

**Estudo da superexpressão da enzima β -galactosidase recombinante de
kluveromyces sp. Em diferentes Cepas de *escherichia coli***

Bruna Coelho de Andrade

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
(bruna.andrade.001@acad.pucrs.br)

Victória Furtado Migliavacca

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS)
(victoria-migliavacca@uergs.edu.br)

Vanessa Yuki Grafulin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
(vanessa.grafulin@ufrgs.br)

Claucia Fernanda Volken de Souza

Centro Universitário UNIVATES
(claucia@univates.br)

Jocelei Maria Chies

Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento
(direcao@quatrogpd.com.br)

Gaby Renard

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
(gaby.renard@pucrs.br)

Giandra Volpato

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(giandra.volpato@poa.ifrs.edu.br)

Resumo: A enzima β -galactosidase hidrolisa a lactose em glicose e galactose. É utilizada para produção de alimentos com baixo teor deste açúcar. A obtenção dessa enzima recombinante poderá permitir sua produção em maiores quantidades com um menor custo. O objetivo deste trabalho foi estudar a superexpressão da enzima β -galactosidase recombinante de *Kluyveromyces* sp. em diferentes cepas de *E. coli*. O gene da β -galactosidase foi amplificado e ligado a um vetor de clonagem e subclonado em vetor de expressão. Para os testes de expressão, foram testadas diferentes cepas eletrocompetentes de *E. coli*: BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Rosetta-gami 2 (DE3), C41 (DE3) e C43 (DE3); diferentes meios de cultura: LB, TB e M9; temperaturas de cultivo: 30°C e 37°C; e concentrações do indutor isopropil-tiogalactosídeo (IPTG): 0,05 mM e 1 mM. Foram realizadas coletas nos tempos 3 h, 6 h, 9 h, 24 h e 27 h após a indução. A expressão da enzima foi analisada por SDS-PAGE, quantificada pelo método de Bradford e sua atividade enzimática foi determinada usando o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. A cepa BL21 (DE3) obteve a maior atividade enzimática específica, aproximadamente 250 U/mg_{proteína}, em LB, à 30°C, após 9 horas de indução com 0,05 mM de IPTG.

Palavras-chave: Bioprocessos; IPTG; Superexpressão.

Study of overexpression of the recombinant β -galactosidase enzyme of *kluyveromyces* sp. In different strains of *escherichia coli*

Abstract: The β -galactosidase enzyme hydrolyses lactose in glucose and galactose. It is used in the production of food with low levels of this sugar. The obtention of this recombinant enzyme will allow its production in larger quantities with a lower cost. The aim of this work was to study the *Kluyveromyces* sp. recombinant β -galactosidase superexpression in different *E. coli* strains. The β -galactosidase gene was amplified and ligated to a cloning vector, and then subcloned into an expression vector. For the expression tests, different conditions were tested: electrocompetent *E. coli* cells BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Rosetta-gami 2 (DE3), C41 (DE3) and C43 (DE3); culture medium LB, TB and M9; cultivation temperatures of 30°C and 37°C; and inductor (Isopropyl- β -D-thiogalactoside - IPTG) concentrations of 0.05 mM and 1 mM. Samples were taken at 3, 6, 9, 24 and 27 hours after induction. The enzyme expression was analyzed by SDS-PAGE, its concentration was determined by Bradford method and its activity was determined using ortho-Nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) as substrate. The enzyme expressed by BL21 (DE3) strain showed the highest specific activity, approximately 250 U/mg_{protein}, in LB medium at 30°C, after 9 hours induction with 0.05 mM IPTG.

Keywords: Bioprocess; IPTG; Overexpression.

INTRODUÇÃO

A enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23), comumente conhecida como lactase, é uma das principais enzimas utilizadas no processamento de alimentos, por hidrolisar a lactose em seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose (PANESAR *et al.*, 2010). Sua principal aplicação tem sido a preparação de leite e derivados lácteos com baixo teor de lactose, além de suplementos alimentares utilizados por indivíduos intolerantes a lactose (PEREIRA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; BELÉM e LEE, 1998).

A intolerância a lactose, ou má absorção da lactose, é um problema comum. Atualmente se estima que aproximadamente 70% da população mundial apresenta deficiência primária da lactase. Na Europa, a deficiência da lactase pode variar entre 4% (Dinamarca e Irlanda) e 56% (Itália). Foi reportado que na América do Sul, África e Ásia, mais de 50% da população tem deficiência primária da lactase podendo chegar a 100% na população asiática. No Brasil a prevalência aproxima-se a 80% na população com idade entre 38 e 49 anos (LULE *et al.*, 2016). Na maioria dos adultos a atividade da β -galactosidase diminui na parede intestinal após o período de amamentação, caracterizando a hipolactasia primária, o que provoca sintomas de intolerância à lactose (MATTAR e MAZO, 2010; MISSELWITZ *et al.*, 2013). Esses sintomas resultam da secreção de fragmentos catabólicos provenientes da fermentação bacteriana da lactose no cólon, quando esse açúcar não é absorvido corretamente (HUSAIN, 2010).

A intolerância a lactose pode ser causada por quatro tipos de deficiências da enzima β -galactosidase: primária, secundária, no desenvolvimento e congênita. A deficiência da β -galactosidase primária é o tipo mais comum, onde a produção da enzima diminui ao longo do tempo. A deficiência secundária resulta de lesões no intestino delgado, bem como infecções, doenças ou outros problemas que afetam o intestino. A deficiência da β -galactosidase no desenvolvimento ocorre em lactantes prematuros. Na rara deficiência da β -galactosidase congênita, o intestino delgado produz pouca ou nenhuma enzima desde o nascimento (SILANIKOVE *et al.*, 2015; SUCHY *et al.*, 2010).

O interesse em utilizar a β -galactosidase na indústria de laticínios surgiu inicialmente para realizar o prévio tratamento do leite empregado na fabricação de doces e iogurtes, por exemplo. Esta aplicação melhora as propriedades sensoriais do produto final, devido às características tecnológicas mais interessantes dos monossacarídeos resultantes, glicose e galactose, como o aumento do gosto doce, maior solubilidade, menor poder de cristalização (KLEIN *et al.*, 2010; VASILEVA *et al.*, 2012).

Atualmente, a β -galactosidase vem ganhando destaque no mercado de leites e derivados, principalmente no desenvolvimento de produtos alimentícios com baixo teor de lactose, ou livre de lactose, que tem aumentado significativamente em função, principalmente, do aumento de indivíduos diagnosticados com a hipolactasia primária do adulto.

Embora tem-se observado um crescimento na aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais, este emprego ainda representa um aumento no custo de produção, que se reflete no valor do produto final. Novas metodologias estão sendo estudadas para melhorar a eficiência do processo, ou buscando alternativas para diminuir o custo de aplicação industrial de enzimas (RABERT *et al.*, 2013). Essas alternativas envolvem o aumento da atividade enzimática, que pode ser obtido através da enzima recombinante e otimização do bioprocessamento (ANSARI e SATAR, 2012). O uso de técnicas de engenharia genética pode possibilitar o aumento da produção da β -galactosidase por meio da modificação ou da introdução de genes que promovem características como maior produção da enzima ou aumento da atividade enzimática (ZOU, 2014).

A tecnologia do DNA recombinante tem sido utilizada em processos de aplicação industrial para aumentar a produtividade enzimática e melhorar a estabilidade da enzima, onde a maioria das proteínas utilizadas são produzidas em hospedeiros de expressão heteróloga (GUO *et al.*, 2017). A funcionalidade das enzimas, velocidade de produção e o rendimento, são os fatores mais importantes a serem considerados quando é feita a escolha do sistema de expressão para a produção de enzimas recombinantes (ADRIO e DEMAIN, 2010). Entre os diferentes sistemas disponíveis, a produção de proteínas recombinantes em sistemas microbianos mostra-se eficiente (ROSANO e CECCARELLI, 2014). A bactéria *Escherichia coli* é um dos sistemas mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes, apresentando expressão e crescimento rápidos e alto rendimento de produto (SU *et al.*, 2017).

As β -galactosidases atualmente utilizadas para aplicação em alimentos são de fontes microbianas como, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis* (FREITAS *et al.*, 2011). As β -galactosidases de leveduras são fermentadoras da lactose, produzem β -galactosidases intracelularmente e são boas fontes dessa enzima, sendo as de *Kluyveromyces* importantes fontes comerciais, pois estão presentes naturalmente em produtos lácteos (HUSAIN, 2010).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi estudar a superexpressão da enzima β -galactosidase recombinante de *Kluyveromyces* sp. em diferentes cepas de *E. coli*.

METODOLOGIA

Crescimento da cepa de *Kluyveromyces* sp.

A cepa de *Kluyveromyces* sp. (ATCC-12424) foi mantida em ágar YEPD (20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedura e 16 g/L de ágar) à 4°C e recuperada pelo cultivo de uma colônia em meio líquido YEPD. Após o crescimento, foi preparado um inóculo no mesmo meio de cultura, mantido sob agitação orbital de 150 rpm, 37°C, por aproximadamente 18 h, onde obteve-se a quantidade necessária de microrganismos para realizar a extração do seu DNA genômico.

Extração do DNA e amplificação do gene de interesse

Para a extração do DNA genômico da levedura, foi utilizado o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®). Para realizar a amplificação do gene de interesse (Código de acesso no GenBank M84410.1) foi empregada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da β -galactosidase, previamente desenhados (senso 5'- ATG TCT TGC CTT ATT CCT GAG AAT TTA AAG-3' e reverso 5'-TTA TTC AAA AGC GAG ATC AAA CTC AAA G-3'), e a enzima *Pfu* DNA Polimerase. Nesta etapa foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (50, 55 e 58°C) e diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) (0 %, 2,5 %, 5 % e 10 %), com o objetivo de otimizar as reações de amplificação. O resultado da amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2 %. O DNA amplificado foi purificado a partir do gel e quantificado por fluorometria utilizando Qubit 2.0 Fluorometer.

Ligação do fragmento de DNA purificado em vetor de clonagem

O fragmento de DNA purificado foi ligado ao vetor de clonagem pCR®-Blunt. Células de *Escherichia coli* (DH10B) foram transformadas por eletroporação com o DNA de interesse ligado ao vetor de clonagem. As células transformadas foram semeadas em ágar Luria-Bertani (LB) (10 g/L cloreto de sódio, 10 g/L de triptona, 5 g/L extrato de levedura, 16 g/L de ágar) na presença do antibiótico de seleção canamicina (30 μ g/mL). As colônias que cresceram foram inoculadas individualmente em meio líquido LB, na presença de 30 μ g/mL de canamicina, com agitação orbital de 180 rpm, 37°C, por aproximadamente 16 h, após o crescimento

realizou-se o processo de extração do DNA plasmidial, utilizando o kit QIAprep[®] Spin Miniprep.

Sequenciamento parcial dos clones

Os DNAs dos clones contendo o tamanho esperado do gene (aproximadamente 3.500 pb) foram submetidos ao sequenciamento automático utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *M13 reverse* (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3') e *M13 forward* (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'). As sequências foram analisadas utilizando o programa BLAST[®] (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Amplificação para inserção de sítios de enzima de restrição

Para amplificação do gene foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos contendo sítios para as enzimas de restrição *NdeI* (5'-GCA GAA TTC AGG CAT ATG TCT TGC CTT ATT CCT GAG-3') e *XhoI* (5'-CCT TAA GTC CCT CGA GTT ATT CAA AAG CGA GAT CAA AC-3'), em uma PCR com temperatura de anelamento de 60°C, na presença de 2,5% de DMSO, utilizando a enzima *Pfu* DNA polimerase. O resultado da amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2 %. O DNA amplificado foi purificado a partir do gel e quantificado por fluorometria (Qubit 2.0 Fluorometer).

Ligação do fragmento de DNA amplificado em vetor de expressão

O fragmento de DNA amplificado com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para *NdeI* e *XhoI* foi ligado ao DNA do vetor de expressão (pET30a(+)) clivado com as mesmas enzimas. Células de *Escherichia coli* (DH10B) foram transformadas por eletroporação com o DNA de interesse ligado ao vetor de expressão. As células transformadas foram cultivadas em ágar LB, como descrito anteriormente. As colônias que cresceram foram inoculadas individualmente no meio líquido LB, na presença de 30 μ g/mL canamicina, com agitação orbital de 180 rpm, 37°C por aproximadamente 16 h. Realizou-se o processo de extração do DNA plasmidial (contido no vetor), utilizando o kit QIAprep[®] Spin Miniprep.

Sequenciamento do clone

Toda extensão do inserto do clone de interesse foi submetida ao sequenciamento automático utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene (Tabela 1). As sequências foram analisadas utilizando o programa BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos específicos utilizados no sequenciamento automático do clone de interesse.

Nome	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')
T7 Promoter	AAT ACG ACT CAC TAT AGG
T7 Terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
LAC 3	GAC TCT CAG TAT CAG GAT G
LAC 4	GAG CCA TTT AAT CGT CAT AC
LAC 5	CAT CAT GGA TGG TTT GTG
LAC 7	CAA CTG GGG ATA TAC GAG
LAC 8	CAA TAA CCT TCT TAT ACT C
LAC 9	GGG CAT TAA CAT CGT AGA G
LAC 10	GAA ATT GAT GTG ATC ATA AG

Testes de superexpressão da β -galactosidase

Para realizar a superexpressão da β -galactosidase, foram testadas cinco cepas eletrocompetentes de *E. coli*: BL21 (DE3), Rosetta (DE3) e Rosetta-gami (DE3) da Novagen, C41 (DE3) e C43 (DE3) da Lucigen. As células foram transformadas por eletroporação com o DNA da construção pET30a(+): β -galactosidase e cultivadas em ágar LB, contendo o antibiótico de resistência específico para cada cepa recombinante, conforme pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2 - Antibióticos utilizados e suas concentrações de resistência para as cepas e vetor estudado.

Antibiótico	Vetor/Cepas		
	pET30a(+)	Rosetta	Rosetta gami-2
)	(DE3)	(DE3)
Canamicina ($\mu\text{g/mL}$)	30		
Cloranfenicol ($\mu\text{g/mL}$)		34	34
Tetraciclina ($\mu\text{g/mL}$)			12,5
Estreptomicina ($\mu\text{g/mL}$)			50

Para os testes de expressão da β -galactosidase foram testadas diferentes condições de cultivo (meio de cultura e temperatura) para as cepas estudadas, conforme apresentado na Tabela 3. Todos os cultivos foram realizados em 50 mL de meio de cultura e a indução da expressão da β -galactosidase, com isopropil-tiogalactosídeo (IPTG), foi realizada nas concentrações de 0,05 mM e 1 mM, na densidade óptica (OD) entre 0,4 e 0,6 (600 nm). Foram realizadas coletas de amostras de 1 mL nos tempos 3 h, 6 h, 9 h, 24 h e 27 h após o momento da indução.

Para todos os cultivos foram realizados controles (células transformadas com o vetor sem o inserto, induzidas e não induzidas, e transformadas com o vetor contendo o inserto, não induzidas), onde as células foram cultivadas nas mesmas condições testadas, concomitantemente. Todos os cultivos foram realizados em agitador orbital (*shaker*), com velocidade de agitação de 180 rpm.

Após cada coleta as células foram centrifugadas (5.000 rpm, 1 minuto) e congeladas. Para as análises, foram ressuspendidas em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, rompidas por ultrassom em sonicador (três pulsos de 10 segundos) e centrifugadas (4°C, 13.000 rpm, 30 minutos). As frações foram separadas em solúveis (sobrenadante) e insolúveis (sedimentado) e esta última foi ressuspendida no mesmo tampão.

Tabela 3 - Condições de cultivo, cepas utilizadas nos testes de expressão da enzima e atividades específicas máximas obtidas.

Cultivo	Cepa recombinante	Meio de cultivo	Temperatura (°C)	Atividade específica máxima (U/mg _{proteína})
1	BL21(DE3)			ND
2	Rosetta(DE3)			ND
3	Rosetta-gami 2 (DE3)	LB	37°C	ND
4	C41 (DE3)			ND
5	C43 (DE3)			ND
6	C41 (DE3)			ND
7	Rosetta(DE3)	LB		87,04 (27 h)
8	BL21 (DE3)			247,62 (9 h)
9	Rosetta(DE3)		30°C	60,66 (9 h)
10	BL21 (DE3)	M9		85,54 (9 h)
11	Rosetta(DE3)			59,20 (9 h)
12	BL21 (DE3)	TB		40,39 (27 h)

¹LB: triptona: 10 g/L, extrato de levedura: 5 g/L, NaCl: 10 g/L. ²M9: NaCl: 0,5 g/L, NH₄Cl: 1 g/L, extrato de levedura: 20 g/L, Na₂HPO₄: 6 g/L, KH₂PO₄: 3 g/L, glicose: 500 g/L, MgSO₄: 0,1 g/L, tiamina: 1 g/L, solução traço (FeSO₄: 2,8 g/L, MnCl₂: 2 g/L, CaCl₂: 2 g/L, CuCl₂: 0,26 g/L, ZnSO₄: 0,3 g/L): 1 mL/L. ³TB: triptona: 12 g/L, extrato de levedura: 24 g/L, K₂HPO₄: 12,5 g/L, KH₂PO₄: 2,3 g/L, glicerol 4 mL/L). **ND**: Não determinado.

Métodos analíticos

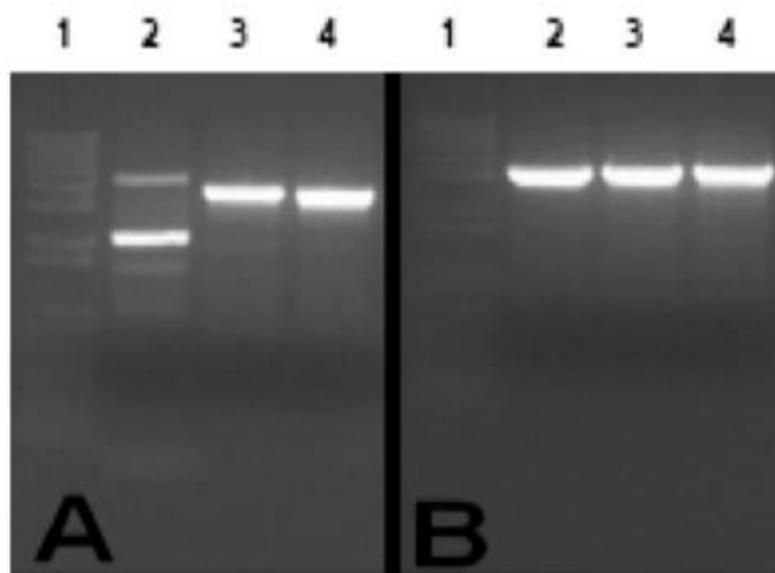
A densidade óptica dos cultivos foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm. A expressão da β -galactosidase foi analisada nas frações solúveis e insolúveis, por meio de SDS-PAGE (12%), utilizando *Comassie Brilliant Blue* como corante e o marcador de peso molecular Page Ruler (ThermoScientific). A quantificação da proteína intracelular foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o kit *Bradford Protein Assay* (BioRad). A atividade enzimática foi determinada segundo a metodologia proposta por RECH *et al.* (1999), com modificações, utilizando o-nitrofenol- β -D-galactopiranoside (ONPG) como substrato. O volume de 100 μ L do extrato enzimático (fração solúvel) foi misturado a 1 mL da solução de substrato ONPG 13

mM e incubado a 37°C por 1 min em banho-maria, ao final a reação foi parada adicionando-se 200 μ L de carbonato de sódio 1 M. O produto da reação foi medido em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ONP (o-nitrofenol) por minuto, nas condições de análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados das reações de amplificação do gene da β -galactosidase, a partir do DNA genômico de *Kluyveromyces* sp., utilizando diferentes temperaturas de anelamento e diferentes concentrações de DMSO.

Figura 1 - Resultado da amplificação do gene (Código de acesso no GenBank M84410.1) visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2 %. A: diferentes temperaturas testadas (1: Marcador 1 Kb (kilo base) Plus; 2: 50°C; 3: 55°C; 4: 58°C). B: diferentes concentrações de DMSO a 58°C de anelamento (1: Marcador 1 Kb Plus; 2: 2,5%; 3: 5%; 4: 10%).

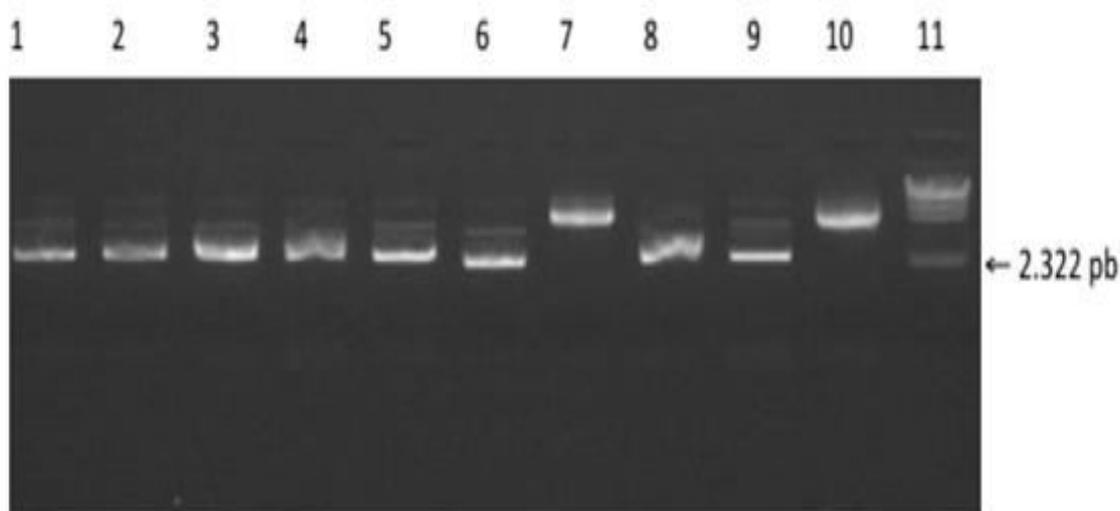


A temperatura de anelamento à 58°C foi utilizada para testar o efeito das diferentes concentrações de DMSO. O uso deste composto melhorou as reações de amplificação, visto que otimiza as reações de PCR, auxiliando na desnaturação da estrutura secundária do DNA (FRACKMAN *et al.*, 1998). A variação da concentração de DMSO não demonstrou nenhum efeito, sendo assim, optamos pelo uso da menor

concentração do composto. Na ausência de DMSO não foi possível amplificar o gene de interesse. O DNA amplificado foi purificado do gel de agarose e quantificado. A concentração de DNA obtida foi de 35,5 $\mu\text{g/mL}$.

O fragmento de DNA purificado foi ligado ao vetor de clonagem e inserido em células eletrocompetentes de *E. coli*, que foram cultivadas em meio de cultura. Após 16 h, 10 colônias de células recombinantes foram obtidas. Cada uma dessas colônias foi inoculada separadamente em meio líquido LB com o(s) antibiótico(s) específico(s). O DNA plasmidial destas células foi extraído e analisado por eletroforese em gel de agarose, o resultado da análise do DNA plasmidial dos clones obtidos pode ser visualizada na Figura 2.

Figura 2 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1,2 % do DNA plasmidial dos clones obtidos. 1 a 10: DNA plasmidial dos clones 1 a 10, respectivamente; 11: Marcador Lambda DNA/*Hind*III.



Os clones 3, 7 e 10 foram submetidos ao sequenciamento das extremidades do inserto. Os resultados do sequenciamento mostraram que o gene da β -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. estava presente nos clones 7 e 10. A partir do DNA destes dois clones foram realizadas novas amplificações com oligonucleotídeos específicos contendo os sítios de restrição *Nde*I e *Xho*I para posterior subclonagem. As reações de PCR foram realizadas na presença de 2,5 % de DMSO e temperatura de anelamento de 58°C. O DNA amplificado foi purificado a partir do gel de agarose, clivado com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I e clonado no vetor de expressão pET30a(+), clivado com as mesmas enzimas.

Um dos clones obtidos foi quantificado e submetido ao sequenciamento das fitas complementares utilizando oligonucleotídeos internos específicos para o gene. A sequência gênica mostrou 99% de similaridade com o gene da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Com o resultado do sequenciamento, seguiu-se para os testes de superexpressão da enzima recombinante em diferentes cepas de *E. coli*.

Os resultados das atividades específicas da β -galactosidase para as cepas recombinantes estudadas e condições de cultivo estão apresentados na Tabela 2. Verificou-se que na temperatura de 37°C não ocorreu a expressão da enzima na fração solúvel, apenas nas frações insolúveis (resultados não mostrados), a atividade da mesma não foi determinada. A produção de algumas proteínas se dá na fração insolúvel, expressas em corpos de inclusão (LEE, 1996). Esta forma de expressão pode representar um obstáculo para a produção eficiente em proteínas recombinantes (ST JOHN *et al.*, 1999).

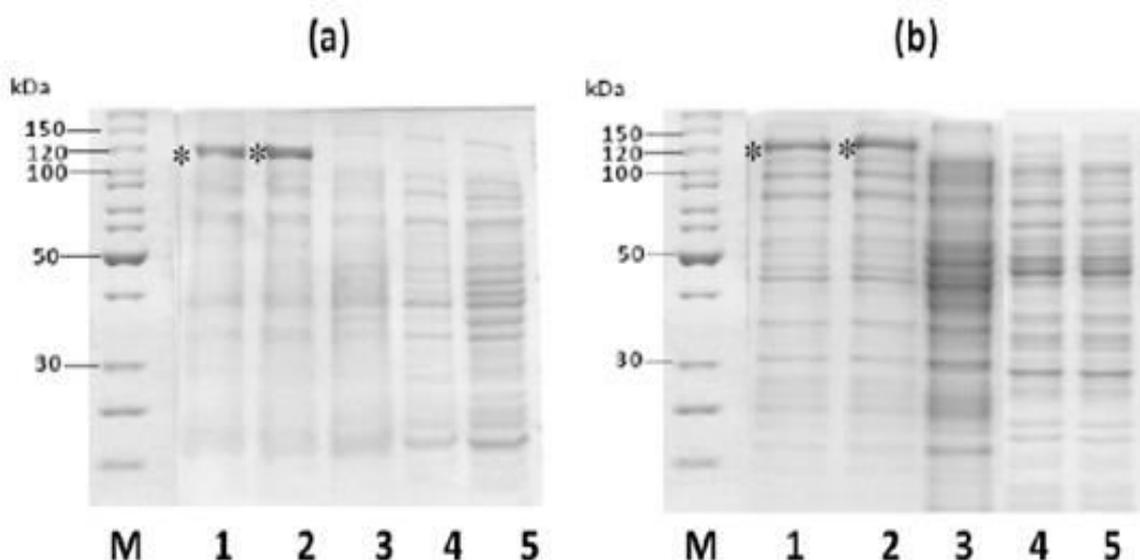
Verificou-se que a cepa recombinante Rosetta-gami 2 (DE3) não apresentou expressão da β -galactosidase na condição testada (meio de cultivo LB e 37°C), em ambas as frações (solúvel e insolúvel). Nestas condições, a cepa recombinante C41 (DE3) apresentou pouca expressão, semelhante à obtida pela cepa C43 (DE3). Frente a estes resultados as cepas recombinantes Rosetta (DE3), BL21 (DE3) e C41 (DE3) foram escolhidas para realização de testes à 30°C. A cepa C41 (DE3) continuou expressando a β -galactosidase somente na fração insolúvel. Porém as demais cepas recombinantes (Rosetta (DE3) e BL21 (DE3)), expressaram a enzima nas frações solúveis. A maior atividade específica, aproximadamente 250 U/mg_{proteína}, foi obtida pela cepa recombinante BL21 (DE3), em meio de cultivo LB, à 30°C, após 9 horas de indução com 0,05 mM de IPTG. Em trabalhos prévios do nosso grupo, foram encontradas atividades específicas máximas de aproximadamente 0,50 U/mg_{proteína}, utilizando a enzima produzida por diferentes cepas de *Kluyveromyces* selvagens (não recombinante). Logo, foi possível verificar a superexpressão da enzima na forma recombinante.

O trabalho de Dagbagli e Goksungur (2008), também apresenta a produção da β -galactosidase por uma cepa selvagem de *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces lactis*), onde a atividade específica máxima obtida foi de 37 U/mg_{proteína}, utilizando lactose, extrato de levedura, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄, MgSO₄ e KH₂PO₄, como meio de cultivo e temperatura de 30°C.

No estudo de Cieslinski *et al.* (2005) foi relatada a expressão da β -galactosidase de *Pseudoalteromonas* sp. 22B em *E. coli* ER2566, os cultivos foram realizados em meio de cultivo LB, usando ampicilina como antibiótico, à 30°C, usando IPTG como indutor, a atividade específica obtida foi de 4,0 U/mg_{proteína}, quantidade inferior às encontradas nos nossos estudos.

A Figura 3 apresenta os testes de expressão para as cepas recombinantes previamente selecionadas, Rosetta (DE3) e BL21 (DE3), na condição que levou aos maiores valores de atividade enzimática específica (meio de cultivo LB e 30°C). Aparentemente, a β -galactosidase expressa tem o tamanho de aproximadamente 120 kDa.

Figura 3 - Análise da expressão solúvel da β -galactosidase em meio de cultivo LB à 30°C, por meio de SDS-PAGE (12 %). (a) Rosetta (DE3). (b) BL21 (DE3). M: Marcador de peso molecular (Page Ruler); 1: Expressão pelas células transformadas com o vetor contendo o inserto, com indução (IPTG 1 mM); 2: Expressão pelas células transformadas com o vetor contendo o inserto, com indução (IPTG 0,05 mM); 3: Expressão pelas células transformadas com o vetor contendo o inserto, sem indução; 4: Expressão pelas células transformadas com o vetor sem o inserto, com indução (IPTG 1 mM); 5: Expressão pelas células transformadas com o vetor sem o inserto, sem indução.



Segundo Pereira-Rodríguez *et al.* (2012), esta enzima forma homooligômeros com quatro subunidades, cada cadeia polipeptídica tem massa molecular de 119 kDa. O trabalho de BECERRA *et al.* (1998) demonstrou que a β -

galactosidase de *K. lactis* é composta por monômeros com peso molecular de 124 kDa, apresentando atividade tanto na forma de dímeros como de tetrâmeros.

Verifica-se ainda que a enzima foi expressa independente da concentração de indutor utilizada, porém a atividade máxima foi obtida com 0,05 mM de IPTG, para ambas as cepas. KIM *et al.* (2003) estudaram o efeito da concentração de IPTG na expressão da enzima solúvel e verificaram que a baixa concentração deste indutor (0,05 mM), levou a maior expressão da enzima na fração solúvel.

CONCLUSÕES

Neste trabalho verificou-se a grande influência dos meios de cultivo e de diferentes cepas de *E. coli* na expressão e atividade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. em *E. coli* recombinante, sendo possível a superexpressão da enzima. Os resultados vêm ao encontro do desenvolvimento de tecnologias que visem o desenvolvimento e redução de custos na obtenção de enzimas alimentícias, sendo importantes para as aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. **Recombinant organisms for production of industrial products.** *Bioeng Bugs*, v. 1, p. 116–131, 2010.
- ANSARI, S. A.; SATAR, R. **Recombinant β -galactosidases- Past, present and future: a mini review.** *J Mol Cat B: Enz*, v. 81, p. 1-6, 2012.
- BECERRA, M.; CERDÁN, E.; SISO, M. I. G. **Micro-scale purification of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active.** *Biotech Tech*, v. 12, p. 253-256, 1998.
- BELÉM, M. A. F.; LEE, B.H. **Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative.** *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 38, p. 598-656, 1998.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical biochemistry*, v. 72(1-2), p. 248-254, 1976.
- CIESLINSKI, H.; KUR, J.; BIALKOWSKA, A.; BARAN, I.; MAKOWSKI, K.; TURKIEWICZ, M. **Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-**

adapted β -galactosidase from antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b. *Protein Expression and Purification*, v. 39: 27-34, 2005.

DAGBAGLI, S.; GOKSUNGUR, Y. Optimization of β - galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y- 8279 by response surface methodology. *Electronic J of Biotechnol*, v. 11, n. 4, 2008.

FRACKMAN, S.; KOBBS, G.; SIMPSON, D.; STORTS, D. Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes*, p. 27, 1998.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Biochem Eng J*, v. 58-59, p. 33-38, 2011.

GUO, Y. Y.; YU, X. W.; XU, Y. Cloning, expression and characterization of two thermostable esterases from *Aquifex aeolicus* VF5, *J Mol Catal B: Enz* (2017) [Online] Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.01.008>. Acesso em: 3 set, 2017.

HUSAIN, Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Crit Rev Biotechnol*, v. 30, p. 41-62. 2010.

KLEIN, M. P.; JONG, E. V.; RÉVILLION, J. P. P. Utilização da β -galactosidase para prevenção da cristalização em doce de leite. *Ciênc Agrotec*, v. 34, p. 1530-1535, 2010.

KIM, C. S.; JI, E. S.; OH, D. K. Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotech Lett*, v. 25, p. 1769-1774, 2003.

LEE, S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotech.*, v. 3: 98-105, 1996.

LULE, V. K.; GARG, S.; TOMAR, S. K.; KHEDKAR, C. D.; NALAGE, D. N. Food intolerance: lactose intolerance. *Encyclopedia of food and health*, p. 43-48, 2016.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudanças de paradigmas com a biologia molecular. *Rev Assoc Med Bras*, v. 56, p. 230-236, 2010.

MISSELWITZ, B.; POHL, D.; FRÜHAUF, H.; FRIED, M.; VAVRICKA, S. R.; Fox, M. Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. *United European Gastroenterol. J.*, v. 1, p. 151-159, 2013.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enz Res*, v. 2010, p. 16, 2010.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ-LEIRO, R.; GONZÁLEZ-SISO, M. I.; CERDÁN, M. E.; BECERRA, M.; SANZ-APARICIO, J. Structural basis of specific

in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *J Struc Biol*, v. 177, p. 392-401, 2012.

RABERT, C.; WEINACKER, D.; PESSOA, A. JR.; FARÍAS, J. G. **Recombinants proteins for industrial uses**: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Braz J Microbiol*, v. 44, p. 351–356, 2013.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A.; AYUB, M. A. Z. **Utilization of protein hydrolyzed cheese-whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus***. *J Ind Microbiol and Biotech*, v. 23, p. 91-96, 1999.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges**. *Front Microbiol*, v. 5, 2014.

SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U. **The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: global perspectives in evolutionary and historical backgrounds**. *Nutrients*, v.7, p. 7312–7331, 2015.

VASILEVA, N.; IOTOVA, V.; IVANOV, Y.; GODJEVARGOVA, T.; KOTIA, N. **Immobilization of β -galactosidase on modified polypropylene membranes**. *Int J Biol Mac*, v. 51, p. 710-719, 2012.

ST JOHN, R. J.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. **High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 13029- 13033, 1999.

SU L.; JIANG Q.; WU J. 2017. **Enhanced extracellular production of recombinant proteins in *Escherichia coli* by co-expression with *Bacillus cereus* phospholipase C**. *Microb Cell Fact*, v. 16, 2017.

SUCHY, F.J.; BRANNON, P.M.; CARPENTER, T.O.; Fernandez, J.R.; Gilsanz, V.; Gould, J.B.; Hall, K.; Hui, S.L.; Lupton, J.; Mennella, J.; *et al.* NIH Consensus **Development Conference Statement: Lactose Intolerance and Health**. *NIH Consens State Sci Statements*, v. 27, p. 1-27, 2010.

ZOU, S.; HE, X.; LIU, Y.; CHEN, D.; LUO, Y.; HUANG, K., ZHANG, W.; XU, W. **Toxicological evaluation of lactase derived from recombinant *Pichia pastoris***. *PLoS One*, v. 9, p. e106470, 2014.