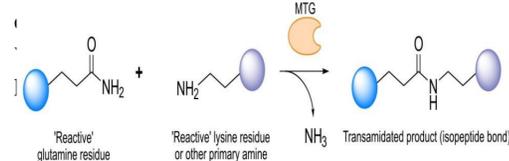


Clonagem e expressão de transglutaminase microbiana

William Tadeu Santos da Silva
Bioteclab/ICTA - UFRGS

Introdução

A transglutaminase microbiana é uma enzima utilizada na indústria alimentícia para alterar a consistência do alimento original, através da polimerização das proteínas. Uma das principais ações da transglutaminase é catalisar a ligação entre o grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina com o grupo γ -carboxamida (acila) de um resíduo de glutamina, criando uma ponte intra ou intermolecular altamente resistente à proteólise. Isto resulta na formação de ligações covalentes



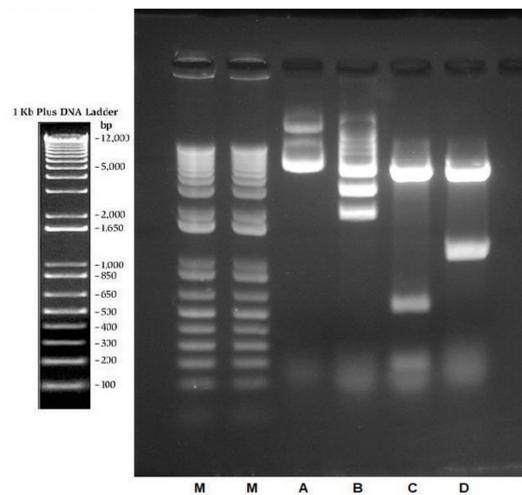
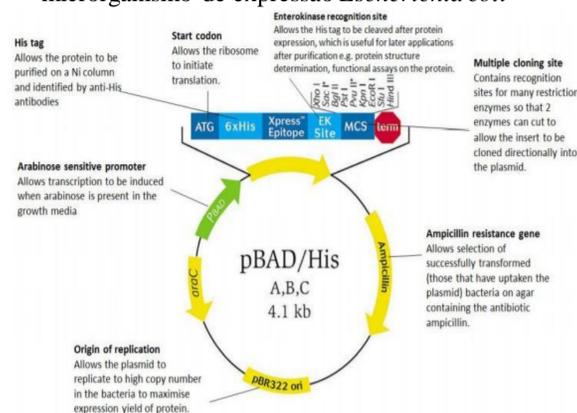
A transglutaminase microbiana começou a ser usada na indústria alimentícia para preparação de alimentos como o kamaboko, uma pasta de peixe tradicional no Japão. A realização de algumas pesquisas pelos laboratórios de pesquisa alimentar em Kawasaki (Life Science Laboratories) da Ajinomoto no Japão, no final dos anos 80 com a transglutaminase microbiana do *Streptoverticillium mobaraense* incentivou seu uso para outras aplicações.

Até hoje, tentativas de produzir transglutaminase, em sua forma solúvel e ativa, em larga escala, utilizando outros microrganismos, falharam e sua produção se dá apenas com a fermentação natural do *S. mobaraense*.

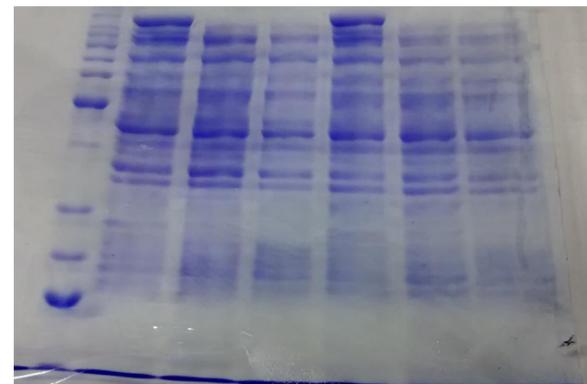
Este trabalho tem como objetivo a clonagem e a expressão da enzima transglutaminase em *Escherichia coli*, utilizando uma nova abordagem e visando sua utilização para a produção em escala industrial.

Resultados

Neste projeto, inicialmente, realizou-se o desenvolvimento e projeção do vetor de clonagem utilizado para a produção do plasmídeo contendo o gene da transglutaminase com o auxílio de programas de bioinformática. Com o vetor final, foi feita a clonagem do plasmídeo projetado pelo laboratório em microrganismo de expressão *Escherichia coli*



Confirmada a clonagem, realizou-se a expressão da proteína alvo com indução da expressão por meio de IPTG 10% v/v e arabinose 0,2% v/v; o crescimento bacteriano foi feito em agitadores orbitais à 20°C com pontos de coleta em 24 e 44 horas. Posteriormente, as células de expressão coletadas foram centrifugadas para separação do material citoplasmático, então lavadas com solução PBS para limpeza do material celular, centrifugadas novamente e coletado o material sobrenadante para análise proteômica em gel SDS-Page 12%.



Conclusões

A expressão não foi satisfatória, pois não conseguimos notar diferenciação entre o controle negativo e as amostras induzidas. Seguimos realizando a indução da expressão proteica, agora, alternando parâmetros como temperatura de crescimento bacteriano e concentração de IPTG e arabinose para, futuramente, obtermos a proteína clonada. Assim que obtida a proteína, a próxima etapa do trabalho visa o cultivo escalonado para aplicação industrial em biorreatores.

Referências bibliográficas

- Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y (2004) Properties and applications of microbial transglutaminase. Appl Microbiol Biotechnol 64:447-454.
- Strop P (2014) Versatility of microbial transglutaminase. Bioconj Chem 25:855-862.
- Ando HAM, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M (1989) Purification and characterization of a novel transglutaminase derived from microorganism. Agric Biol Chem 53:2613-2617.
- Huang CJ, Lin H, Yang X (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. J Ind Microbiol Biotechnol 39: 383-399.

Agradecimentos:

