



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

XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024**

PRODUÇÃO HETÉROLOGA DA ENZIMA LACASE DA ESPÉCIE *Ganoderma boninense* EM CÉLULAS DE *E. coli*

Rafaela dos Anjos Rocha¹; Raquel Guimarães Benevides² Edjane Bastos Ferreira³

1. Bolsista – Modalidade Bolsa/PVIC, Graduando em Lic. Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: anjos2670@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelgb@gmail.com

3. Participante do projeto, Departamento de Ciências biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: edjanebferreira@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Fungo; Lignases; DNA.

INTRODUÇÃO

A lignina, uma macromolécula complexa presente na parede celular das plantas vasculares, confere resistência e impermeabilidade, dificultando a degradação rápida e o acesso a carboidratos úteis para a produção de biocombustíveis. A degradação eficiente da lignina é crucial para a produção sustentável de bioetanol, especialmente a partir de bagaço de cana-de-açúcar (Shimizu, 2018).

O fungo *Ganoderma boninense* produz enzimas ligninolíticas, como as lacases, que são eficazes na degradação da lignina. Essas enzimas têm alto potencial industrial devido à sua resistência a variações de temperatura e pH, tornando-as ideais para a produção de biocombustíveis e outros processos biotecnológicos (Binod et al., 2011). A produção heteróloga de lacase em *Escherichia coli* através de técnicas de DNA recombinante permite a produção em larga escala da enzima, oferecendo uma alternativa sustentável e eficiente para a produção de bioetanol e outras aplicações industriais (Keasling, 2012; Fakruddin et al., 2013). O objetivo deste trabalho é produzir a lacase de *Ganoderma boninense* de forma heteróloga usando células de *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

O estudo envolveu a construção de um gene sintético para a lacase do fungo *Ganoderma boninense*, utilizando sequências de nucleotídeos extraídas de um artigo científico e ferramentas como OligoAnalyzer 3.1 e SignalP 4.1 para desenhar primers e identificar o peptídeo sinal. O gene foi clonado no vetor pET32 com sítios de restrição Nco I e Hind III e inserido nas células competentes BL21 e BL21 star. A transformação foi realizada em meio Luria-Bertani (LB) com ampicilina, e a expressão proteica foi induzida com diferentes concentrações de IPTG e temperaturas, sendo analisada por SDS-PAGE para verificar a presença e solubilidade da lacase.

Para aprimorar a expressão da lacase, o meio LB foi modificado, substituindo triptona por peptona, e novos experimentos de indução foram realizados nas temperaturas de 37°C e 25°C que posteriormente foram novamente analisadas por SDS-PAGE. Essas alterações permitiram uma melhor análise da expressão proteica, revelando uma expressão mais clara da lacase e fornecendo dados valiosos sobre a produção da enzima nas diferentes cepas e condições de cultivo.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

As transformações foram positivas tanto para a cepa BL21 quanto para BL21star.

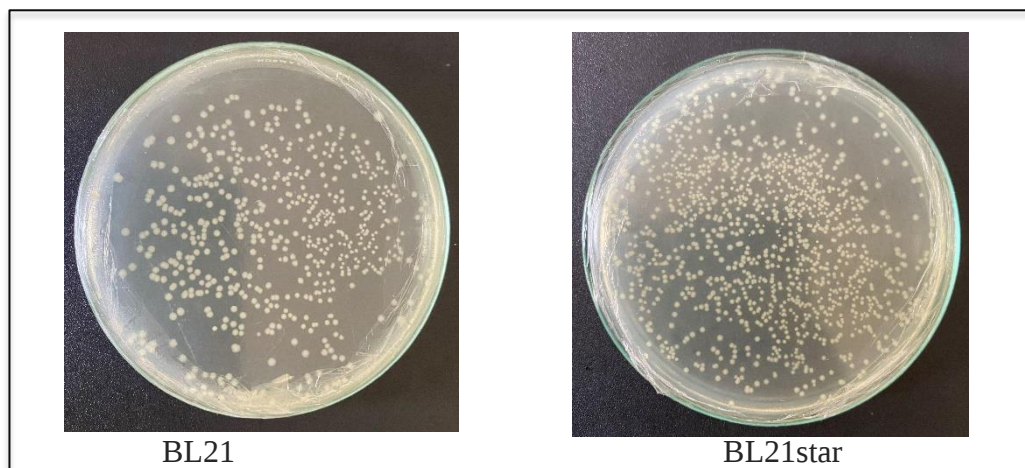


figura 1. Transformação das cepas BL21 e BL21star com o vetor pET32a.

Em todas as condições submetidas de temperatura (37°C; 25°C e 48°C) e concentração de IPTG (0,1mM; 0,5mM e 1,0mM), a proteína da lacase foi expressa tanto na cepa da BL21 quanto na BL21 star apenas na fração insolúvel. No entanto, a condição que obteve uma maior expressão da proteína lacase, foi a temperatura de 25°C, em concentração 1,0 de IPTG apenas na fração insolúvel da cepa BL21 star.

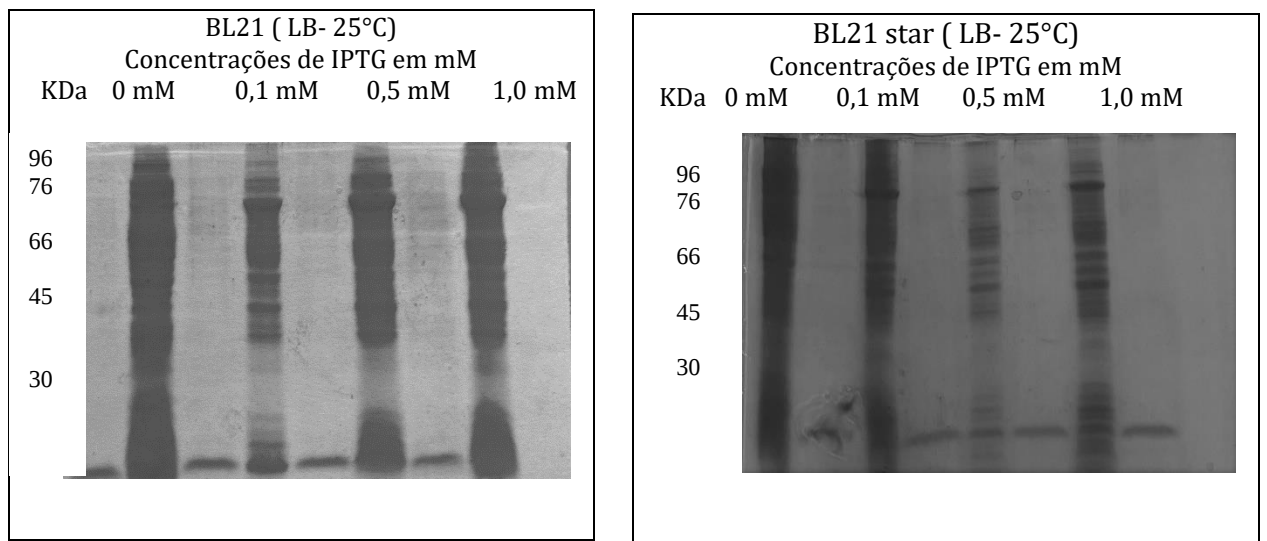


figura 3. Expressão da lacase na cepa BL21 e BL21star (LB-25°C)- Concentrações de IPTG em mM.

No segundo teste de expressão da lacase, o meio LB foi alterado substituindo a triptona por peptona, após resultados insatisfatórios nos primeiros géis onde a expressão da enzima não era suficientemente visível. A peptona, derivada de proteínas animais ou vegetais, oferece uma diversidade nutricional maior, o que favorece um crescimento microbiano mais robusto e eficiente para a produção de proteínas recombinantes, como a lacase (Walkil et al., 2017).

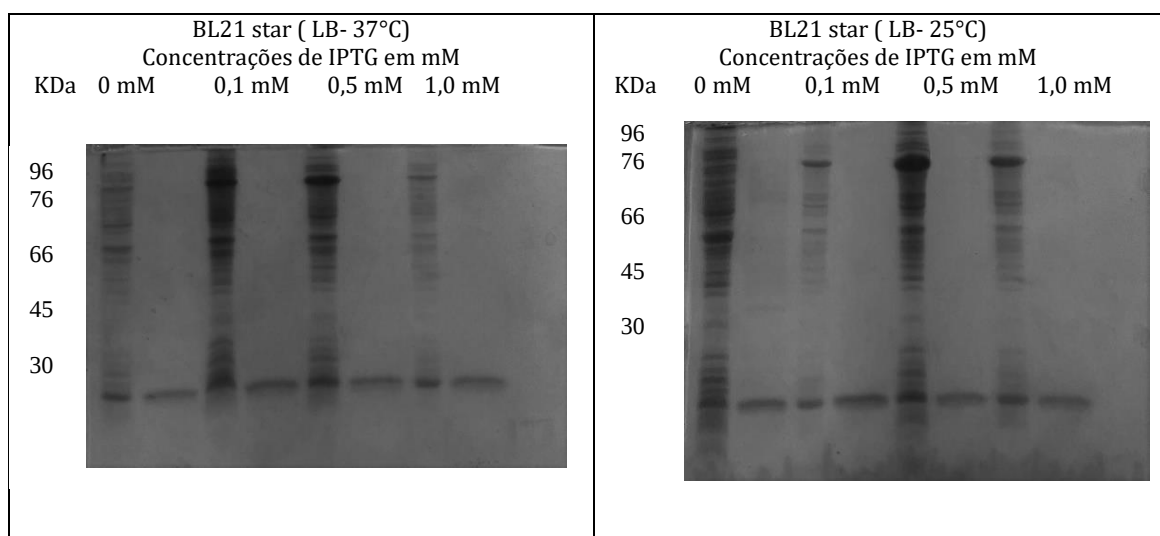


figura 3. Expressão da lacase na cepa BL21star (LB-37°C e 25°C)- Concentrações de IPTG em mM.

A substituição de triptona por peptona melhorou significativamente os resultados, com os géis mostrando uma expressão mais clara da lacase nas cepas BL21 e BL21 star

a 37°C e a 25°C. A expressão da enzima foi mais notável na fração insolúvel e foi particularmente eficaz na cepa BL21 star a 25°C, indicando que essa combinação de cepa e temperatura pode otimizar a produção da lacase (Figura 3).

Após identificar que a melhor condição de expressão da enzima lacase foi na cepa BL21 star sob temperatura de 25°C na contração 0,5mM de IPTG, a próxima etapa será a produção em grande escala da mesma para que seja purificada utilizando uma coluna cromatográfica HisTrap HP em diferentes concentrações de Imidazol (50mM, 75mM, 150mM, 250mM e 500mM) e para a confirmação de qual fração a proteína foi melhor purificada será feita através do gel de SDS-PAGE e em seguida será avaliada a atividade enzimática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Este trabalho confirmou a expressão da enzima lacase de *Ganoderma boninense* em *E. coli*, com melhorias significativas após a substituição da triptona por peptona no meio LB. Apesar disso, a enzima foi encontrada predominantemente na fração insolúvel, indicando a necessidade de otimizar as condições de expressão para melhorar sua solubilidade. A cepa BL21 star a 25°C mostrou-se particularmente eficaz, e as próximas etapas devem focar na purificação da lacase e na realização de testes enzimáticos para avaliar e otimizar sua funcionalidade.

REFERÊNCIAS

- BINOD, P., et al. Chapter 10 - Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 229- 250, 2011.
- FAKRUDDIN, Md et al. Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant *E. coli*. **ISRN Biotechnology**, p. 1-7, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4403561/pdf/ISRN.BIOTECHNOLOGY2013-590587.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2019.
- SHIMIZU, Felipe I. REMOÇÃO DE LIGNINA E HEMICELULOSE: INFLUÊNCIA NA ACESSIBILIDADE À CELULOSE E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA. Prof. dr. Michel Brienzo. p. 1-76. Dissertação de mestrado- Pós-graduação em Microbiologia Aplicada, Instituto de Bociências, Rio Claro, 2018.
- KEASLING, Jay D. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 14, p. 189–195, 2012. Disponível em: <<https://sci-hub.tw/10.1016/j.ymben.2012.01.004>>. Acesso em: 13 mar. 2019.
- WAKIL, SM et al. Produção, Caracterização e Purificação de Lacase por Leveduras Isoladas de Solo Ligninolítico. **Journal of Pure & Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, 2017.