

Avaliação da expressão da lipase recombinante de *Staphylococcus warneri* EX17 em *Escherichia coli*

Victória Furtado Migliavacca¹, Mariana Coelho Mendes¹, Matheus Loch Velvites Ferreira¹,
Gaby Renard¹, Jocelei Maria Chies¹, Marco Antônio Zachia Ayub¹,
Bruna Coelho de Andrade¹, Giandra Volpato^{1*}
*Orientadora

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

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos. Possuem grande importância na indústria farmacêutica e alimentícia, porém o uso de enzimas pela indústria ainda representa um alto custo, logo se faz necessária a investigação de métodos eficientes e de baixo custo para sua produção. A obtenção da enzima recombinante possibilita a obtenção de maiores quantidades de lipase com um custo menos elevado, otimizando o processo produtivo. Com isso, este trabalho tem o objetivo o estudo da expressão da lipase recombinante de *Staphylococcus warneri* EX17 em cepas de *Escherichia coli*. Foi realizada a extração do DNA genômico da cepa de *Staphylococcus warneri* EX17. Em seguida foi realizada a amplificação do gene em uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos contendo sítios de ligação para enzimas de restrição NheI e BamHI, a enzima Pfu DNA Polimerase, foram testadas diferentes temperaturas de anelamento e diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO). O fragmento de DNA amplificado foi ligado a um vetor de clonagem (pCR®-Blunt) e subclonado em vetor de expressão (pET23a(+)). Para expressão da enzima recombinante, foram testadas diferentes cepas eletrocompetentes de *Escherichia coli* (BL21(DE3), Rosetta(DE3), Rosetta-gami 2(DE3) e C43(DE3)), que foram transformadas por eletroporação com a construção pET23a(+):lipase. Foram avaliadas diferentes temperaturas de cultivo (30 °C e 37 °C), meios de cultura (LB e TB) e concentrações do indutor isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) (0,05, e 1 mM). Os cultivos foram realizados em agitador orbital (shaker) a 180 rpm, por 30 h, sendo efetuadas coletas a cada três horas após a indução dos cultivos. As amostras foram centrifugadas e rompidas por sonicação e as frações separadas e analisadas individualmente. A análise da expressão da enzima foi realizada por meio de SDS-PAGE (12 %), na qual as frações solúveis e insolúveis foram analisadas. A quantificação de proteína intracelular foi determinada pelo método de Bradford e a atividade lipolítica foi quantificada utilizando p-nitrophenyl palmitato (pNPP) como substrato. A melhor condição de expressão foi obtida para a cepa de *E. coli* BL21(DE3) cultivada em meio LB a 30 °C e induzidas com 0,05 mM de IPTG. A maior atividade enzimática específica foi 0,046 U/mgproteína, obtida em 9 horas após a indução. Por meio da técnica do DNA recombinante, a otimização do processo produtivo da expressão da lipase surge como uma alternativa viável e inovadora que possibilita a redução dos custos na obtenção da enzima em escala industrial.

Palavras-chave: Lipase. Enzima recombinante. Superexpressão.