



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

XI Seminário de Extensão e Inovação  
XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica  
08 a 12 de Novembro - Guarapuava/PR



## Construção de um Plasmídeo Para Superexpressão de Lactase

### Plasmid Construction for Lactase Overexpression

**João Pedro Valczara Prestes**

[joao.pedro.vp@hotmail.com](mailto:joao.pedro.vp@hotmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

**Juliana Vitória Messias Bittencourt**

[julianavitoria@utfpr.edu.br](mailto:julianavitoria@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

**Shelen Ponchielli Thomaz**

[shelent34@gmail.com](mailto:shelent34@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

**Mariana Machado Fidelis do Nascimento**

[marifideliss@gmail.com](mailto:marifideliss@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

#### RESUMO

A lactose é um carboidrato encontrado no leite e seus derivados, enquanto a enzima lactase age realizando sua hidrólise. A produção da lactase possui grande aplicação nas áreas de indústria, em especial as de alimentos e farmacêutica. Baseado nisso, para esse trabalho utilizaram-se algumas técnicas de biologia sintética e biologia molecular, as quais define-se como a intersecção de diversas áreas do conhecimento visando a construção de novos elementos biológicos, podendo inclusive envolver o design de sistemas biológicos inteiros. O presente trabalho tem o objetivo de desenvolver um plasmídeo para a superexpressão da enzima lactase em uma bactéria *Escherichia coli* integralmente *in silico*. Para esse desenvolvimento foram utilizados o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), o site Brenda como o suporte de escolha da enzima, pois possui os repositórios e informações enzimáticas mais abrangentes, e a plataforma de pesquisa e desenvolvimento unificada, chamada *Benchling*, para realização da montagem.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biologia sintética. Construção de plasmídeo. Enzima Lactase.



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um  
mundo em transformação

XI Seminário de Extensão e Inovação  
XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica  
08 a 12 de Novembro - Guarapuava/PR



## ABSTRACT

Lactose is a carbohydrate found in milk and its derivatives, while the lactase enzyme acts by hydrolysis. The production of lactase has wide application in the areas of industry, especially food and pharmaceuticals. Based on this, for this work some synthetic biology and molecular biology techniques were used, which are defined as the intersection of different areas of knowledge aiming at the construction of new biological elements, which may even involve the design of entire biological systems. The present work aims to develop a plasmid for the overexpression of the lactase enzyme in an *Escherichia coli* bacterium entirely in silico. For the development, was used the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Brenda website as the support of choice for the enzyme, as it has the most comprehensive repositories and enzymatic information, and the unified research and development platform, called Benchling, to carry out the assembly.

**KEYWORDS:** Synthetic biology. Plasmid construction. Enzima Lactase.



## DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

As enzimas são proteínas que possuem atividade catalítica, e devido a esta característica são responsáveis por realizar reações bioquímicas de maneira rápida e eficiente, de modo a serem indispensáveis na manutenção dos seres vivos. São consideradas a chave da biotecnologia, pois conseguem realizar reações limpas de síntese ou degradação, isto é, gastando o mínimo de energia e gerando o menor impacto ambiental possível. (LEHNINGER, 2014).

A lactose é um carboidrato encontrado no leite e seus derivados, é formado por dois monossacarídeos que se ligam de maneira covalente por uma ligação O-glicosídica, a enzima lactase age realizando a hidrólise de resíduos terminais não redutores de beta-D-galactose em beta-D-galactosídeos (SEDDIGH et al., 2014). Porém, os seres humanos são geneticamente programados para diminuir a síntese desta enzima, contudo os mecanismos genéticos que resultam nesta queda não estão bem elucidados, resultando em hipolactasia, a qual é uma condição autossômica recessiva comum (WANG et al., 1998; OLIVIER et al., 2012).

A produção da enzima lactase pode ser vista como sendo de grande impacto na sociedade tanto no âmbito da saúde quanto no econômico, pois os que sofrem dessa condição devem realizar a suplementação de lactase ou realizar restrições alimentares. Conforme o inventor Hirohara H. et al. (1984) A imobilização da enzima lactase a partir de *Aspergillus oryzae* já é algo real, simples e eficiente de ser realizado.

Os microrganismos são de grande importância comercial, o isolamento e identificação de novas linhagens microbianas produtores de enzimas envolve diversas fontes (RIBEIRO, 2018). Essa produção é possível com o avanço da tecnologia do DNA recombinante onde é possível conseguir organismos com novas características, inclusive as que normalmente não são encontradas na natureza, alcançando com o melhoramento genético novas linhagens com valores biotecnológicos (LIMA, 2001). Uma das maiores dificuldades encontradas para produção de enzimas a partir de microrganismos é a escolha do microrganismo que será o produtor e sua complexidade gênica, para modificar um microrganismo é de grande importância compreender todas as etapas.

Com a intenção de melhorar a produção dessa enzima, através de uma biossíntese de alto rendimento e baixo custo, desenhou-se um plasmídeo para superexpressão de lactase em uma *E. coli* K-12 MG1655. Essa linhagem identificada por Wu et al. (2003), possui nocaute nos genes de virulência, responsáveis pela enterotoxigenidade. O genoma desta linhagem foi sequenciado primeiramente por Blattner et al. (1997), o que possibilitou a posterior identificação e caracterização do gene *lacZ* responsável pela biossíntese da lactase, presente naturalmente no microorganismo. Todavia este é controlado por um operador, chamado operon *lac*, que só permite sua expressão quando existe escassez de outras fontes de carbono e presença de lactose (KUHLMAN et al., 2007), impossibilitando assim o acúmulo da enzima.

## OBJETIVOS DA INVENÇÃO

O objetivo deste trabalho é realizar *in silico* uma construção plasmidial otimizada com base no genoma da bactéria *E. coli* K-12 MG1655, para super expressar a sua produção da enzima lactase. A produção *in silico* é o primeiro passo do projeto, depois dessa etapa há os experimentos *in vitro*, para então partir para o desenvolvimento industrial.

## VANTAGENS DA INVENÇÃO

A partir do final do Século XX, houve aumento da conscientização ecológica, isso tornou claro que nas próximas décadas o desafio mundial será conquistar o equilíbrio das grandes produções industriais com a sustentabilidade, crescimento econômico e igualdade social, já sabemos que os microrganismos são de grande importância ambiental e sua utilização na produção de enzimas auxilia a gerar menos resíduos que a utilização de produtos químicos, sendo assim, essa produção passou a ser vista como uma ferramenta auxiliar para enfrentar os novos desafios (ROCHA, 2010; ESTRELA, 2019).



Em alimentos a lactose está mais presente na produção de iogurtes e queijos além de outros alimentos não lácteos, como algumas sopas e bebidas. A indústria de alimentos é a que mais aponta a demanda por enzimas no mundo. (GARG et al., 2016). Já na indústria farmacêutica é comumente usada nas formulações como excipiente em medicamentos voltados a má digestão da lactose (ORDÓÑEZ, 2005).

Para a produção *In silico* é necessário a utilização de simulações tecnológicas, dessa forma o desenvolvimento da biologia computacional tem sido de grande auxílio na criação para traçar o desenvolvimento do experimento, onde podemos encontrar também a melhor forma de análise dos resultados finais quanto a produção inicial. Para se pesquisar e desenvolver produtos *in silico* de atividades antimicrobianas de peptídeos de cadeia curta pode ser utilizado ferramentas de bioinformática, que considera a estrutura primária de uma proteína-origem (UDENIGWE, 2014).

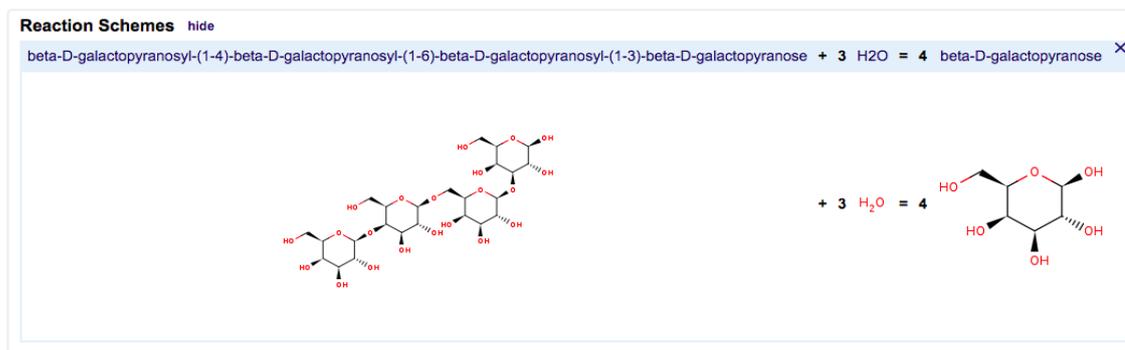
Ao iniciar-se um experimento *in vitro*, com processos biológicos, no ambiente laboratorial é de extrema importância que tudo ocorra de forma segura com a menor interferência ambiental, desse modo, utiliza-se às condições rigidamente ajustadas possibilitando assim maior controle e efetividade das etapas. Após o estabelecimento bem-sucedido da cultura *in vitro*, sem contaminação por microrganismos, as fases seguintes consistem na multiplicação do produto desejado.

Para visualizar as moléculas de plasmídeo (por exemplo, para avaliar o tamanho do plasmídeo), vários métodos podem ser aplicados como amplificação por PCR, digestão enzimática de moléculas de plasmídeo por endonucleases de DNA que clivam ou cortam uma fita de DNA e posterior análise de eletroforese em gel de agarose (Summers, D. K., et al. 1993; WEIN, T. et al. 2019). Para o método de identificação dos pares de bases será utilizado a simulação de corrida de agarose do programa Benchling, dessas formas também poderá ser utilizado para avaliação de futuros resultados na produção *in vitro* avaliando também os custos em comparação a produção por outras fontes.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Todo o trabalho foi desenvolvido *in silico* utilizando softwares para design de genes, bancos de dados digitais e conceitos de biologia sintética. Iniciou-se realizando uma busca na literatura de modo a entender os mecanismos de ação da enzima, bem como o processo bioquímico de degradação da lactose, ainda se realizou a busca na plataforma Brenda para visualizar a reação.

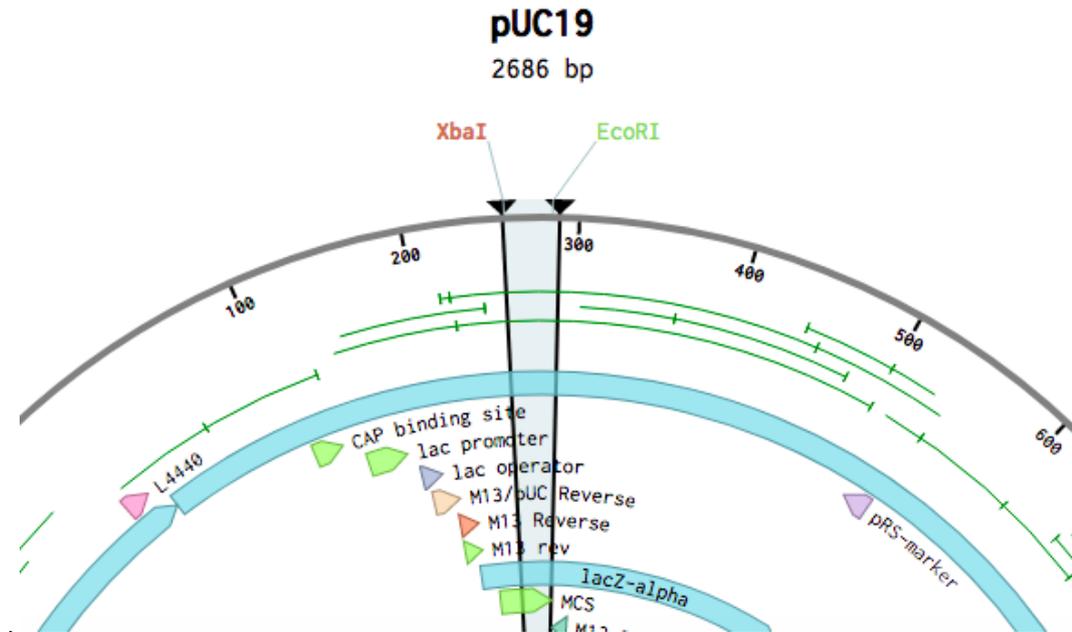
Figura 1: Catálise enzimática da lactose pela lactase.



Fonte: Brenda (2021)

Após, iniciou-se a pesquisa pelo gene que houvesse maior semelhança com o *Codon usage* do organismo para que não houvesse a necessidade em realizar uma forte alteração dos códons no momento da otimização, pois ao realizá-la pode-se formar homopolímeros e estes causarem, através de recombinação homóloga, a deleção do gene inserido (Hao et al., 2012). Iniciou-se a busca pela sequência na plataforma National Center for Biotechnology Information (NCBI), aonde utilizou-se a ferramenta BLAST (Basic Local

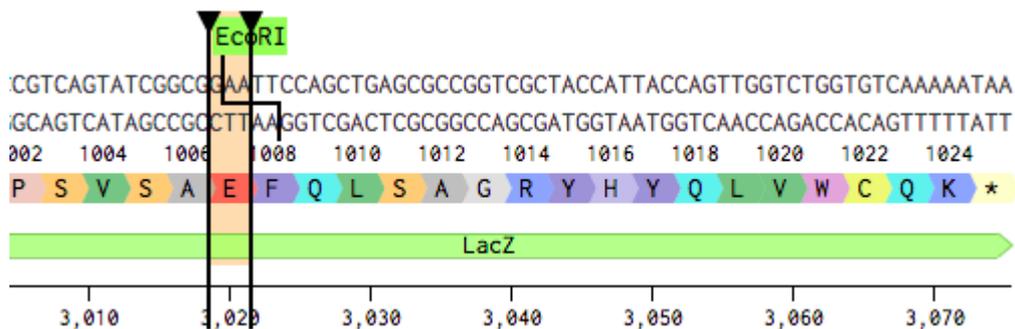




Fonte: Autoria própria (2021).

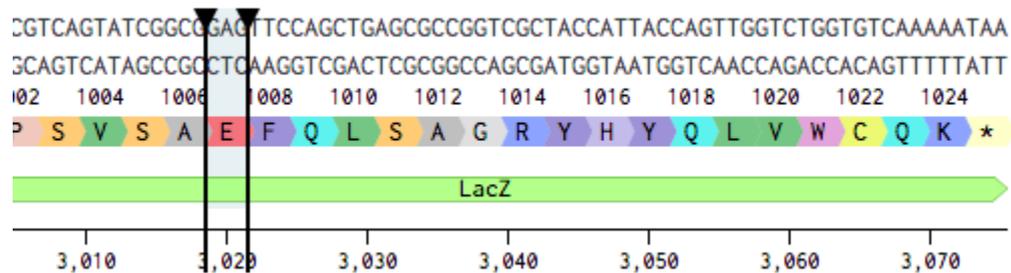
Após definir a região de inserção realizou-se uma busca dentro da região de codificação (CDS), por regiões afetadas pelas enzimas de restrição selecionadas. Verificou-se a presença de um sítio de restrição EcoRI, para removê-lo utilizou-se a plataforma Benchling, onde realizou-se a troca de códon que codifica o aminoácido glutamato, que inicialmente se dava por GAA e após a alteração foi codificado pela sequência nucleotídica GAG.

Figura 4: Sítio de restrição inicialmente presente no CDS (GAA).



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 5: CDS utilizado sem sítio de restrição EcoRI (GAG).



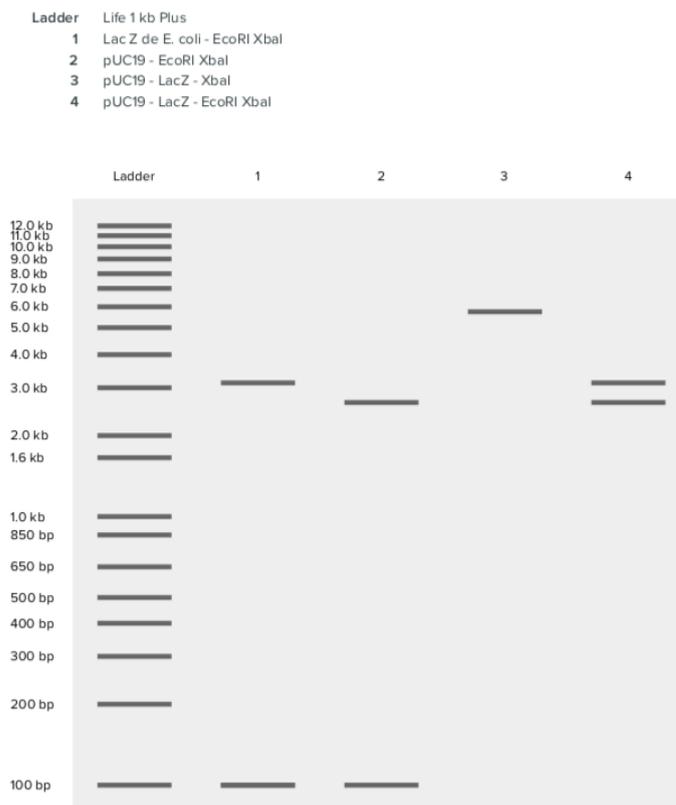
Fonte: Autoria própria (2021).

O método de montagem utilizado foi o de digestão e ligação, devido ao baixo custo, simplicidade e efetividade da técnica. Esta consiste na utilização de enzimas de restrição que clivam o DNA em pontos específicos fazendo a leitura das sequências nucleotídicas que o compõem, e posterior ligação por meio da enzima DNA-ligase, a qual une o grupo fosfato da extremidade 5' e a hidroxila da extremidade 3' do DNA (FRANCISCO et al., 2020).

A construção começou após análise e seleção das enzimas de restrição e do plasmídeo parental, como o sentido da leitura no local do inserto se dá em forward adicionou-se no início da sequência codificadora o sítio de restrição XbaI e ao final o sítio EcoRI, para que assim a transcrição ocorra de maneira correta. Ainda se tomou o cuidado de adicionar um espaçador, de tamanho 12bp, entre os sítios adicionados e o CDS com a intenção de minimizar possíveis erros no momento da construção. Antes da região codificadora da lactase adicionou-se um sítio de ligação ribossômica, o qual foi caracterizado e classificado como forte por Englund et al. (2016), a sequência estava depositada no Registry of Standard Biological Parts, com o código de acesso BBa\_B0030.

Ao final, realizou-se a digestão das partes biológicas utilizadas e posterior simulação da corrida em gel, o qual permite identificar, por comparação com o *Ladder*, o tamanho molecular dos fragmentos digeridos. Como definido no projeto, utilizamos as enzimas de restrição EcoRI e XbaI para verificar o sucesso da inserção, na coluna 1 digerimos o CDS desenhado e obtivemos como resultado o comprimento de 3123bp, coincidindo com o previsto. A coluna 2 contém o plasmídeo parental pUC19 digerido nas duas enzimas selecionadas, o mesmo deu-se com 2659bp, 27bp a menos do que o comprimento total do plasmídeo, porém essa diferença se dá devido às sequências nucleotídicas entre os sítios de restrição, a qual aparece como fragmentos de DNA no início da corrida. Na coluna 3 realizou-se o corte apenas com uma enzima de restrição no plasmídeo já transformado, de modo a obter o comprimento total do plasmídeo, o qual deu-se com 5782bp, valor este que representa a soma das duas digestões anteriores, demonstrando, pois, que houve a inserção completa do CDS. Por fim, na coluna 4 digeriu-se o plasmídeo transformado com as duas enzimas de restrição, resultando em duas bandas convergentes a soma das digestões da coluna 1 e 2. Deste modo, conclui-se que o CDS foi corretamente incorporado ao plasmídeo final nomeado pUC19 - LacZ.

Figura 6: Simulação da corrida no gel após digestão com as enzimas indicadas na tabela da imagem.



Fonte: Autoria própria (2021).

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - campus Ponta Grossa e a todos os envolvidos nesse trabalho.

## REFERÊNCIAS

BLATTNER, F. R. *et al.* The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, [S.L.], v. 277, n. 5331, p. 1453-1462, 5 set. 1997. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>.

ENGLUND, Elias *et al.* Evaluation of promoters and ribosome binding sites for biotechnological applications in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-12, 18 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep36640>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep36640#citeas>. Acesso em: 30 ago. 2021.

ESTRELA, Sylvie *et al.* **Environmentally mediated social dilemmas**. **Trends in ecology & evolution**, v. 34, n. 1, p. 6-18, 2019. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169534718302490>

GARG, G.; SEHRAWAT, N.; YADAV, M. Role of Enzymes in Food Industries *Frontiers in Food Biotechnology*. In: SHARMA, C., SHARMA A. K., ANEJA, K. R. *Frontiers in Food Biotechnology*, 1ª ed. New York: Nova Publishers, 2016. cap. 9, p. 219-252.

Hao, Weilong, *et al.* "Phylogenetic Incongruence in *E. Coli* O104: Understanding the Evolutionary Relationships of Emerging Pathogens in the Face of Homologous Recombination". **PLoS ONE**, organizado



por Niyaz Ahmed, vol. 7, nº 4, abril de 2012, p. e33971. *DOI.org (Crossref)*,  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033971>.

Hirohara, H, et al., **Immobilized lactase, its preparation and use, EP0037667B1, European Patent Office**,  
Concessão: 20 de mar. de 1981. Depósito: 27 de jun. de 1984.

Information on EC 3.2.1.23 - beta-galactosidase. **BRENDA**, 2021. Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.23>. Acesso em: 05 de set. de 2021

KUHLMAN, T. *et al.* Combinatorial transcriptional control of the lactose operon of *Escherichia coli*.  
**Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 104, n. 14, p. 6043-6048, 21 mar. 2007.  
Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0606717104>.

**LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2014. 189-237 Ed.  
Artmed

LIMA, Beatriz Dolabela. A produção de insulina humana por engenharia genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 28, 2001.

OLIVIER, Celso Eduardo *et al.* Is it just lactose intolerance? **Allergy And Asthma Proceedings**, [S.L.], v. 33, n. 5, p. 432-436, 1 set. 2012. Oceanside Publications Inc.. <http://dx.doi.org/10.2500/aap.2012.33.3584>.

ORDÓÑEZ, J.A. Tecnologia de Alimentos. **São Paulo: Artmed**, 2005. 279p.

RIBEIRO, Bruna Catarina et al. **Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial**. Scientia Plena, v. 14, n. 2, 2018.

ROCHA, Christiane Pereira et al. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. 2010. <http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15133>

Summers, D. K., Beton, C. W., Withers, H. L. **Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis**. **Molecular Microbiology**. 8, (6), 1031-1038 (1993).

UDENIGWE, Chibuike C. **Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research**. Trends in Food Science & Technology, v. 36, n. 2, p. 137-143, 2014. BRENDA, 2021

WANG, Yangxi *et al.* The genetically programmed down-regulation of lactase in children. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 114, n. 6, p. 1230-1236, jun. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70429-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70429-9).

WEIN, Tanita et al. Quantification of plasmid-mediated antibiotic resistance in an experimental evolution approach. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 154, p. e60749, 2019.

WU, Chi-Fang *et al.* DNA microarray for discrimination between pathogenic O157: h7 edl933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains. **Biosensors And Bioelectronics**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-8, out. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0956-5663\(03\)00118-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0956-5663(03)00118-0).

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia molecular básica*. 5.ed. 2014. pp.338-339.