

Obtenção de enzimas por técnicas de Biologia molecular e Bioinformática EM *ESCHERICHIA coli*

KETHLIN DE QUADROS FERREIRA¹; ALESSANDRA NEIS²; RAFAEL
WOLOSKI³; ALICE CALDERIPE DE LIMA⁴; GUILHERME DE SOUSA FEIJÓ⁵;
LUCIANO DA SILVA PINTO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – kethlin04@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – alessandraneisbiotec@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rafaelwoloski@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – acalderipe@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – guimasousa@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – ls.pinto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A biocatálise é uma ferramenta que contribui para a crescente demanda mundial por fontes de energia renováveis. Nos últimos anos, foi possível observar uma intensa aplicação sustentável de enzimas para produção de biocombustíveis (Abdelraheem et al., 2019). O Biocombustível tem origem biológica não fóssil, produzido a partir de processos sob a biomassa. Os de primeira geração são aqueles que utilizam soja, milho e cana-de-açúcar e sua produção ocorre através da fermentação. Já os de segunda geração são constituídos pelo bioetanol e o biodiesel produzidos a partir de diferentes fontes de biomassa vegetal, dando-se preferência para matérias-primas não utilizadas na alimentação humana (Robak & Balcerek, 2018). Para alcançar uma conversão eficiente de biomassa, um coquetel enzimático com diferentes enzimas é utilizado para realizar a hidrólise. Devido sua capacidade de degradar polímeros de celulose, as celulases, são amplamente aplicadas na indústria. Essas enzimas são classificadas em três grandes grupos, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, são eles: Endoglucanases (EGs), Exoglucanas e Beta-glicosidades.

As EGs são comumente utilizadas na indústria do bioetanol de segunda geração, uma vez que iniciam a hidrólise nas regiões internas da estrutura da massa celulósica. Estudos estimam que os coquetéis para desconstrução da biomassa são compostos por aproximadamente 60% CBHs, 15% EGs e 2% BGs, além de enzimas acessórias (Garvey et al., 2013). A hidrólise enzimática é a etapa que mais eleva os custos, dificultando a produção industrial, além disso, o processo ocorre entre 40-50°C, tem baixas taxas de produção de açúcares, e facilmente ocorre contaminação bacteriana (Ibraim et al., 2021). Para superar essas limitações é possível utilizar ferramentas de bioinformática estrutural combinadas a tecnologia do DNA recombinante para obtenção tanto de novas enzimas quanto de enzimas modificadas adaptadas a temperaturas extremas.

Ferramentas de Bioinformática podem contribuir para a engenharia de proteínas permitindo mudar a sequência de aminoácidos nativos de uma proteína afim de introduzir uma nova propriedade, ou melhorar uma função já existente (Arnold, 1993). A expressão de proteínas recombinantes passa por várias etapas como a seleção do gene de interesse, clonagem do vetor, transformação no hospedeiro escolhido, expressão e indução e, então, a proteína está pronta para purificação e caracterização. Diversos fatores podem interferir nesse processo como baixa taxa de crescimento do hospedeiro, formação de corpos de inclusão, inatividade proteica e, até mesmo, a não obtenção da proteína alvo. Tendo em vista essa problemática, esse trabalho teve como objetivo identificar, caracterizar e

aplicar metodologias *in silico* em enzimas de interesse industrial através de métodos computacionais e experimentais.

2. METODOLOGIA

Primeiramente, uma prospecção computacional foi realizada em diferentes bancos de dados, onde uma molécula apresentou-se como melhor candidata para prospecção *in vitro*. A fim de avaliar se a enzima poderia ter afinidade com o substrato celulósico, foi realizado o *docking* molecular com a celotetraose usando o programa Autodock Tools.

Após a confirmação da afinidade da enzima ao substrato por docagem molecular, o gene sintético foi desenhado com códons para expressão em bactéria, ligado ao vetor pAE. O gene foi obtido junto a empresa especializada (EPOCH, EUA). O vetor contendo o gene da enzima EG2 foi clonada em cepas de *E.coli*. As células transformadas com o plasmídeo recombinante foi crescida em meio Luria-Bertani (LB, Difco) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e para algumas cepas, com 50 µg/mL clorafenicol até a fase log de crescimento (DO600= 0,6-0,8), em agitador orbital (37°C, 200 rpm).

Foram utilizados 2 protocolos diferentes de expressão para a enzima EG2 em 7 cepas de *E.coli*. No primeiro, a indução ocorreu pela adição de 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e crescimento das células por 3:30h a 37°C; já no segundo, a indução ocorreu *overnight* a 28°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000rpm, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi separado para obtenção da enzima recombinante solúvel, utilizando o tampão Wash (pH 8, 20mM de imidazol). Enquanto os pellets foram ressuspensos em tampão de solubilização Wash com uréia (pH 8, 20mM de imidazol) para obtenção das frações insolúveis. As frações contendo as enzimas foram verificadas por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) e *Western blot* com anticorpo anti-his-tag conjugado à Peroxidase.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, a seleção das enzimas foi realizada usando diferentes abordagens, incluindo extensa análise de Bioinformática. Por exemplo, o *docking* da EG2 com a celotetraose apresentou um alto valor de energia de ligação (-7.2 kcal/mol), estando corretamente posicionada na fenda catalítica e formou pontes de hidrogênio com os glutamatos catalíticos

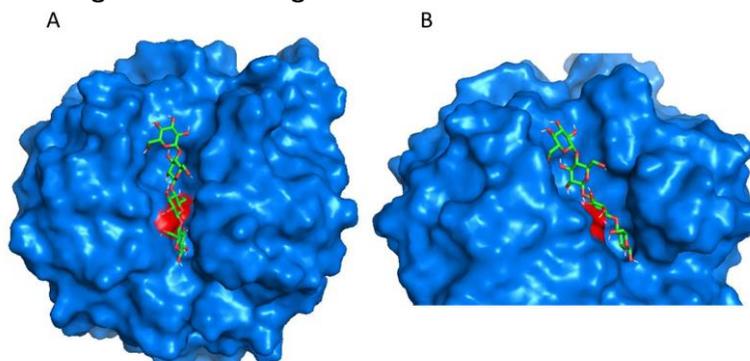


Figura 1: Análise de *docking* molecular da enzima EG2 e celotetraose utilizando o *software* Plip. A e B: encaixe da celotetraose na fenda catalítica.

Na figura 2 a) pode se observar que as cepas C41, C43 e Rosetta foram capazes de expressar a enzima EG2, uma vez que a mesma possui em torno de 35 kDa com o protocolo de indução 3:30h a 37°C. Já na figura 1 b) é possível observar que as cepas induzidas de Star, Rosetta, De3, Solu e C41 foram capazes de expressar a enzima EG2 com o protocolo de indução overnight a 28°C.

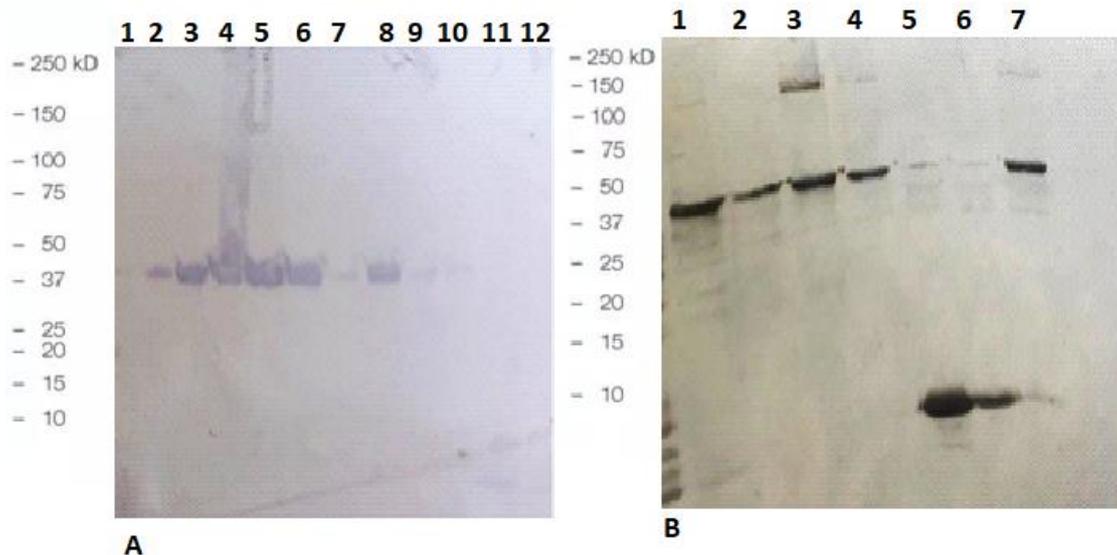


Figura 2: a) *Western Blot* das porções induzidas e não induzidas do extrato total da EG2 em diferentes cepas de *E.coli*, sendo elas representadas como: 1 - Solu não induzida; 2 - Solu induzida; 3 - C41 não induzida; 4 - C41 induzida; 5 - C43 não induzida; 6 - C43 induzida; 7 - Rosetta não induzida; 8 - Rosetta induzida; 9 - DE3 não induzida; 10 - DE3 não induzida, 11 - Ril não induzida; 12 - Ril induzida; Induzido a 3:30h em 37°C. b) *Western Blot* das porções induzidas do extrato total da EG2 em diferentes cepas de *E. coli*, sendo elas representadas por: 1 – Star; 2 – Rosetta; 3 – De3; 4 – Solu; 5 – Ril; 6 – C41; 7 – C43; Induzidos overnight em 28 °C.

Outros estudos foram capazes de expressar EGs com sucesso em cepas de *E.coli*, como descrito por Guan et al. (2017). Onde o mesmo utilizou a cepa BL21 (DE3) Rosetta. purificadas. Em contra partida outros autores relatam a dificuldade de expressão de celulases em *E. coli* devido à baixa produtividade, baixo índice de secreção de proteínas solúveis e baixa especificidade da enzima expressa (Jung et al., 2012). Aqui mostramos a expressão desta enzima em *E. coli* de forma satisfatória em diferentes cepas sendo necessário agora a caracterização da atividade da enzima e determinação de sua solubilidade.

4. CONCLUSÕES

A partir deste estudo foi possível avaliar a aplicação de técnicas de bioinformática e expressão de proteínas recombinantes para produção de enzimas de interesse industrial. Posteriormente pretende-se realizar o protocolo de recuperação destas moléculas através da purificação e avaliar a atividade enzimática das mesmas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHEEM, E.M.M., BUSCH, H., HANEFELD, U. & TONIN, F. (2019). **Biocatalysis explained: From pharmaceutical to bulk chemical production.** *Reaction Chemistry and Engineering*. 4(11). p. 1878–1894.

Arnold, F. H. (1993). **Engineering proteins for nonnatural environments.** *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(9), 744–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8330682>.

GARVEY, M., KLOSE, H., FISCHER, R., LAMBERTZ, C. & COMMANDEUR, U. (2013). **Cellulases for biomass degradation: Comparing recombinant cellulase expression platforms.** *Trends in Biotechnology*. 31(10). p. 581–593. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.06.006>.

Ibrahim AM, Hamouda RA, El-Naggar NE, Al-Shakankery FM. **Bioprocess development for enhanced endoglucanase production by newly isolated bacteria, purification, characterization and in-vitro efficacy as anti-biofilm of Pseudomonas aeruginosa.** *Sci Rep*. 2021 May 7;11(1):9754. doi: 10.1038/s41598-021-87901-9.

JUNG, S.K., PARISUTHAM, V., JEONG, S.H. & LEE, S.K. (2012). **Heterologous expression of plant cell wall degrading enzymes for effective production of cellulosic biofuels.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012. Available at: [/pmc/articles/PMC3403577/?report=abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3403577/?report=abstract).

LIMA, T. **Western Blotting – Immunoblotting.** *Imunologia & Hematologia*. 2010. Disponível em: <http://www.imunologiahematologia.wordpress.com/category/imunologia/>. Acesso em: 12 de Agosto de 2022.

SOUZA, A.A.U. **Separação de proteínas por eletroforese desnaturante descontínua na presença de SDS (SDS-PAGE).** Universidade Federal de Santa Catarina. 2010. Disponível em: www.enq.ufsc.br/disci/eqa5517/pratica_eletroforese.doc Acesso em: 12 de Agosto de 2022.

SORENSEN, H. P.; Mortensen, K. K. **Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*.** *Journal of Biotechnology* 115 (2005) 113–128.

ROBAK, K. & BALCEREK, M. (2018). **Review of second generation bioethanol production from residual biomass.** *Food Technology and Biotechnology*. 56(2). p. 174–187.

Xuefang Guan, Penglian Chen, Qingxian Xu, Lei Qian, Juqing Huang, Bin Lin,; **Expression, purification and molecular characterization of a novel endoglucanase protein from *Bacillus subtilis* SB13,** *Protein Expression and Purification*, Volume 134, 2017, Pages 125-131, ISSN 1046-5928, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.04.009>.