p. 170-175, 2000.
- HOFRICHTER M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. v.30, p. 454-466. 2002.
- JANUSZ G, KUCHARZYK K.H., PAWLIK A, STASZCZAK M, PASZCZYNSKI A.J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation Review Article. *Enzyme and Microbial Technology*. v.52, p. 1-12, 2013.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, v. 169, p. 247-250, 1984.
- LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage t4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- SAMBROOK, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2222 p., 2002.

SIGOILLOT J.C., BERRIN J.G, BEY M., LESAGE-MEESSEN L., LEVASSEUR A., LOMASCOLO A., RECORD E., UZAN-BOUKHRIS E. Chapter 8 - Fungal Strategies for Lignin Degradation. *Advances in Botanical Research*. v. 61, p. 263-308. 2012.

TEIXEIRA, A. F.; PIRES, A. V.; NASCIMENTO, P. V. N. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. *Revista Eletrônica de Veterinária*. v.8, p.1695-7504, 2007.