

## CLONAGEM E EXPRESSÃO DA $\beta$ -GLICOSIDASE EM PARTÍCULAS DE FAGO

Wanessa da Costa Guimarães<sup>2</sup>, Maria de Lurdes Borba Magalhães<sup>3</sup>,

<sup>2</sup>Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PROBIC/UDESC.

<sup>3</sup>Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV – maria.magalhaes@udesc.br

Ocorre grande produção de resíduos lignocelulósicos resultante do bagaço da cana durante a produção de bioetanol de primeira geração. A utilização como matéria-prima desses resíduos lignocelulósicos para produção de etanol é um processo conhecido como etanol de segunda geração. Entretanto, a celulose presente nesse produto precisa ser convertida em glicose e após a fermentação da glicose, pode ser realizada a produção do etanol. No tratamento da matéria-prima são necessárias enzimas glicosidases que tem como função a hidrólise de ligações químicas dos polímeros de glicose.

A  $\beta$ -glicosidase A (BGLA) é uma das enzimas responsáveis pela conversão de celobiose em glicose, a última etapa da via enzimática. Para que seja viável economicamente essa hidrólise enzimática da celulose é necessário o desenvolvimento de métodos eficientes e de baixo custo para a produção da enzima. Com a intenção de diminuir esses custos de produção da BGLA, é utilizada uma técnica com bacteriófagos modificados por biologia molecular conhecida como Phage Display e funciona de forma que cada partícula viral é capaz de expressar a enzima desejada em sua superfície. Sendo assim, a enzima produzida é expressa pelas células bacterianas e sem necessidade de submeter o conteúdo bacteriano a processos de purificação de proteínas, o que diminui o custo de produção. O objetivo do projeto é a produção bacteriana de BGLA em superfície viral para uso industrial na produção de etanol de segunda geração.

Foi aplicada uma reação de amplificação no gene da  $\beta$ -glicosidase por PCR e posteriormente o gene passou por uma purificação e foi submetido a uma reação de ligação em vetor de clonagem pGEM-T Easy. Essa ligação foi transformada em *E. coli* com o propósito de selecionar as colônias apresentando o gene clonado. Essas bactérias selecionadas foram semeadas em placas em meio Luria Bertani (LB) contendo ampicilina,  $\beta$ -galactose (XGAL) e indutor de expressão (IPTG). A colônia selecionada foi submetida a uma reação de PCR para confirmar a presença do gene da BGLA e com a confirmação, a colônia foi semeada em meio LB líquido com ampicilina. Centrifugou-se esse crescimento por 30 minutos a 10.000 rpm e extraído o DNA plasmidial. Após a centrifugação, uma reação de digestão do vetor de clonagem com o gene da BGLA foi realizada com duas enzimas de restrição, SAL I e HIND III, para liberar o fragmento do gene do vetor de clonagem. Esse gene liberado foi submetido a reação de ligação com um vetor viral (fagomídeo) e depois digerido com as mesmas enzimas de restrição para torná-lo linear. O DNA digerido foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%. As bandas de DNA foram excisadas, purificadas e os fragmentos resultantes submetidos a reação de ligação para serem transformados em *E. coli*.

Como resultado, almeja-se que a BGLA seja expressa no fago e permaneça ativa e desempenhando sua atividade enzimática e devido a imobilização em partícula viral, o esperado é que sua atividade tenha uma velocidade reduzida.

**Palavras-chave:** Bioetanol. Phage Display. BGLA.