

Avaliação de estratégias de expressão em *Escherichia coli* para produção de amilase de *Paenibacillus barengoltzii*

Augusto Soares Leite Ribeiro¹, Luane Tomé de Paula Campos², Mônica Caraméz Triches Damaso³, Eliane Ferreira Noronha⁴

Resumo

Amilases são hidrolases amplamente utilizadas em processos biotecnológicos, podendo ser aplicadas na indústria alimentícia, produção de biocombustíveis e até mesmo no beneficiamento de tecidos da indústria têxtil. Dessa forma, é notável a necessidade de buscar otimizar a produção dessa enzima em uma escala laboratorial. O presente trabalho busca avaliar condições de cultivo com a bactéria *Escherichia coli* para expressão de amilase de *Paenibacillus barengoltzii*. Com essa finalidade, foram então realizadas quatro condições de expressão com células de *E. coli* BL21 (DE3) AmyPb. As condições se diferem pelo meio utilizado (meio autoindutor com lactose ou meio LB com IPTG) e o tampão de lise (tris-HCl-PMSF ou tampão fosfato). Anteriormente, as condições de expressão utilizavam o meio autoindutor com lactose e tampão tris-HCl-PMSF, gerando atividades enzimáticas relativamente baixas. Mediante o exposto, houve necessidade de buscar alternativas para aprimorar a produção da amilase neste estudo.

Termos para indexação: amilase, meio de cultura, tampão de lise, IPTG, lactose.

Introdução

Atualmente, cerca de 65% das vendas do mercado mundial de enzimas são de amilases (Simair et al., 2017). Na produção têxtil e de papel, as amilases podem ser utilizadas no amaciamento, na modificação, na limpeza e no processo de desengomagem de fibras têxteis (Singh et al., 2016).

O tecido resistente de algodão denim, altamente popular e de aparência versátil, por exemplo, é produzido a partir de fios de algodão que são esticados longitudinalmente na máquina de tecelagem, formando uma base firme para o tecido, denominada urdume (Denin, 2020). Esses fios são dispostos paralelamente uns aos outros e são mantidos tensos durante o processo de tecelagem. Por sua vez, horizontalmente através dos fios do urdume, a “trama” cruza os fios do urdume alternadamente para criar o tecido final. O denim pode ser corado com corantes índigos (geralmente azuis) ou por tramas brancas (Denin, 2020).

A goma (produto à base de amido) é adicionada a esses fios para fornecer uma maior resistência e integridade na tecelagem, impedindo que eles se rompam. Entretanto, a aplicação do amido torna os fios viscosos, e, por essa razão, as amilases, mais precisamente as α -amilases, atuam hidrolisando as ligações α -1,4 presentes no amido da goma, melhorando assim a qualidade do tecido (De Souza; De Oliveira Magalhães, 2010).

O uso de enzimas na indústria têxtil já vem sendo aplicado em vários países. O artigo “Application of enzymes for textile fibers processing” (Araújo et al., 2008) afirma que a necessidade do uso de

¹ Graduando em Biotecnologia, Universidade de Brasília, augusto.leite@colaborador.embrapa.br

² Biotecnologista, mestranda em Biologia Molecular e Beneficiamento de Tecidos, Universidade de Brasília, luane.campos@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

⁴ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, elinoronha@gmail.com

enzimas se dá por vários motivos, e os principais são o consumo de energia e matéria-prima e o uso e descarte de agentes químicos em água, ar e aterros (Araújo et al., 2008).

A bactéria anaeróbica termófila *Paenibacillus barengoltzii* é uma promissora fonte de enzimas termófilas, como é o caso da amilase. As espécies do gênero em questão apresentam características morfológicas e fisiológicas semelhantes às espécies do gênero *Bacillus*, que abrangem uma série de microrganismos envolvidos em aplicações industriais já bem consolidadas, como fonte de enzimas ou sistemas de expressão heteróloga (Läufer, 2017).

Como sistema de expressão da amilase, a bactéria *Escherichia coli* é um organismo adequado por sua facilidade de cultivo e ótima expressão heteróloga de proteínas recombinantes (Gopal; Kumar, 2013; Kaur, Kumar e Kaur, 2017).

Levando em consideração os fatos mencionados, este trabalho consiste em uma avaliação comparativa da atividade enzimática da amilase de *Paenibacillus barengoltzii* expressa em *Escherichia coli* em quatro diferentes condições de expressão. Posteriormente, a amilase será testada em tecidos de algodão para o processo de desengomagem.

Materiais e métodos

Os genes de amilase AmyPb de *Paenibacillus barengoltzii* foram clonados no plasmídeo pET21a e foram expressos em células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3). As linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) com o gene AmyPb e selvagens foram conservadas a -80 °C em criotubos contendo 2 mL de solução de glicerol 25%. Para obter colônias isoladas em placas de Petri estéreis, o meio utilizado foi o Luria-Bertani ágar (Bertani, 1951), tendo seu pH ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1 M.

Como marcador de seleção, foi utilizada ampicilina na concentração 1000X (100 mg/mL), visto que o plasmídeo pET21a possui um gene de resistência à ampicilina. As placas contendo 25 mL de meio Luria-Bertani foram inoculadas nas seguintes condições: em duplicata, foram inoculadas, a partir de criotubos, células de *E. coli* BL21 (DE3) selvagens sem ampicilina; células de *E. coli* BL21 (DE3) selvagens com 25 microlitros de ampicilina 1000X; e células de *E. coli* BL21 (DE3) AmyPb com 25 microlitros de ampicilina 1000X.

As placas inoculadas foram incubadas em um *shaker* sem rotação a 37 °C por 18 horas, e posteriormente armazenados a 4 °C. Assim, para realizar um pré-inóculo inicial, foram coletadas colônias isoladas de *E. coli* BL21 (DE3) AmyPb a partir da placa contendo meio LB com ampicilina e inoculadas em 2 Erlenmeyers de 250 mL contendo 30 mL de meio LB líquido e 30 microlitros de ampicilina 1000X.

Os dois pré-inóculos contendo células de *E. coli* com o gene AmyPb em meio LB líquido foram incubados a 37 °C e 200 rpm em um *shaker* por cerca de 16 horas. Seguente à incubação, foi feita uma leitura de densidade óptica dos pré-inóculos para que o inóculo de indução com IPTG ocorresse com uma densidade óptica inicial de 0,3. Para iniciar a indução, foram inoculados, em cada um dos dois Erlenmeyers contendo 50 mL de meio autoindutor com lactose e antibiótico (Studier, 2005), 2 mL de um dos pré-inóculos. Em outros dois Erlenmeyers contendo 50 mL de meio LB líquido sem lactose, foram inoculados 2 mL do outro pré-inóculo para obter uma densidade óptica inicial de 0,3.

Os dois Erlenmeyers contendo o meio autoindutor com lactose foram incubados no *shaker* a 37 °C e 200 rpm por 24 horas. Para a indução em meio LB sem lactose, os dois Erlenmeyers foram incubando a 200 rpm e 37 °C até obterem uma densidade óptica de 1,3–1,4 (2 horas de incubação). Após se obter essa densidade óptica, foi adicionado ao meio IPTG (isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosida) para uma concentração final de 0,75 mmol/L. Os dois cultivos em meio LB contendo IPTG

foram incubados por mais 3 horas (5 horas no total). Após o cultivo, todos os meios foram armazenados em câmara fria a 4 °C.

Para se obter o extrato contendo a amilase de interesse, as células de *E. coli* foram coletadas por centrifugação (18.500 g/4 °C/20 minutos) utilizando-se Falcons de 50 mL e posteriormente descartando o sobrenadante. Em seguida, foi necessário gerar a lise das células por sonicação utilizando-se tampões de lise. Os tampões utilizados foram o tampão fosfato 20 mmol/L pH 7,4, NaCl 500 mM e o tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA pH 8 e 1 mM PMSF. Foram utilizados 10 mL de cada tampão de lise a cada 50 mL de cultivo. A sonicação ocorreu na amplitude de 35%, *pulse on* 15 segundos, *pulse off* 15 segundos, por 3 minutos.

Finalizando a sonicação, o produto da lise nos Falcons de 50 mL foi coletado e clarificado por centrifugação (18.500 g/4 °C/20 minutos).

Os ensaios de atividade de hidrólise do amido foram realizados por leitura de absorbância, segundo o método de FUWA (1954). O ensaio de atividade consistiu na adição de 50 microlitros de substrato amido 0,5%, 50 microlitros do extrato enzimático e 100 microlitros de tampão fosfato de sódio pH 6,5 50 mM, deixando incubar a 40 °C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 microlitros de ácido acético para parar a reação e 200 microlitros do reagente FUWA. O iodeto presente no reagente de FUWA forma um complexo com o amido, escurecendo a solução. A concentração do complexo amido-iodeto foi lida por um espectrofotômetro na absorbância de 660 nanômetros. Quanto mais clara a solução, menor é a concentração do complexo e maior é a atividade da enzima.

Resultados e discussão

Nas placas de Petri inoculadas, não foi observado crescimento das células de *E. coli* selvagens nos meios com ampicilina. Todavia, as células de *E. coli* com o gene de resistência à ampicilina do plasmídeo pET21a cresceram no meio com ampicilina.

O extrato enzimático foi diluído em 10 vezes e 100 vezes para realizar a comparação, pois nas quatro condições de expressão havia total consumo do substrato amido utilizando o extrato não diluído. Os resultados obtidos no gráfico (Figura 1) foram calculados pela fórmula $(D_0 - D)$, em que D_0 é o valor da média da absorbância dos controles e D é o valor da média dos ensaios. O controle apresenta a coloração mais escura, visto que, com a ausência da enzima, o reagente FUWA consegue interagir com praticamente todo o amido. Os resultados apresentados demonstram como a indução com o IPTG aumentou a atividade do extrato enzimático, e como a escolha do tampão de lise não afetou a atividade de hidrólise do amido significativamente.

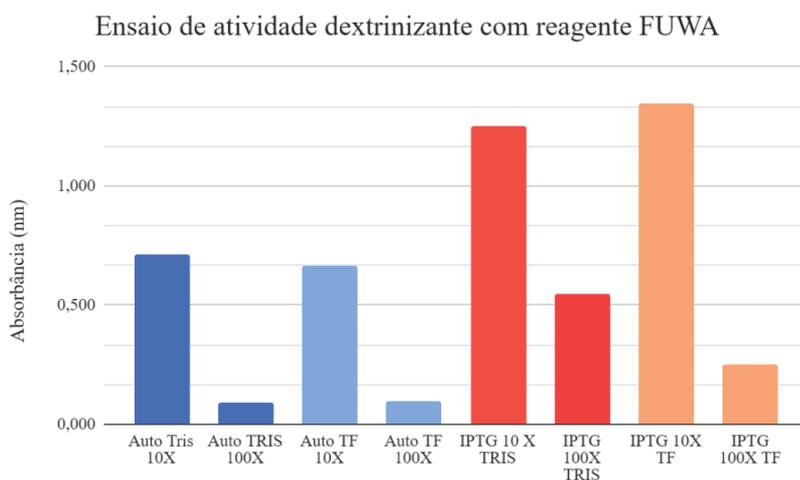


Figura 1. Ensaio de absorbância a 660 nanômetros do extrato enzimático nas diferentes condições de expressão: azul-escuro (meio autoindutor/tampão Tris-HCl-PMSF), azul-claro (meio autoindutor/tampão fosfato), vermelho (meio LB com IPTG/TRIS) e laranja (meio LB com IPTG/tampão fosfato).



Figura 2. Gradiente de cores utilizando o reagente FUWA sem a amilase em concentrações crescentes de amido 0,5% da esquerda (mais claro) para direita (mais escuro).

Conclusão

A atividade da enzima amilase expressa foi analisada nas quatro condições de expressão, utilizando-se o ensaio de absorvância com reagente de FUWA. Entretanto, há claramente uma necessidade de realizar mais ensaios com a finalidade de quantificar a atividade de hidrólise de amido pela enzima, e também fazer a contagem de proteínas totais por BCA, fazer comparação entre os cultivos por eletroforese em gel SDS-page e futuramente fazer a aplicação da enzima na desengomagem do jeans. O presente trabalho está analisando quatro condições de cultivo para obtenção da amilase em escala laboratorial, visto que o IPTG não é popularmente utilizado em escala industrial como um indutor, por seu alto custo.

Verificou-se que independentemente dos tampões de lise utilizados para extrair a enzima, a indução por IPTG foi mais eficaz para obtenção de maiores atividades enzimáticas se comparada à lactose. Ademais, foi possível observar uma maior atividade da enzima na condição de cultivo com o indutor IPTG em apenas 5 horas de incubação e OD inicial de 0,3, em comparação com a indução em meio autoindutor com lactose e incubação por 24 horas.

Referências bibliográficas

- ARAÚJO, R.; CASAL, M.; CAVACO-PAULO, A. Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 26, n. 5, p. 332-349, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10242420802390457>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis I. *Journal of Bacteriology*, v. 62, n. 3, p. 293-300, 1951.
- DE SOUZA, P. M.; DE OLIVEIRA E MAGALHÃES, P. Application of microbial α -amylase in industry: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010.
- DENIN. In: DENINHUNTERS. Horsholm, Demark, 2020. Disponível em: <https://denimhunters.com/denim-wiki/denim-explained/denim/>. Acesso em: 6 Ago. 2023.
- GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein Journal*, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2013.
- KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 803-822, 2017.

- LÄUFER, A. Starch biorefinery enzymes. In: WAGEMANN, K.; TIPPKÖTTER, N. (Ed.). **Biorefineries**. Berlin: Springer, 2017. p. 137-152. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 166).
- MANGRIO, G. S.; LU, C.; RAVINDRA, N. Production and partial characterization of α -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017. 9173040-9.
- MARYAN, A. S.; MONTAZER, M. A cleaner production of denim garment using one step treatment with amylase/cellulase/laccase. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 320-326, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095965261300379X?via%3Dihub>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- SIMAIR, A. A.; QURESHI, A. S.; KHUSHK, I.; ALI, C. H.; LASHARI, S.; BHUTTO, M. A.;
- SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; METTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 2016. 174.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207-234, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>. Acesso em: 6 Ago. 2023.
- SUZUKI, E.; SUZUKI, R. Distribution of glucan-branching enzymes among prokaryotes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 14, p. 2643-2660, 2016.