

	Universidade Estadual de Maringá
	Programa de Pós-graduação em Bioquímica
	Discente: Larissa Aparecida Ricardini
	Título: Produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase de <i>Bacillus firmus</i> CEPA 37 em <i>Escherichia coli</i>

RESUMO GERAL

O amido é um carboidrato polimérico formado por muitas unidades de glicose unidas covalentemente, sendo o principal material de reserva das plantas e a principal fonte de energia na nutrição animal. No grânulo do amido são encontrados dois tipos de polímero de glicose, a amilose e a amilopectina. A amilose é formada por cadeias longas não ramificadas de resíduos de D-glicose unidos por ligação glicosídica α -(1-4). Já a amilopectina, ao contrário da amilose, é altamente ramificada, sendo a cadeia linear também composta por resíduos de D-glicose unidos por ligação glicosídica α -(1-4) e ramificações α -(1-6) a cada 8 a 12 resíduos. Além de sua importância como material de reserva e fonte de energia nutricional, o amido também possui importância industrial devido a seu baixo custo, fácil obtenção por ser natural, além da possibilidade de alterar suas propriedades físico químicas e submetê-lo a reações enzimáticas.

Uma das enzimas relacionadas ao objeto de estudo deste trabalho são - amilases, endocarbohidratases, que agem hidrolisando ligações α -(1-4) presentes na amilose e na amilopectina, randomicamente na porção central das moléculas. Elas possuem mais afinidade por substratos de maior massa molecular, criando uma mistura de oligossacarídeos de diferentes tamanhos, que podem ser lineares ou ramificados, chamados de dextrina ou maltodextrina. Enzimas amilolíticas são usadas em larga escala e uma dessas enzimas é a CGTase, que vêm ganhando grande destaque devido sua capacidade de realizar ciclização do amido gerando assim as ciclodextrinas. O oligossacarídeo ciclodextrina (CD) possui de 6 a 8 resíduos de glicose unidos por ligação glicosídica α -(1-4) e compondo um macrociclo em forma de anel. Existem 3 tipos de CDs, que se diferenciam pela quantidade de resíduos de glicose no ciclo: as α -ciclodextrinas (6 resíduos de glicose), β -ciclodextrinas (7 resíduos de glicose) e γ -ciclodextrinas (8 resíduos de glicose). Tridimensionalmente, as ciclodextrinas tem um formato de cone cuja face interna possui um caráter apolar e a face externa, polar. Dessa forma, a molécula de CD pode encapsular substâncias em seu interior, causando profundas modificações físico-químicas das mesmas. A substância que forma um composto de inclusão com a CD pode ter sua estabilidade aumentada, diminuição da volatilidade, resistência térmica e contra oxidação, diminuir a hidrólise de compostos lábeis, aumentar a solubilidade de compostos insolúveis, entre outros. Por isso, as CDs têm grande potencial para serem utilizadas industrialmente, com emprego na área de alimentos, cosméticos, tecnologia química, fármacos, pesticidas, entre muitos outros.

Devido ao grande interesse comercial no emprego das CDs, as CGTases são bastante estudadas e os pesquisadores da área estão constantemente buscando novas fontes e formas de aumentar o rendimento de sua produção. Essas enzimas são produzidas por várias espécies de bactérias de vida livre encontradas em diversos ambientes diferentes. Anteriormente, através de prospecção de bactérias produtoras de

	Universidade Estadual de Maringá
	Programa de Pós-graduação em Bioquímica
	Discente: Larissa Aparecida Ricardini
	Título: Produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase de <i>Bacillus firmus</i> CEPA 37 em <i>Escherichia coli</i>

CGTase em solo brasileiro, a bactéria *Bacillus firmus* cepa 37 foi isolada e identificada como uma boa produtora de CGTase, a qual produz, principalmente, β -CD. Em estudos prévios, o gene codificador da CGTase desse organismo foi sequenciado, amplificado e clonado para expressão de proteína recombinante em sistema heterólogo de *Bacillus subtilis*. No entanto, para viabilizar o emprego comercial da CGTase de *B. firmus* cepa 37, faz-se necessário um sistema de expressão que permita um maior rendimento enzimático. Por isso, no presente trabalho o gene que codifica a CGTase de *B. firmus* cepa 37 foi clonado em vetor pET29a, que permite a superexpressão da enzima no sistema heterólogo de *Escherichia coli*. O plasmídeo planejado foi sintetizado por empresa especializada.

Uma vez adquirido o plasmídeo, o mesmo foi replicado na estirpe Top10 de *E. coli* e, para superexpressão de proteínas, transformado na estirpe BL21(DE3), também de *E. coli*. As células foram crescidas em meio líquido, e a expressão da proteína recombinante foi induzida mediante a adição de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), um análogo da lactose. A superexpressão foi confirmada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As células contendo o extrato proteico foram lisadas por sonicação para liberação da enzima superexpressa para o meio extracelular. A atividade de CGTase desse extrato proteico foi avaliada pelo método da complexação da fenoltaleína. Os resultados mostraram que a CGTase foi expressa na forma ativa, tendo sido encontrada uma atividade de 0,12 μ mol CD/mL.

O presente trabalho obteve sucesso na obtenção de um sistema de expressão da enzima CGTase de *B. firmus* cepa 37 em *E. coli* na sua forma ativa. A proteína produzida dessa forma poderá posteriormente ser purificada até homogeneidade e utilizada para diferentes aplicações industriais.

PALAVRAS-CHAVE: CGTase; Biotecnologia; Enzima recombinante