

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Testes de condições de cultivo para a superexpressão de β -galactosidase recombinante em diferentes cepas de *Escherichia coli*

Bruna Coelho de Andrade^{2,4}, Rafaela Rubim², Vanessa Yuki Grafulin^{2,5}, Cláucia Fernanda Volken de Souza³, Diógenes Santiago Santos⁴, Jocelei Maria Chies², Gaby Renard², Giandra Volpato¹

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul- Campus Porto Alegre
90030-041 Porto Alegre- RS

²Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda
90619-900 Porto Alegre-RS

³Centro Universitário UNIVATES
95900-000 Lajeado-RS

⁴Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
90619-900 Porto Alegre-RS

⁵Universidade Federal do Rio Grande do Sul
90050-170 Porto Alegre- RS

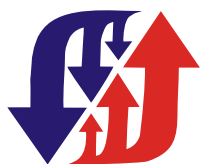
RESUMO

*A enzima β -galactosidase tem importância para indústria de alimentos e farmacêutica, por hidrolisar a lactose em glicose e galactose. A obtenção dessa enzima de forma recombinante permite a obtenção de maiores quantidades de β -galactosidase com custo menos elevado. O objetivo deste trabalho foi testar condições de cultivo para a superexpressão de β -galactosidase recombinante em cepas de *Escherichia coli*. Foram testadas a expressão e atividade da enzima em cinco cepas de *E. coli* (BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Rosetta gami 2 (DE3), C41 (DE3) e C43 (DE3)), três meios de cultura (LB, TB e M9), duas temperaturas de cultivo (30°C e 37°C) e diferentes concentrações do indutor isopropiltiogalactosídeo (IPTG) (0,05 mM e 1 mM). A maior atividade específica da β -galactosidase na forma solúvel foi aproximadamente 250 U/mg_{proteína} pela cepa recombinante BL21 (DE3), com 9h de cultivo a 30°C, utilizando o meio LB e indução com 0,05 mM de IPTG.*

Palavras-chave: lactase, fermentação, bactéria, isopropiltiogalactosídeo.

INTRODUÇÃO

A β -galactosidase ou lactase são enzimas importantes, utilizadas no processamento de alimentos. Sua aplicação tem sido a hidrólise da lactose do leite ou derivados lácteos (Pereira-Rodríguez *et al.*, 2012). Esta enzima também tem sido utilizada como suplemento alimentar por indivíduos intolerantes à lactose (Belem e Lee, 1998). A intolerância à lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal e ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) de atividade da enzima β -galactosidase no aparelho digestivo. O número de indivíduos diagnosticados com esta intolerância tem aumentado mundialmente, fazendo com



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

que o mercado disponibilize cada vez mais produtos para este público específico, consequentemente aumentando o uso desta enzima (Panesar *et al.*, 2006).

O uso industrial de enzimas, ainda apresenta um aumento de custo significativo no processo, que se reflete no valor do produto final. Algumas alternativas para diminuir o custo de aplicação industrial de enzimas, envolvem o aumento da atividade enzimática, que pode ser obtido através da produção da enzima recombinante (Ansari e Satar, 2012). Com isso, o objetivo deste trabalho foi testar condições de cultivo para a superexpressão de β -galactosidase recombinante em cepas de *Escherichia coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO, AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE INTERESSE E CLONAGEM

A cepa de *Kluyveromyces* sp., foi mantida em ágar YEPD (20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedura, 16 g/L de ágar), à 4°C. Para a extração do DNA genômico da levedura foi utilizado o *Wizard genomic DNA purification kit* (Promega®). O gene da β -galactosidase foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a enzima *Pfu* turbo DNA Polimerase (Stratagene), oligonucleotídeos iniciadores específicos, contendo os sítios de restrição *Nde*I e *Xho*I. O fragmento de DNA amplificado foi ligado a um vetor de clonagem (pCR-Blunt), usando a enzima T4 DNA ligase, e subclonado em vetor de expressão pET30a(+) utilizando as mesmas enzimas de restrição.

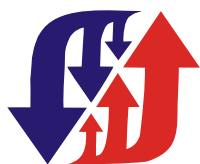
TESTES DE EXPRESSÃO DA β -GALACTOSIDASE

Foram testadas diferentes cepas eletrocompetentes de *E. coli* (Tabela I). As células foram transformadas com o DNA da construção pET30a(+): β -galactosidase por eletroporação e cultivadas em ágar Luria-Bertani (LB) (10 g/L cloreto de sódio, 10 g/L de triptona, 5 g/L extrato de levedura, 16 g/L de ágar), contendo o antibiótico para cada cepa recombinante.

Tabela I. Concentrações dos antibióticos de resistência para as cepas utilizadas.

Antibióticos	Cepas				
	BL21 (DE3)	Rosetta (DE3)	Rosetta-gami 2 (DE3)	C41 (DE3)	C43 (DE3)
Canamicina ($\mu\text{g/mL}$)	30	30	50	30	30
Cloranfenicol ($\mu\text{g/mL}$)	-	34	34	-	-
Tetraciclina ($\mu\text{g/mL}$)	-	-	12,5	-	-

Todos os cultivos (Tabela II) foram realizados em 50 mL de meio e a indução da expressão da β -galactosidase, com isopropil-tiogalactosídeo (IPTG), foi realizada nas concentrações de 0,05 mM e 1 mM, na densidade óptica (OD) entre 0,4 e 0,6 (600 nm). Foram realizadas coletas de amostras nos tempos 3 h, 6 h, 9 h, 24 h e 27 h após a indução. Para todos os cultivos foram realizados controles (células transformadas apenas com o vetor, induzidas e não induzidas, e transformadas com o vetor contendo o inserto, não induzidas), onde as células foram cultivadas nas mesmas condições testadas, concomitantemente. Todos os cultivos foram realizados em agitador orbital com velocidade de agitação de 180 rpm. Após cada coleta as células foram centrifugadas (13.000 rpm, 1 minuto) e congeladas. Para as



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

análises, foram ressuspendidas em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, rompidas por ultrassom em sonicador (três pulsos de 10 segundos) e centrifugadas (4°C, 13.000 rpm, 30 minutos). As frações foram separadas em solúveis (sobrenadante) e insolúveis (sedimentado) e analisadas.

Tabela II. Condições de cultivo utilizadas nos testes de expressão e atividade específica da β -galactosidase para as cepas recombinantes estudadas.

Cultivo	Cepa recombinante	Meio de cultivo	Temperatura (°C)	Atividade específica máxima (U/mg _{proteína})
1	BL21 (DE3)			ND
2	Rosetta (DE3)			ND
3	Rosetta-gami 2(DE3)	LB ¹	37°C	ND
4	C41 (DE3)			ND
5	C43 (DE3)			ND
6	C41 (DE3)			ND
7	Rosetta (DE3)	LB ¹		87,04 (27 h)
8	BL21 (DE3)			247,62 (9 h)
9	Rosetta (DE3)	M9 ²	30°C	60,66 (9 h)
10	BL21 (DE3)			85,54 (9 h)
11	Rosetta (DE3)	TB ³		59,20 (9 h)
12	BL21 (DE3)			40,39 (27 h)

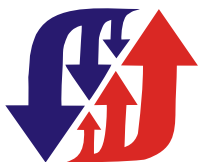
¹LB: triptona: 10 g/L, extrato de levedura: 5 g/L, NaCl: 10 g/L. ²M9: NaCl: 0,5 g/L, NH₄Cl: 1 g/L, extrato de levedura: 20 g/L, Na₂HPO₄: 6 g/L, KH₂PO₄: 3 g/L, glicose: 500 g/L, MgSO₄: 0,1 g/L, tiamina: 1 g/L, solução traço (FeSO₄: 2,8 g/L, MnCl₂: 2 g/L, CaCl₂: 2 g/L, CuCl₂: 0,26 g/L, ZnSO₄: 0,3 g/L): 1 mL/L. ³TB: triptona: 12 g/L, extrato de levedura: 24 g/L, K₂HPO₄: 12,5 g/L, KH₂PO₄: 2,3 g/L, glicerol 4 mL/L). ND: Não determinado.

MÉTODOS ANALÍTICOS

A densidade óptica dos cultivos foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. A expressão da β -galactosidase foi analisada nas frações solúveis e insolúveis, por meio de SDS-PAGE (12%), utilizando *Comassie Brilliant Blue* como corante e o marcador de peso molecular Page Ruler (ThermoScientific). A proteína intracelular foi quantificada pelo método de Bradford (*Bradford Protein Assay Kit*, BioRad). A atividade da enzima β -galactosidase foi determinada segundo a metodologia proposta por Rech et al. (1999), com modificações, utilizando ONPG (o-nitrofenol- β -D-galactopiranoside) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ONP (o-nitrofenol) por minuto, nas condições da análise.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das atividades específicas da β -galactosidase estão apresentados na Tabela II. Como na temperatura de 37°C ocorreu a expressão da enzima somente nas frações insolúveis (resultados não mostrados), a atividade da mesma não foi determinada. Verificou-se que a cepa recombinante Rosetta-gami 2 (DE3) não apresentou expressão da β -galactosidase na condição testada (meio de cultivo LB e 37°C), em ambas as frações. Nestas condições, a cepa recombinante C41 (DE3) apresentou pouca expressão, semelhante à obtida pela cepa C43 (DE3). Frente a estes resultados as cepas recombinantes Rosetta (DE3), BL21 (DE3) e C41 (DE3) foram escolhidas para realização de testes à 30°C. A cepa C41 (DE3)



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

continuou expressando a β -galactosidase somente na fração insolúvel. Porém as demais cepas recombinantes (Rosetta (DE3) e BL21 (DE3)), expressaram a enzima nas frações solúveis, independente da concentração do indutor. A maior atividade específica, aproximadamente 250 U/mg_{proteína}, foi obtida pela cepa recombinante BL21 (DE3), em meio de cultivo LB, à 30°C, após 9 horas de indução com 0,05 mM de IPTG. Em trabalhos prévios do nosso grupo, foram encontradas atividades específicas máximas de aproximadamente 0,50 U/mg_{proteína}, utilizando a enzima produzida por diferentes cepas de *Kluyveromyces* selvagens (não recombinante). Logo, foi possível verificar a super-expressão da enzima recombinante.

A Figura I apresenta os testes de expressão para as cepas recombinantes previamente selecionadas, Rosetta (DE3) e BL21 (DE3), na condição que levou aos maiores valores de atividade enzimática específica (meio de cultivo LB e 30°C). Aparentemente, a β -galactosidase expressa tem o tamanho de aproximadamente 120 kDa.

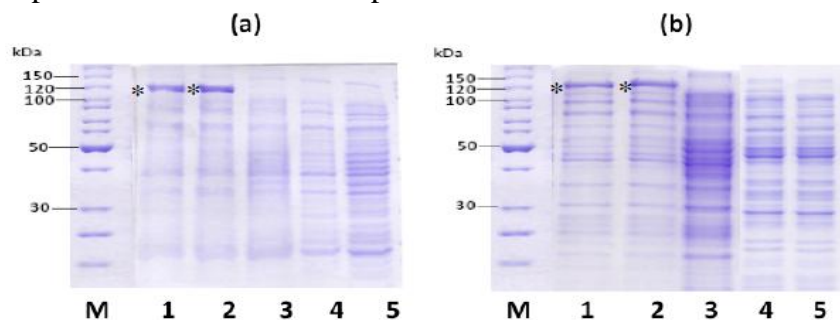


Figura I. Análise da expressão solúvel da β -galactosidase em meio de cultivo LB à 30°C. (a) Rosetta (DE3). (b) BL21 (DE3). M: Marcador de peso molecular; 1: Células transformadas com o vetor contendo o inserto, com indução (IPTG 1 mM); 2: Células transformadas com o vetor contendo o inserto, com indução (IPTG 0,05 mM); 3: Células transformadas com o vetor contendo o inserto, sem indução; 4: Células transformadas com o vetor sem o inserto, com indução (IPTG 1 mM); 5: Células transformadas com o vetor sem o inserto, sem indução.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, verificou-se a grande influência dos meios de cultivo e da temperatura na expressão e atividade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. em *E. coli* recombinante, onde foi possível a super-expressão da enzima. Os resultados vêm de encontro ao desenvolvimento de tecnologias que visem o desenvolvimento e redução de custos na obtenção de enzimas alimentícias. Como perspectiva para este trabalho temos a realização destes cultivos em biorreator de 2 litros e a purificação da β -galactosidase recombinante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ansari, S. A.; Satar, R., 2012. Recombinant β -galactosidases – Past, present and future: A mini review. *J. Mol. Cat. B: Enz.* 81, 1-6.
- Belem, M.A.F.; Lee, B.H., 1998. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38, 598–656.
- Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F., Kumar, H., 2006. Microbial production, immobilization and application of β -galactosidase. *J. Chem. Technol. And Biotech.* 81, 530-543.
- Pereira-Rodríguez, A., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M.I., Cerdán, M.E., Becerra, M., Sanz-Aparicio, J., 2012. Structural basis of specific in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *J. Struc. Biol.* 177, 392-401.
- Rech, R., Cassini, C.F., Secchi, A., Ayub, M.A.Z., 1999. Utilization of protein hydrolyzed cheese-whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Microbiol. and Biotech.* 23, 91-96.