

Avaliação da expressão da enzima β -galactosidase recombinante utilizando de diferentes indutores

Juliane Carraro Nunes¹, Matheus Loch Velvites¹, Bruna Coelho de Andrade¹,
Victória Furtado Migliavacca¹, Joicelei Maria Chies¹, Gaby Renard¹,
Claucia Fernanda Volken de Souza¹, Giandra Volpato^{1*}
*Orientadora

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) -
Campus Porto Alegre. Porto Alegre, RS

A β -galactosidase tem especial importância para a indústria, sendo utilizada na preparação de produtos lácteos utilizados por indivíduos intolerantes a lactose. Uma etapa fundamental na produção da β -galactosidase recombinante, envolve a expressão desta enzima, que pode ser realizada por diferentes indutores. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de diferentes indutores e suas concentrações na expressão da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. em *Escherichia coli*. Células de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas por eletroporação com o DNA da construção pET30a(+): β -galactosidase, previamente realizada. Os cultivos da *E. coli* BL21 (DE3) contendo a transformação foram realizados em 50 mL de meio Luria-Bertani (LB), na presença do antibiótico canamicina, sendo mantidas em agitação orbital de 180 rpm, a 30 °C. Foram adicionados a cada cultivo 10 % de pré-inóculo padronizado com densidade óptica (OD) de 0,1 a 600 nm. Os cultivos foram induzidos ao atingirem OD entre 0,4 e 0,6. Para realizar a indução foram testados os indutores IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactosídeo) nas concentrações de 0,05 mM e 0,5 mM, e lactose nas concentrações 1 g/L, 10 g/L e 20 g/L. Os cultivos foram realizados em triplicatas e foram coletadas amostras em diferentes tempos após a indução (3 h, 6 h, 9 h, 24 h e 27 h). Para controle também foram realizados cultivos não induzidos e de células transformadas apenas com o vetor de clonagem (sem o gene de interesse), induzidas e não induzidas. As amostras coletadas foram centrifugadas a 13.000 rpm por dois minutos, retirado o sobrenadante e o pellet de células foi ressuscitado, rompido por sonicação e as frações separadas por centrifugação. A expressão da β -galactosidase foi analisada nas frações solúveis e insolúveis, por meio de SDS-PAGE, utilizando Comassie Brilliant Blue como corante. A quantificação da proteína solúvel intracelular foi determinada pelo método de Bradford, utilizando o kit Bradford Protein Assay (BioRad). A atividade enzimática foi determinada através de método espectrofotométrico utilizando o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. A maior atividade enzimática específica foi de $39,13 \pm 2,30$ U/mgproteína, obtida utilizando lactose como indutor na concentração de 10 g/L, após 27 h de indução. Não foi verificada diferença significativa nos valores de atividade quando utilizado lactose como indutor, nas concentrações de 10 e 20 g/L, a partir de 6 h de cultivo. Quando utilizado IPTG como indutor verificou-se uma menor atividade específica. Este resultado demonstra a possibilidade de utilizar um indutor de menor custo e com baixa toxicidade.

Palavras-chave: β -galactosidase. Lactose. Isopropil- β -D-1-tiogalactosídeo.