CLONAGEM E EXPRESSÃO DA β-GLICOSIDASE EM PARTÍCULAS DE FAGO.

Karolayne Albino Galindo[1], Leonardo Antonio Fernandes[2], Maria de Lourdes Borba Magalhães[3]

[1] Acadêmica do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária – CAV – bolsista PIBIC/CNPq.
[2]Acadêmico do curso de Medicina Veterinária – CAV – bolsista PIBIC/CNPq.
[3]Orientadora, professora do Departamento de Produção Animal e Alimentos –CAV- maria.magalhaes@udesc.br

Palavras-chave: Cana de açúcar. Phage Display. Bioetanol.

O etanol de primeira geração é o principal processo para produção de bioetanol de segunda geração, que é formado a partir do tratamento químico e enzimático da biomassa lignocelulósica, fonte de matéria prima para a produção do etanol. O bioetanol vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. O processo ocorre devido a utilização da sacarose presente na cana de açúcar como matéria-prima para o processo de fermentação. Durante a produção de bioetanol de primeira geração, ocorre a produção de uma quantidade significativa de resíduos lignocelulósicos provenientes do bagaço da cana, os quais acabam muitas vezes não sendo reaproveitados. Mas, a celulose deste material necessita ser convertida em glicose e a partir da fermentação da glicose, a produção de etanol pode ser realizada. Para o tratamento deste material lignocelulósicos, e posteriormente sua conversão em glicose, é necessário o uso de enzimas glicosidases que possuem como função hidrolisar as ligações químicas entre os polímeros de glicose. Para a viabilidade econômica da hidrolise enzimática de celulose é necessário o desenvolvimento de métodos de alta eficiência e custo reduzido para produção enzimática. A Beta-Glicosidase A (BGLA) é a enzima responsável por hidrolisar ligações β-1,4 da celulose, liberando assim dois monômeros de glicose. Nesse sentido a utilização do bagaço da cana como biocombustível, a biomassa lignocelulósica surge como matéria-prima renovável, abundante e de baixo custo para este processo de conversão, o qual tem por objetivo a produção de açúcares fermentáveis para que se consiga a obtenção de etanol. Mas a maior dificuldade, é em virtude de que o uso de enzimas livres pode-se tornar um processo de alto custo para obtenção do etanol de segunda geração, pois necessita-se de uma grandiosa quantidade de enzimas e muitas ainda acabam sendo perdidas durante o tratamento da celulose. Visto isso, o projeto visa a expressão desta enzima, BGLA, usando a técnica de Phage Display de peptídeos. Esta técnica utiliza bacteriófagos (vírus que infectam bactérias) modificados por biologia molecular, de tal forma que cada partícula viral apresenta uma proteína exógena na sua superfície, ou seja, a BGLA seria expressa na superfície de uma partícula viral. Dessa forma, a enzima pode ser produzida em bactérias e secretadas para o meio reduzindo os custos de maneira eficiente, pois a célula bacteriana seria responsável por externalizar a enzima ligada a partícula viral, não sendo necessário submeter o conteúdo bacteriano aos diferentes processos de purificação de proteínas.

Primeiramente, o gene da BGLA foi amplificado por uma reação em cadeia da polimerase (PCR). Em seguida, o gene *foi* purificado e então submetido a uma reação de ligação em um vetor de clonagem pGEM T-easy. A ligação foi, então, transformada em *Escherichia coli* DH10B com o intuito de selecionar as colônias que apresentassem o gene clonado. A transformação foi

plaqueada em meio LB ágar contendo ampicilina, XGAL (beta-galactose) e IPTG (indutor de expressão). Escolhida uma colônia, esta foi submetida a uma reação de PCR para confirmar a presença do gene da BGLA. Com isto confirmado, a colônia foi crescida em meio LB líquido com ampicilina. O crescimento foi através da centrifugação por 30 min a 10.000 rpm e então foi extraído o DNA plasmidial do pellet. Com o DNA purificado, foi realizado uma reação de digestão do vetor de clonagem com o gene da BGLA (pGEM::BGLA) com duas enzimas de restrição, SALI E HINDIII, por 12h a 37ºC para liberar o gene do vetor de clonagem.

O gene da BGLA foi devidamente clonado em plasmídeo de clonagem pGEM T easy.

Reações de PCR confirmaram a presença do gene no vetor de expressão.

A reação de digestão com as enzimas de restrição Sal I e Hind II não está sendo bem sucedida. Os possíveis fatores que podem estar causando este resultado sejam baixa qualidade do DNA analisado. Novos testes serão feitos modificando-se o kit de extração e purificação do DNA plasmidial para nova tentativa de digestão