



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-DISCIPLINAR EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA β -GLUCURONIDASE OBTIDA DE UMA
BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE TERRA PRETA DE ÍNDIO**

**MANAUS – AM
2019**

MINERVAL DE OLIVEIRA BATALHA JÚNIOR

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA β -GLUCURONIDASE OBTIDA DE UMA
BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE TERRA PRETA DE ÍNDIO**

Defesa apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Júnior do Carmo

**MANAUS – AM
2019**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B328c Batalha Junior, Minerval de Oliveira
Clonagem e Expressão da enzima -glucuronidase obtida de uma
Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio / Minerval de
Oliveira Batalha Junior. 2019
69 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Coorientador: Edson Junior do Carmo
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Enzima. 2. -glucuronidase. 3. Metagenômica. 4. Terra Preta de
Índio. 5. Expressão Heteróloga. I. Astolfi Filho, Spartaco II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título



139ª. ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No dia 28 (sexta-feira) de 2019, às 14h, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Imunologia, ICB, Setor Sul, Mini-Campus – UFAM. Minerval de Oliveira Batalha Júnior defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulado: “Clonagem e expressão de uma enzima beta glucuronidase obtida de uma biblioteca metagenômica de terra preta de índio.”

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Edson Júnior do Carmo	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura: <i>Edson Junior do Carmo</i> CPF: 000.247.201-84
Dra. Lorena Nacif Marçal	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura: <i>Lorena Nacif Marçal</i> CPF: 082.209.426-01
Dra. Isabelle Bezerra Cordeiro	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura: <i>Isabelle B. Cordeiro</i> CPF: 743.897.502-91

Manaus, 28 de junho de 2019.

Resultado Final: Aprovado (a) (X)
Reprovado (a) ()

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia
Edmar Vaz de Andrade
Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade
Coordenador

Coordenador PPGBIOTEC/UFAM

*Dedico este trabalho a Deus, minha
âncora.*

*Aos meus pais Minerval e Maria José,
meus irmãos Hudson, Débora, Senira,
Richardson, Kátia e Cleuderson, minha
esposa Adriane e minhas amadas filhas
Júlia, Luíza e Maísa, que são minha base
e fortaleza em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por estar na direção da minha vida, abençoando-me a cada passo, dando-me capacidade, entendimento, discernimento e fortalecendo-me a todo instante.

A minha amada família: meus pais Minerval (in memoriam) e Maria José pelos valores e ensinamentos passados e por terem sido incansáveis nessa batalha, meus irmãos Hudson, Débora, Senira, Richardson, Kátia e Cleudson, por todo apoio e carinho, minha esposa Adriane pelo amor, força e parceria de todos os dias, e nossas heranças mais preciosas Júlia, Luíza e Maísa, por serem minhas maiores motivações para vencer.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Spartaco Astolfi Filho e Professor Doutor Edson Júnior do Carmo, primeiramente pela oportunidade e confiança, por seus ensinamentos, entusiasmo, paciência, dedicação e conselhos. Eles sabem mais do que ninguém todas as dificuldades que passamos para concluir esta dissertação, sem o apoio e orientação deles não teria concluído.

Ao Centro de Apoio Interdisciplinar e sua equipe técnica. Em especial ao Msc. Paulo Abraão por toda ajuda e cordialidade. A Dona Elza, Patrícia e Carmem por todo auxílio e amizade.

A todos os colegas da minha turma de Mestrado, pela união, dedicação, companheirismo e palavras de apoio durante os momentos de aflição, em especial à Samanta Gabriela Sousa. Sem vocês essa jornada teria sido muito mais difícil.

Aos Mestres Diego Moreira, Kerolen Runa, Felipe Mendes e Alana Batista pelo apoio fundamental na parte prática, nos esclarecimentos na área de engenharia genética e principalmente pela amizade.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-graduação Multi-Institucional em Biotecnologia (PPGBIOTEC).

Aos excelentes profissionais que fazem parte da secretaria do PPGBIOTEC, por sempre fazerem o melhor para ajudar.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse sonho. Agradeço de coração!

“Mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças e subirão com asas como águias; correrão e não se cansarão; caminharão e não se fatigarão. **Isaiás 40:31**”

RESUMO

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde atuam como catalisadoras biológicas no controle metabólico de todos os organismos vivos. Os microrganismos ganham cada vez mais destaque como produtor dessas moléculas biocatalizadoras. A técnica metagenômica utilizando ferramentas moleculares e da bioinformática torna possível descobrir novas enzimas a partir de uma amostra ambiental qualquer. A Terra Preta de Índio é encontrada em algumas regiões da Amazônia, apresentando alto teor de matéria orgânica devido à alta atividade biológica neste ambiente. A partir de uma biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio construída e depositada na Universidade Federal do Amazonas, foi possível identificar um grupo de enzimas hidrolases. Dentro deste grupo foi rastreada a enzima β -glucuronidase que tem papel fundamental no metabolismo bacteriano, como gene repórter em transformação de plantas, em teste antidoping e na biotransformação da molécula de glicirrizina em derivados que agrega maior valor econômico para indústria farmacêutica e cosmética. A β -glucuronidase foi clonada e expressa em *E. coli*. BL21(DE3) pLysS utilizando como vetor o plasmídeo pET28a(+) Promega. Sua massa molecular foi estimada em 61 kDa. Sua atividade catalítica em tampão fosfato de sódio 100mM utilizando como substrato X-gal (20 mg/mL) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopiranosídeo) foi melhor a 40 °C e pH 7. Com parâmetros cinéticos aparentes K_m e V_{max} 4,08 mg e 0,45 mn.min⁻¹ respectivamente. Os resultados deste projeto irão contribuir para o melhor estudo da capacidade catalítica, comparar sua capacidade hidrolítica com outras β -glucuronidases comerciais e desta forma torná-la mais adequada para aplicação em diferentes ramos biotecnológicos.

Palavras-chave: β -glucuronidase; Metagenômica; Terra Preta de Índio; Expressão Heteróloga;

ABSTRACT

Enzymes are present in all living cells, where they act as biological catalysts in the metabolic control of all living organisms. Microorganisms are increasingly highlighted as a producer of these biocatalyst molecules. The metagenomic technique using molecular and bioinformatics tools makes it possible to discover new enzymes from any environmental sample. Black Earth the Indian is found in some regions of the Amazon, with a high content of organic matter due to the high biological activity in this environment. From a metagenomic library of Black earth the indian built and deposited at the Federal University of Amazonas, it was possible to identify a group of hydrolases enzymes. Within this group, the enzyme *β -glucuronidase* was screened, which plays a fundamental role in bacterial metabolism, as a reporter gene in plant transformation, in an anti-doping test and acts in the biotransformation of the glycyrrhizin molecule into derivatives that adds greater economic value to the pharmaceutical and cosmetic industry. *β -glucuronidase* was cloned and expressed in *E coli*. BL21 (DE3) pLysS using the plasmid pET28a (+) Promega as vector. Its molecular mass was estimated at 61 kDa. Its catalytic activity in 100mM sodium phosphate buffer using X-gal (20 mg / mL) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) as substrate was better at 40 °C and pH 7. With kinetic parameters Km and Vmax 4.08 mg and 0.45 mn.min⁻¹ respectively. The results of this project will contribute to the better study of the catalytic capacity, to compare its hydrolytic capacity with other commercial *β -glucuronidases* and thus make it more suitable for application in different biotechnological branches.

Keywords: *β -glucuronidase*; Metagenomics; Black Earth the Indian; Heterologous Expression;

LISTA DE FIGURAS

Ordem	Título da figura	Página
Figura 1	Reação catalisada pela β -glucuronidase (EC.3.2.1.31).	20
Figura 2	Estrutura cristalina do tetrâmero β -glucuronidase de <i>E. coli</i> .	21
Figura 3	Características da MPS VII.	22
Figura 4	Ensaio de coloração histoquímica com o substrato X-gluc.	23
Figura 5	Molécula da glicirrizina (GL) sendo hidrolisada pela GUSB formando dois subprodutos: ácido glicirretínico 3-O-mono- β -D-glucuronídeo (GAMB) e ácido glicirretíco GA.	25
Figura 6	Mapa físico do vetor de Clonagem pGEM-T múltiplo sítio de clonagem, sendo resistente à ampicilina.	32
Figura 7	Mapa físico do vetor de expressão pET-28a(+).	33
Figura 8	Marcadores de massa molecular em par de base para DNA e kDa massa molecular da proteína respectivamente.	34
Figura 9	Fluxograma das metodologias realizadas neste trabalho para a conclusão dos objetivos.	35
Figura 10	Esquema das etapas realizadas para a clonagem do vetor pGEM-T.	36
Figura 11	Fosmídeo com gene da GUSB Intacto em gel agarose 0,8%.	45
Figura 12	Amplificação do gene GUSB por PCR.	46
Figura 13	Perfil eletroforético dos produtos da digestão dupla pelas enzimas <i>Bgl</i> III e <i>Eco</i> RI.	46
Figura 14	Mapa físico do plasmídeo recombinante renomeado para pGEM-T_GusB,	48
Figura 15	Perfil eletroforético dos produtos da digestão dupla pelas enzimas <i>Xba</i> I e <i>Eco</i> RI no sistema pET28a + GUSB para confirmação da subclonagem.	49
Figura 16	Mapa físico do plasmídeo recombinante renomeado para pET28a_MES.	49
Figura 17	Teste para confirmação da atividade catalítica da GUSB recombinante.	51
Figura 18	Análise eletroforética em SDS-PAGE 12% da GUSB produzida por <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.	52

Figura 19	Teste para confirmação da atividade catalítica da GUSB recombinante em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7.	53
Figura 20	Perfil cinético da enzima recombinante.	54
Figura 21	Determinação dos valores de pH ótimo pra enzima presente no extrato bruto após indução com IPTG.	55
Figura 22	Efeito da temperatura na atividade da enzima recombinante GUSB.	56
Figura 23	Determinação da estabilidade da enzima recombinante GUSB.	57
Figura 24	Parâmetros cinéticos aparentes da GUSB recombinante descritos pelo modelo cinético de Michaleis-Menten.	57
Figura 25	Gráfico dos Duplos Recíproco de Lineweaver Burk para os parâmetros cinéticos aparentes da GUSB recombinante.	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCIG – 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-glucuronídeo
°C – grau Celsius
DNA – ácido desóxirribonucleico
EC – *Enzyme Commission*
E. coli – *Escherichia coli*
FDGICU – Fluorescein-di- β -D-glicuronídeo
GA – Ácido glicirretíco
GAMB – Ácido glicirretínico 3-O-mono- β -D-glucuronídeo
GL – Glicirrizina
GUSB – β -glucuronidase
h – Hora
IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb – Kilobases
kDa – Quilodalton
 K_M – Constante de Michaelis-Menten
L – Litro
LacI – Repressor lac I
LB – Luria-Bertani
M – Molar
mA – Miliampere
mg – Miligrama
mg/mL Miligrama por mililitro
min – Minuto
mL – Mililitro
mM – Milimolar
MUG - 4-metilumbeliferil β -D-glucuronídeo
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
ng/ μ L – Nanograma por microlitro nm – nanômetro
O.D. – Densidade óptica
pb – Pares de base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Enzima: Um aspecto geral	18
3.2 Enzimas hidrolases glicosídica (EC 3.2.1-)	19
3.3 β -glucuronidase (GUSB)	20
3.4 Aplicação da β -glucuronidase (GUSB)	23
3.4.1 Gene repórter e Testes biológicos	23
3.4.2 Hidrólise da Glicirrizina.....	24
3.5 Terra Preta de Índio (TPI).....	26
3.6 Metagenômica.....	27
3.7 Produção de enzimas por Engenharia Genética.....	29
4. OBJETIVO	30
4.1 Geral.....	30
4.2 Específicos	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 Objeto de estudo	31
5.2 Linhagens bacterianas para Clonagem e Expressão.	31
5.3 Vetores utilizados neste trabalho para clonagem e expressão proteica respectivamente.	33
5.4 Kits de Extração, Purificação e Enzima de Restrição.....	34
5.5 Marcador Molecular	34
5.6 Métodos	34
5.6.1 Clonagem e subclonagem da GUSB em vetores pGEM-T e pET28a(+)......	36
5.6.2 Amplificação da GUSB pela técnica de PCR	36
5.6.3 Purificação do produto amplificado por PCR	37
5.6.4 Clonagem e Precipitação do Sistema de Ligação.....	37
5.6.5 Preparo de células eletrocompetentes	38
5.6.6 Transformação bacteriana por eletroporação	38
5.6.7 Extração plasmidial e Análise de restrição	39
5.6.8 Preparo do plasmídeo pET-28a (+) para Subclonagem	40
5.6.9 Subclonagem da GUSB no plasmídeo pET-28a (+) e transformação.....	40
5.6.10 Confirmação da subclonagem do vetor recombinante pET28a _MES	41
5.6.11 Expressão da GUSB recombinante em BL21 (DE3) pLysS.....	41
5.6.12 Gel de SDS-PAGE	42

5.6.13 Obtenção do extrato enzimático e teste rápido para detecção de atividade	43
5.6.14 Ensaio enzimáticos	43
5.6.15 Cinética de reação	44
5.6.16 Efeito do pH sobre a atividade enzimática da GUSB: determinação do pH ótimo da atividade catalítica	44
5.6.17 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da GUSB	44
5.6.18 Estabilidade térmica da enzima β -glucuronidase Recombinante	44
5.6.19 Determinação de K_m e V_{max} aparentes da GUSB	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1 Confirmação da amplificação da GUSB do fosmídeo “fosGUSB” por PCR.....	45
6.2 Confirmação da clonagem do sistema pGEM-T_GUSB	46
6.3 Confirmação da subclonagem por análise de restrição.....	48
6.4 Teste de atividade positiva para GUSB em placa.....	50
6.5 Análise em gel SDS-PAGE 12%	52
6.6 Atividade do extrato enzimático GUSB em tampão fosfato de sódio 100mM, pH7.....	53
6.7 Ensaio da cinética	54
6.8 Efeitos do pH na atividade enzimática	54
6.9 Determinações da temperatura ótima da atividade catalítica da GUSB	55
6.10 Estabilidade da enzima no meio reacional.....	56
6.11 Determinação da K_m e V_{max} aparentes da GUSB	57
7. CONCLUSÃO.....	59
8. PERSPECTIVAS.....	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores naturais, que possuem propriedades únicas que as tornam altamente desejáveis para aplicações em processos industriais. Isto se deve, a sua biodegradabilidade, alta especificidade e alta eficiência catalítica (CARVALHO, 2015; BON et al., 2008). As enzimas microbianas possuem alta estabilidade e rendimento, melhor facilidade de manipulação genética além de crescimento rápido em meios mais acessíveis (HANSAN et al., 2006). De acordo com sua atividade catalítica, as mesmas são aplicadas nos mais diversos setores industriais como nos segmentos têxteis, nos cosméticos, na panificação e laticínios, no setor farmacêutico, na agricultura, na produção de alimentos e bebidas entre outras (ORLANDELI et al., 2012).

A partir de uma biblioteca metagenômica obtida de terra preta de índio, foi rastreada a enzima β -glucuronidase (GUSB), pertencente à família das hidrolases glicosídica 2 (GH2) (HASSAN et al., 2013; HENRISSAT, 1997) que catalisa vários substratos, entre eles os conjugados de açúcar de ácido glucurônico (BURCHETT et al., 2015). A GUSB tem papel fundamental no metabolismo bacteriano, liberando os ácidos glucurônicos dos conjugados de açúcar para a produção de energia (BURCHETT et al., 2015; HASSAN et al., 2013). Sua nomenclatura oficial segundo a IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) é EC 3.2.1.31, também é conhecida como *exo- β -D-glucuronidase*; *β -glucuronido glucuronosohidrolase* *glucuronidase*; *cetodase* (CANTAREL et al., 2009; HENRISSAT, 1997).

A GUSB pode ser encontrada na maioria dos eucariotos como o humano, rato, gato e cão, invertebrados, fungos e procariotos (POLLET et al., 2017; MATTA, 2001; JEFFERSON et al., 1986). A mesma apresenta característica estrutural com quatro subunidades idênticas, sendo encontrado principalmente como um homotetrâmero de glicoproteína (BURCHETT et al., 2015). Essas estruturas destacam a presença de quatro sítios ativos na proteína, um em cada subunidade. Ambas as estruturas são compostas por três motivos estruturais em cada subunidade: um β -roll de gelatina, uma dobra semelhante a uma imunoglobulina (um barril β distorcido) e um barril TIM (de N a C-terminal) (BURCHETT et al., 2015).

No ser humano a GUSB é encontrada no lisossomo, sua atividade é essencial para a reestruturação e renovação normal das moléculas na matriz extracelular (BURCHETT et al., 2015; GEHRMANN et al., 1994). A deficiência dessa enzima para a degradação de glicosaminoglicanos no lisossomo leva a desenvolver uma doença de armazenamento lisossomal conhecida como mucopolissacaridose tipo VII (MPS VII), síndrome de Sly (KERMODE et al., 2018; SLY et al., 1973).

Em 1986, foi criado o primeiro sistema de fusão gênica usando o gene GUS de *Escherichia coli* como um sinalizador de expressão gênica para utilizar em transformação de plantas (JEFFERSON et al., 1986). Atualmente a enzima GUSB vem sendo amplamente utilizada nas análises para monitoramento da qualidade da água e de contaminação de alimentos, em testes bioquímicos e na biotransformação da glicirrizina em derivados de maior interesse para a indústria farmacêutica e de cosmético (WEI et al., 2018; XU et al., 2018; LIU et al., 2012). Sua atividade enzimática pode ser medida por meio de diferentes substratos cromogênicos e fluorogênicos, como MUG - 4-metilumbeliferil β -D-glucuronídeo, FDGIcU - Fluorescein-di- β -D-glicuronídeo, BCIG - 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-glucuronídeo, 8HQG - 8-hidroxiquinolina- β -D-glucuronídeo (ABBOO & PLETSCHKE, 2010; MERCANTE et al., 2000).

Em 2018 o Brasil gastou cerca de 62,46 milhões de dólares com a importação de enzimas (BRASIL, 2019). A terra preta de índio encontrada na região amazônica tem alta fertilidade e apresenta concentração elevada de microrganismos com diferentes habilidades e diversidade genética, entre elas a enzima β -glucuronidase (HIRAOKA et al., 2016; DUCHIELA et al., 2013). Apesar de diversos estudos realizados sobre as funções, ecologia e diversidade genética, novas características catalíticas dessa enzima são encontradas.

Uma melhor investigação científica pode proporcionar um conhecimento mais realista do potencial biotecnológico da enzima β -glucuronidase. Dentro do contexto exposto, o objetivo principal deste trabalho é Clonar e Expressar a enzima β -glucuronidase na bactéria *Escherichia Coli* e caracterizar sua atividade enzimática.

2. JUSTIFICATIVA

A enzima β -glucuronidase (GUSB) desempenha papel importante na regulação da glucuronidação de compostos endobióticos, compostos xenobióticos e do metabolismo de carboidratos de vários vertebrados (WANG et al., 2017; GEHRMANN et al., 1994). Além disso, a mesma remove os açúcares do ácido glucurônico (GlcA) ligados aos compostos endobióticos e xenobióticos pelas enzimas UDP-glucuronosiltransferase (UGT) que metabolizam a droga na fase II em tecidos protetores do hospedeiro que são excretados pelos rins (AL ALI et al., 2016). Essa capacidade hidrolítica da GUSB é utilizada rotineiramente para hidrolisar glucuronídeos conjugados de metabólitos de drogas a partir da urina, plasma e outros fluídos biológicos, antes de ensaios enzimáticos, espectrometria de massa e cromatografia em teste antidoping (SIGMA-ALDRICH, 2019; FISHMAN, 1974).

A GUSB tem ampla utilização na biotecnologia vegetal como gene repórter (BASU et al., 2004; JEFFERSON et al., 1986) de uma maneira similar ao uso da proteína verde fluorescente, por ser considerada uma enzima estável e sensível ao ensaio de coloração histoquímica (MICHIKAWA, et al., 2012). O gene da GUSB presente em plantas transformadas catalisam os substratos X-Gluc e/ou MUG criando um subproduto fluorogênico de cor azul (WANG et al., 2017; ARUL et al., 2008; MERCANTE et al., 2000; JEFFERSON et al., 1986;).

Estudos na área da saúde estão utilizando a GUSB como biomarcador em terapias biológicas no monitoramento da viroterapia oncolítica (TSONEVA, et al., 2015; WALLACE et al., 2015). Os métodos analíticos que permitem a detecção de microrganismos em uma determinada amostra utilizam a GUSB como indicador biológico de microrganismos, para determinar a qualidade da água e contaminação em alimentos (ODONKOR & AMPOFO, 2013; ICMSF, 2000; MANAFI et al., 1991). Além disso, o gene da GUSB pode ser usado para construir um vetor de gene repórter específico para detectar a presença de bactérias Gram-positivas (BEAUD et al., 2005).

Outra aplicação interessante da GUSB e fonte de vários estudos é a sua capacidade de hidrolisar a molécula da glicirrizina (GL) composta por um ácido glicirrético (GA) e duas moléculas de ácido glucurônico (GlcA) (MATSUI, et al., 2004). A GL é um glicosídeo de saponina triterpenóide, um dos componentes ativos mais importantes e reconhecidos da raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*). Essa molécula é muito utilizada como adoçante, pois seu sabor chega a ser 170 vezes maior que a da sacarose (WANG et al., 2015; FENG et al., 2006; VAYA,

et al., 1997). A glicirrizina é utilizada em alimentos, medicina tradicional e fitoterapia, apresentando elevadas atividades biológicas anticâncer, antiinflamatória, antibacteriana, antioxidantes, biossíntese de colesterol, atividade hepatoprotetora (XIAOYING et al., 2017; ZHAO et al., 2017; WANG et al., 2015).

A hidrólise da glicirrizina (GL) resulta em moléculas importantes como o ácido glicirretínico 3-O-mono- β -D-glucuronídeo (GAMG) e ácido glicirretíco (GA). A biotransformação da glicirrizina em GA e GAMG é mais vantajosa, pois suas atividades farmacológicas e fisiológicas são maiores em comparação com a GL (WEI et al., 2018; XU et al., 2018; LIU et al., 2012). A molécula de GA tem sua aplicação mais voltada para indústria farmacêutica e cosmética (WEI et al., 2018; ZHAO et al., 2017; WANG et al., 2015). O GAMG é mais doce e apresenta maior atividade farmacológica como atividade antiviral, antiinflamatória e antitumoral (XU et al., 2018; GUO et al., 2017). Segundo GUO et al., (2017) a GUSB é uma enzima chave na produção de GAMG, exibindo um alto potencial para converter GL diretamente no GAMG gerando um composto de alto valor para a indústria farmacêutica e cosmética.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Enzima: Um aspecto geral

As enzimas são biomoléculas formadas por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A estrutura primária das enzimas corresponde à sequência monomérica de seus aminoácidos e a interação desses aminoácidos com aminoácidos adjacentes formam a sua estrutura secundária, com arranjos espaciais do tipo α -hélice ou folha β . Sua estrutura terciária corresponde às interações entre aminoácidos não sequencialmente próximos, estas ligações provocam dobramentos e torções. A estrutura formada configura o sítio catalítico da enzima, o que é essencial para determinar sua atividade biológica. Já a estrutura quaternária das enzimas corresponde à interação entre cadeias polipeptídicas, elas possuem massas moleculares que variam de cerca de 12.000 até mais de um milhão. (LEHNINGER et al., 2002; ORLANDELLI et al., 2012).

As enzimas são em sua maioria moléculas de proteínas com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam atividade catalítica. O seu poder catalítico está associado à sua conformação nativa, a qual depende de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio (LEHNINGER et al., 2002; BON et al., 2008). De acordo com Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

(NC-IUBMB, 2019) essas catalizadoras estão divididas em sete classes, seguindo as reações que catalisam como: (EC 1) as Oxidorredutases, catalisam reações de óxido-reduções, transferência de elétrons, (EC 2) as Transferases que catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra, (EC 3) Hidrolases que catalisam reações de hidrólise, transferindo grupos funcionais para água, (EC 4) Liasas que catalisam reações de quebra de ligações, (EC 5) Isomerases que catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero, (EC 6) Ligases que catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia e por última (EC 7) Translocases com translocação ou separação de cargas ligadas a reações de óxido-redutases. As enzimas são catalisadores naturais, que possuem propriedades únicas que as tornam altamente desejáveis para aplicações em processos industriais. Isto se deve, a sua biodegradabilidade, alta especificidade e alta eficiência catalítica (BON et al., 2008; CARVALHO, 2015).

Várias enzimas foram extraídas com sucesso de tecidos animais (ex.: pancreatina, tripsina, pepsina e renina) e vegetais (ex.: papaína, bromelina, peroxidase), no entanto, os microrganismos são as principais fontes de enzimas industriais, isto se deve por sua grande variedade de atividades catalíticas, ingestão de insumos de baixo custo, características não tóxicas, eco-amigáveis entre outras variadas características (CHOI et al., 2015; RAVEENDRAN et al., 2018).

3.2 Enzimas hidrolases glicosídica (EC 3.2.1-)

As enzimas hidrolases são um grupo disseminado de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre uma porção de carboidrato e não-carboidrato numa reação com a água, compreendendo um grande grupo de enzimas, que englobam as proteases, amilases, xilanases, oxirredutases, ligases, esterases, lipases, β -galactosidase e β -glucuronidase entre outras (DAVIES & HERISSAT, 1995; CARVALHO, 2015; CAZY, 2019). A nomenclatura enzimática das glicosil-hidrolases da IUBMB baseia-se na especificidade do seu substrato e ocasionalmente no seu mecanismo molecular.

O mecanismo de ação das hidrolases glicosídicas (EC 3.2.1-) consiste em clivar a ligação glicosil-oxigênio, entre dois carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não açúcar, com consumo de uma molécula de água. (DAVIES & HERISSAT, 1995). Na maioria dos casos, a hidrólise da ligação glicosídica é catalisada por dois resíduos de aminoácidos da enzima: um ácido geral (doador de prótons) e um nucleófilo/base. Dependendo da posição espacial destes resíduos catalíticos, a hidrólise ocorre através da contenção global ou inversão

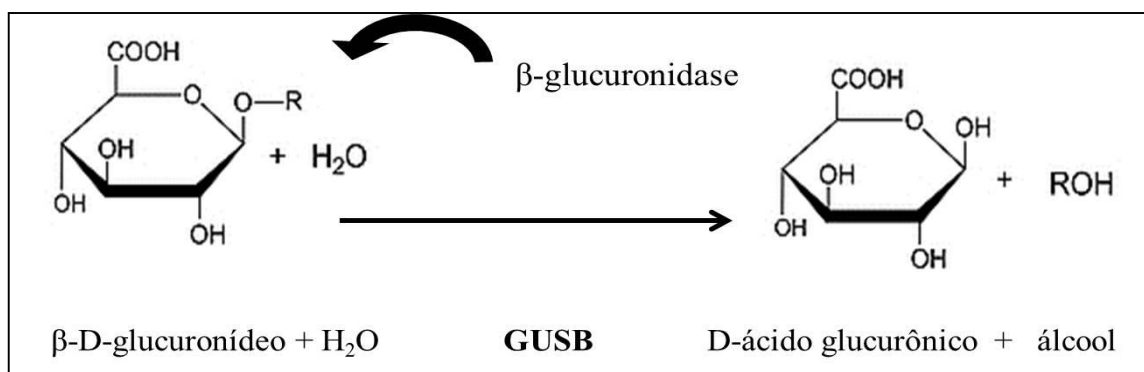
global da configuração anomérica. No caso da enzima β -glucuronidase (EC 3.2.1.31) ocorre pelo processo de retenção (DAVIES & HERISSAT, 1995; CAZY, 2019). Elas estão envolvidas em várias funções importantes nos processos biológicos importantes para aplicações terapêuticas ou biotecnológicas (RAVEENDRAN et al., 2018).

3.3 β -glucuronidase (GUSB)

A enzima β -glucuronidase (GUSB) pertence à família das hidrolases glicosídicas 2 (GH2) onde estão inseridas a β -galactosidase e β -manosidase (HENRISSAT, 1997; HASSAN et al., 2013). Sua nomenclatura oficial segundo a IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) é EC 3.2.1.31, também é conhecida como exo- β -D-glucuronidase; β -glucuronido glucuronosohidrolase glucuronidase; cetodase (CAZY, 2018). A GUSB catalisa ligações glicosídicas, hidrolisando ligações O-glicosil e S-glicosil entre dois ou mais carboidratos ou entre uma porção de carboidrato e não carboidrato de glicoproteínas, oligossacarídeos de glico-conjugados (GEHRMANN et al., 1994; WERNER et al., 2010; MEGAZYME, 2019). Ela catalisa vários substratos como glicosaminoglicanos e outros conjugados de açúcar de ácido glucurônico de uma variedade de compostos para produzir ácido glucurônico e um álcool (GEHRMANN et al., 1994; BASIŃSKA & FLORIAŃCZYK, 2003; BURCHETT et al., 2015).

A reação hidrolítica GUSB ocorre da seguinte forma: **um β -D-glucuronídeo + H₂O = D-glucuronato + um álcool** o esquema é mostrado abaixo (BRENDA, 2018). (Figura 1)

Figura 1. Reação catalisada pela β -glucuronidase (EC 3.2.1.31)

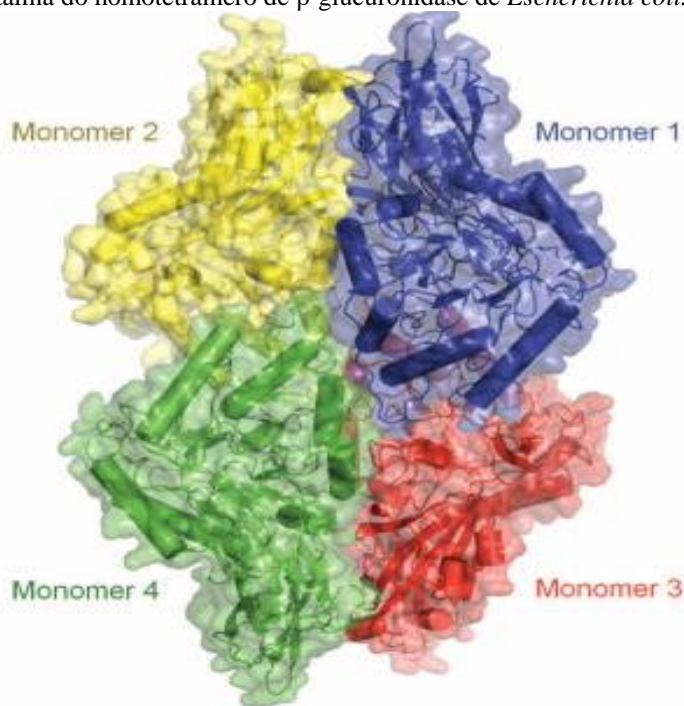


(Extraído de SIGMA-ALDRICH, 2019).

A GUSB pode ser encontrada na maioria dos eucariotos como o humano (GUISE et al., 1985; GEHRMANN,), rato, gato e cão (NISHIMURA et al., 1986; POWELL et al., 1988), invertebrados (MATA, 2011), fungo e levedura (HAN et al., 2018) e procariotos (JEFFERSON et al., 1986). Ela apresenta característica estrutural com quatro subunidades idênticas, sendo

encontrada principalmente como um homotetrâmero de glicoproteína (BURCHETT et al., 2015). Essas estruturas destacam a presença de quatro sítios ativos na proteína, um em cada subunidade. Ambas as estruturas são compostas por três motivos estruturais em cada subunidade: um β -roll de gelatina, uma dobra semelhante a uma imunoglobulina (um barril β distorcido) e um barril TIM (de N a C-terminal) (BURCHETT et al., 2015). Abaixo pode ser observada uma estrutura cristalina de homotetrâmero da GUSB de *Escherichia coli*. (Figura 2).

Figura 2. Estrutura cristalina do homotetrâmero de β -glucuronidase de *Escherichia coli*.



Fonte:Extraído de WALLACE *et al.*, 2010.

Nas *Escherichia coli* (UniProt P05804) o homotetrâmero de GUSB possui massa molecular total de 272 kDa, cada subunidade peptídica com 601 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 68 kDa (WALLACE *et al.*, 2010). Ela tem papel fundamental no metabolismo, liberando os ácidos glucurônicos dos conjugados de açúcar para a produção de energia (BURCHETT *et al.*, 2015)

No ser humano a GUSB (UniProt P08236) é encontrada no lisossomo, sua estrutura completa possui quatro cópias idênticas de uma cadeia peptídica de 629 resíduos e massa molecular total de 300 kDa onde cada subunidade possui massa de 75 kDa (JAIN et al., 1996; BURCHETT et al., 2015). Sua atividade é essencial para a reestruturação e renovação normal das moléculas na matriz extracelular (GEHRMANN et al., 1994; BURCHETT et al., 2015). A β -glucuronidase humana está envolvida na degradação dos chamados glicosaminoglicanos

sulfatados ou mucopolissacarídeos (GAGs) (TOMATSU et al., 2009) que contêm ácidos β -glucurônicos em suas estruturas como o sulfato de heparan, sulfato de dermatan e sulfato de condroitina (NAKAMURA et al., 1990; ISLAN et al., 1999; HASSAN et al., 2013; MATALON et al., 2015). Os glicosaminoglicanos são compostos de unidades repetitivas de dissacarídeos lineares formando heteropolissacarídeos. São encontrados em abundância no corpo humano e estão localizados principalmente na matriz extracelular e nas superfícies celulares (JACKSON et al., 1996). A deficiência de β -glucuronidase para a degradação de glicosaminoglicanos sulfatados no lisossomo leva a desenvolver uma doença de armazenamento lisossomal conhecida como mucopolissacaridose tipo VII (MPS VII), síndrome de Sly (SLY et al., 1973; TOMATSU et al., 2009; KERMODE et al., 2018).

MPS VII é uma doença genética de herança autossômica recessiva, muito rara descrita pela primeira vez em 1973 por Sly (SLY et al., 1973; CHENG et al., 2005; TOMATSU et al., 2009). Mutações ocasionadas no gene GUSB, desestabilizam a enzima que degradam parcialmente os GAGs e estes se acumulam nos lisossomos de muitos tecidos, desencadeando a disfunção celular e orgânica. É uma doença rara que apresenta ampla variabilidade clínica (SLY et al., 1973; TOMATSU et al., 2009). Retardo mental, disfunção orgânica, retardo de crescimento, surdez, déficit comportamentais, displasia esqueléticas, face grosseira, macroglossia entre outras são características da mucopolissacaridose (NEUFELD & MUENZER, 2001; TOMATSU et al., 2009).

Figura 3. Características da MPS VII. A: face grosseira e B: macroglossia: língua grande.



Fonte: (Extraído de PubChem, 2018).

3.4 Aplicação biotecnológica da GUSB

3.4.1 Gene repórter e Testes biológicos

Os genes repórteres codificam produtos que podem ser facilmente medidos ou identificados, especialmente enzimas que podem atuar em diferentes substratos, fornecendo produtos coloridos ou fluorescentes, facilmente detectáveis (WILSON, 1995; MERCANTE et al., 2000). A GUSB é amplamente utilizado na biotecnologia vegetal como gene repórter (JEFFERSON et al., 1987; BASU et al., 2004; KIM et al., 2006) e em experimentos biológicos de uma maneira similar ao uso da proteína verde fluorescente e da luciferase (MICHIKAWA, et al., 2012) por ser considerada uma enzima estável, sensível ao ensaio de coloração histoquímica com os substratos 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucuronídeo (X-Gluc) e o 4-metilumbeliferil beta-D-glucuronídeo (MUG) (JEFFERSON et al., 1986; ARUL et al., 2008). Em 1986, JEFFERSON e col. criaram o primeiro sistema de fusão gênica usando o gene GUS de *Escherichia coli* como um sinalizador de expressão gênica para utilizar em transformação de plantas. As plantas transformadas que contém o gene da GUSB quando catalisa os substratos X-Gluc e/ou MUG cria um subproduto fluorogênico de cor azul (JEFFERSON et al., 1986; ARUL et al., 2008). Segundo HESS et al., (2011) esta técnica pode ser aplicada nos diversos tipos de terapias biológicas que dependem da expressão gênica heteróloga. A foto (Figura 4) mostra um experimento utilizando a GUSB como gene repórter. É possível detectar visualmente a coloração azulada nas plantas pela expressão da GUSB utilizando o substrato cromogênico X-Gluc.

Figura 4. Ensaio de coloração histoquímica com o substrato X-Gluc.



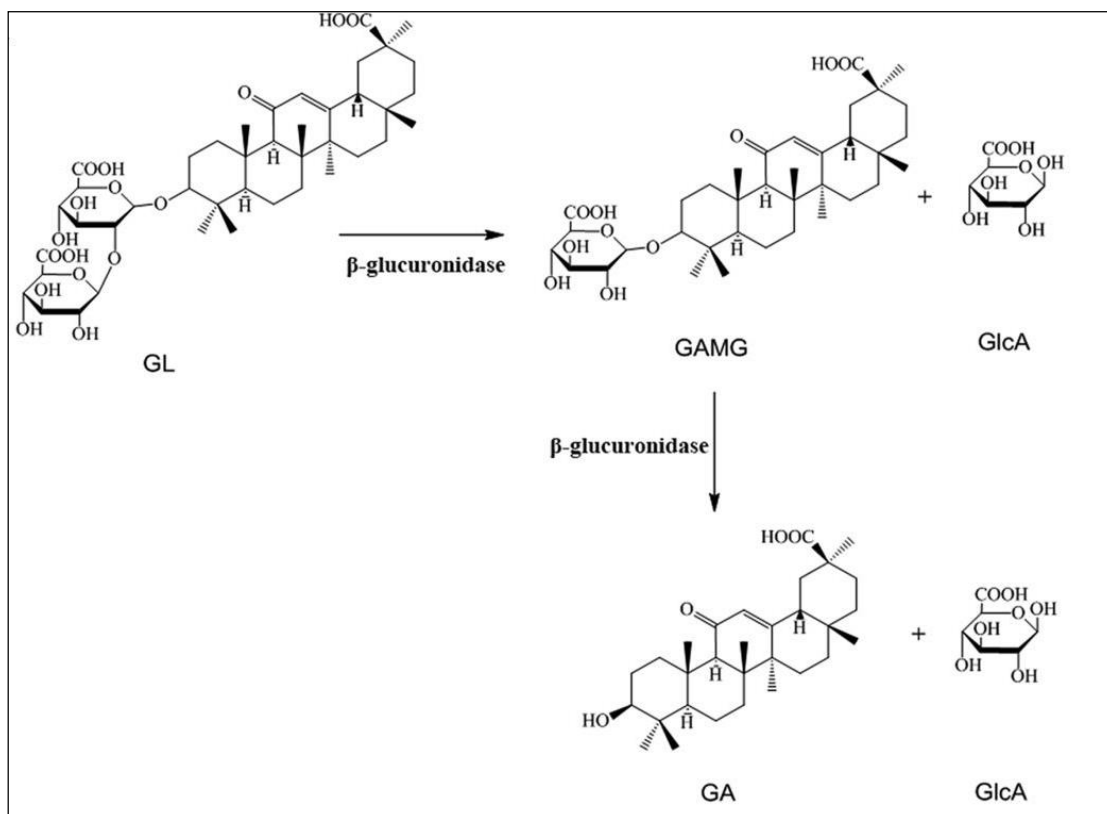
Fonte: Extraído de ZHU *et al.*, 2018.

A β -glucuronidase desempenha papel importante na regulação da glucuronidação de compostos endobióticos (produtos do próprio organismo) e xenobióticos (produtos gerados a partir de substâncias ingeridas), participa do metabolismo de carboidratos de vários vertebrados (GEHRMANN et al., 1994; WANG et al., 2015). Ela remove os açúcares do ácido glucurônico (GlcA) ligados aos compostos endobióticos e xenobióticos pelas enzimas UDP-glucuronosiltransferase (UGT) que metabolizam a droga na fase II em tecidos protetores do hospedeiro que são excretados pelos rins (NOVEL et al., 1974; AL ALI et al., 2016; POLLET et al., 2017). Essa capacidade hidrolítica da GUSB é utilizada rotineiramente, para hidrolisar glucuronídeos conjugados de metabólitos de drogas a partir da urina, plasma e outros fluídos biológicos, antes de ensaios enzimáticos, espectrometria de massa e cromatografia em teste antidoping (SIGMA-ALDRICH, 2019). O teste mais comum que avalia a atividade da enzima em testes biológicos é o uso de Fenolftaleína de ácido glucurônico como substrato biossintético (BASINSKA & FLORIANCZYK, 2003; SIGMA-ALDRICH, 2019).

3.4.2 Na hidrólise da Glicirrizina

A glicirrizina (GL) é um glicosídeo de saponina triterpenóide, um dos componentes ativo mais importante e reconhecido da raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) sua utilização como adoçante é comum devida sua doçura que chega a ser 170 vezes maior que a da sacarose (Vaya et al., 1997; FENG et al., 2006; WANG et al., 2015). Também é utilizada em alimentos, medicina tradicional e fitoterapia, apresentando elevadas atividades biológicas anticâncer, antiinflamatória, antibacteriana, antioxidantes, biossíntese de colesterol, atividade hepatoprotetora (LI et al., 2014; WANG et al., 2015; Zhao et al., 2016; Xiaoying et al., 2017). A glicirrizina (GL) é composta por um ácido glicirrético (GA) e duas moléculas de ácido glucurônico (GlcA) (MATSUI, et al., 2004) (Figura 5).

Figura 5. Molécula da glicirrizina (GL) sendo hidrolisada pela GUSB formando dois subprodutos: ácido glicirretínico 3-O-mono- β -D-glucuronídeo (GAMG) e ácido glicirretínico GA.



Fonte: Extraído de JIA & FENG, 2018.

Com a hidrólise dos dois glucuronídeos da glicirrizina (GL), ela é convertida em derivados muito valiosos como o ácido glicirretínico 3-O-mono- β -D-glucuronídeo (GAMG) e ácido glicirretínico (GA) como mostrado na figura 5. A hidrólise da glicirrizina em GA e GAMG é mais vantajosa, pois suas atividades farmacológicas e fisiológicas são maiores em comparação com a GL (WANG et al., 2015; XU et al., 2018). A aplicação da molécula de GA devida suas atividades farmacológicas, tem sua aplicação mais voltadas para indústria farmacêutica e cosmética (ZHOU et al., 2001; WANG et al., 2015). O GAMG apresenta maior doçura e maior atividade farmacológica que a molécula de glicirrizina, sendo amplamente utilizado em indústrias alimentícias e farmacêuticas com alto valor econômico por apresenta atividade antiviral, antiinflamatória e antitumoral, biodisponibilidade e bioatividade maior que a GL (FENG et al., 2017; XU et al., 2018; GUO et al., 2018). Segundo GUO et al., (2018) a GUSB é uma enzima chave na produção de GAMG, exibindo um alto potencial para converter GL diretamente no GAMG gerando um composto de alto valor. De acordo com estudos realizados por WANG et al., (2015) e XU et al., (2018) a GUSB de diferentes organismos apresentaram grande diversidade na biotransformação da molécula de GL em GAMG e GA porque a mesma, apresenta grande variedade e especificidade de substratos em relação às saponinas triterpênicas.

3.5 Terra Preta de Índio (TPI)

O solo é um importante reservatório de carbono na terra e um importante habitat natural, pois seus diferentes componentes sólidos (areia, argila, silte, matéria orgânica), cria uma gigantesca diversidade de microambiente para a colonização microbiana (VAN ELSAS & TREVORS, 1997; MOREIRA et al., 2009; DUCHICELA et al., 2013). Os fatores abióticos (umidade, temperatura e nutrientes) em diferentes microambientes, também contribuem para formar diferentes nichos ecológicos e conseqüentemente possibilita a coexistência de milhares de microrganismos, com diferenciadas habilidades metabólicas e diversidade genética ainda não exploradas (MOREIRA, 2007; MOCALLI & BENEDETTI, 2010; DUCHIELA et al., 2013). Para KENNEDY & SMITH, (1995) a diversidade biológica é explicada pela riqueza de espécies e suas ligações com os processos bioquímicos. Segundo TÓTOLA & CHAER (2002), diversidade biológica é a variedade de espécies em um ecossistema, assim como a variedade de genótipos dentro da mesma espécie.

Os solos amazônicos possuem características variadas, mas em sua grande maioria são arenosos ou argilosos, com baixa disponibilidade e retenção de nutrientes, são geralmente ácidos, com baixa capacidade de troca catiônica (MOREIRA & FAGERIA, 2009; MANGRICH et al., 2011). Ao contrário da maioria dos solos amazônicos, existe um tipo incomum com elevado estoque de carbono e alta fertilidade localizados em algumas áreas na Amazônia (STEINER et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2010) conhecidos popularmente como Terra Mulata, Terra Preta (KERN, et al., 2003), Terra Preta de Índio (TPI) (KAEMPF & KERN, 2003), Terra Preta Nova (SOMBROEK, et al., 2003) ou Terra Preta Arqueológica (TPA) (BROSSI, 2012).

Na Amazônia a TPI é utilizada para agricultura tradicional, pesquisas arqueológicas e antropológicas, estudos dos componentes físico-químicos (FALESI, 1969; BROSSI, 2012). Os solos de TPI tem alta fertilidade contrastando com os solos adjacentes da Região Amazônica que apresentam baixa fertilidade natural (COCHRANE & SÁNCHEZ, 1982). Os estudos apontam que a formação dos solos de TPI ocorreu pelo depósito progressivo de materiais e compostos orgânicos, como carvão vegetal, ossos e cerâmicas, que gradualmente modificaram as propriedades físicas e químicas desses solos, resultando, na conversão de solos Amazônicos relativamente inférteis em manchas altamente férteis (BROSSI et al., 2014; CARVALHO, 2015). O acúmulo de carbono pirogênico ou carvão, consequência da ação antrópica e de queimadas naturais datadas desde o período pré-colombiano, restos de materiais, como cerâmicas, carvão e artefatos líticos encontrados nessas áreas, resíduos de origem vegetal e

animal contribuíram exponencialmente para tornar o solo de TPI fértil (GLASER et al., 2001; MADARI et al., 2009; CARVALHO, 2015).

De acordo com HANDELSMAN et al., (1998); CARVALHO, (2015) a interferência antropogênica pode ter permitido o surgimento de microrganismos transitórios, que não pertenciam normalmente ao solo, mas que apareceram em condições favoráveis. Os microrganismos do solo realizam diversos processos biogeoquímicos, os quais influenciam diretamente na disponibilidade de nutrientes a partir da decomposição da matéria orgânica (DORAN & PARKIN, 1994). A produção, incorporação de nutrientes, biossíntese e biodegradação são amplamente dependentes de enzimas microbianas (BROSSI, 2012).

O acesso ao DNA microbiano total, incluindo os microrganismos não cultiváveis é possível por uma poderosa técnica chamada metagenômica (HANDELSMAN et al., 2008). Esta técnica possibilita a exploração da diversidade ecológica, o perfil metabólico dessas comunidades microbianas, além da possibilidade de identificação de novas biomoléculas com aplicabilidades biotecnológicas, através do uso de bibliotecas construídas de ácidos nucleicos isolados (STEELE et al., 2009; KIM et al., 2008).

3.6 Metagenômica

Os microrganismos desempenham papéis fundamentais em vários ecossistemas. Apesar do intenso estudo sobre suas funções, ecologia e diversidade, a grande maioria não foi bem caracterizada (HIRAOKA et al., 2016). O estudo simultâneo do DNA de uma comunidade inteira de microrganismos “cultiváveis e não cultiváveis” é conhecida como metagenômica (HANDELSMAN, 2004). De acordo com SCHLOSS & HANDELSMAN, (2008) metagenômica é a análise de uma variedade inestimável de genomas microbianos de cultivo independente, utilizando abordagens baseadas tanto na função quanto no sequenciamento de DNA. Assim, genoma microbiano total, isolado da natureza é chamado de metagenoma (LEE & LEE, 2013).

O termo metagenômica foi proposto pela primeira vez em 1998, por HANDELSMAN e colaboradores, a partir de uma série de procedimentos realizados para acessar o metabolismo de microrganismos desconhecidos no solo. Sua proposta era avançar na pesquisa em produtos naturais, partindo da ideia de que esse ambiente poderia constituir a maior fonte de recursos ainda intocados para a química de produtos naturais. No entanto foi STEIN e colaboradores (1996) os pioneiros a publicar algo na área, chamando de bibliotecas de DNA ambiental. Neste trabalho os autores analisaram um fragmento de DNA de 40 kb derivado de uma arqueia marinha (STEIN *et al.*, 1996).

A pesquisa realizada com genes codificadores de enzimas celulases por HEALY e colaboradores, no ano de 1995 foi o primeiro abordando o uso do termo DNA ambiental. Esta técnica faz análise direta de genomas contidos em uma amostra ambiental qualquer, tudo isso é possível graças aos avanços da biologia molecular e genômica, que lançaram as bases para a clonagem e análise funcional dos genomas coletivos da microflora do solo permitindo a construção de bibliotecas metagenômicas (GHURYE et al., 2016).

Em termos simples, uma biblioteca metagenômica, consiste no isolamento de DNA proveniente uma amostra ambiental qualquer, extração, purificação, amplificação de DNA, inserção do DNA em um vetor de clonagem adequado, transformação em um hospedeiro bacteriano, sequenciamento dos clones e posterior análise genômica. Esta baseia-se em dois tipos de análises, abordagem baseada na sequência e abordagem baseada na função gênica cujo objetivo é identificar genes que expressam enzimas ou uma via metabólica com possíveis aplicabilidades biotecnológicas (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003; JEONG et al., 2009).

BORNEMAN & TRIPLET, (1997) realizaram o primeiro estudo independente de cultivo prévio de microrganismo, analisando amostras de DNA total extraída do solo na região amazônica. Desde então, vários estudos metagenômicos estão sendo realizados em ambientes amazônicos.

De Terra Preta (LUCHETA et al., 2016; BROSSI et al., 2014; LEOMIL et al., 2007 dados não publicados). De água (OLIVEIRA-NEVES, 2013; CONRAD et al., 2014; SATINSKY et al., 2015; TESSLER et al., 2016; ZIELINSKY et al., 2016). Outras várias enzimas foram descobertas como Nitrato redutase (NOYCE et al., 2016), Halogenase e Dehalogenase (WEIGOLD et al., 2016), β -glicosidase (TAI et al., 2015; BERGMANN et al., 2014), Lipase (PETROVSKAYA et al., 2016; LEE et al., 2004; RONDON et al., 2000); Protease (NIEHAUS et al., 2011), Pectinase (SATHYA et al., 2014), Glicosiltransferase (WANG et al., 2014) entre outras.

3.7 Produção de enzimas por engenharia genética

A utilização da Tecnologia de DNA Recombinante conhecida modernamente como engenharia genética, têm sido amplamente empregada na produção de enzimas industriais (BROWN, 2003; BILAL & IQBAL, 2019). Essa técnica gerou a Biotecnologia moderna, que coloca os genes em funcionamento para a produção de proteínas recombinantes e de outros compostos necessários à medicina e aos diversos processos industriais (BROWN, 2003; BILAL & IQBAL, 2019). Os avanços nesta área permitiram a clonagem de numerosos genes de interesse e a manipulação de diferentes células (em especial as bacterianas e fúngicas), permitindo maior produção da enzima desejada (BROWN, 2003; ZIMMER et al., 2009; KHAN et al., 2016). A engenharia genética permite o melhoramento genético de espécies animais e vegetais com grande potencial biotecnológico através da clonagem molecular de genes, a qual consiste no isolamento de sequências de DNA específicas, recombinação *in vitro* e a propagação dessas moléculas (BROWN, 2003; ASTOLFI-FILHO et al., 2005).

A clonagem molecular compreende pelos menos duas etapas básicas: (1) o fragmento do DNA contendo o gene de interesse (inserto) é ligado à outra molécula de DNA chamado de vetor para produzir uma molécula de DNA recombinante; (2) A molécula do DNA recombinante é introduzida em uma célula hospedeira compatível, em geral, uma bactéria, por um processo chamado transformação genética. No interior da célula bacteriana, o vetor se multiplica-se, produzindo cópias idênticas. A célula que adquiriu a molécula do DNA exógeno é chamada de recombinante ou transgênico (BROWN, 2003; ASTOLFI-FILHO et al., 2005). De acordo com ZIMMER, (2009) as enzimas recombinantes obtidas a partir de técnicas moleculares, produzidas com alto nível de expressão, reduzem a necessidade de passos de purificação, tornando o processo mais eficiente na maioria das vezes.

4. OBJETIVO

4.1 Geral

Clonar e expressar a enzima β -glucuronidase na bactéria *Escherichia Coli* confirmando sua atividade enzimática.

4.2 Específicos

- Clonar o fragmento gênico da enzima β -glucuronidase (GUSB) no vetor pGEM-T e Subclonar no vetor de expressão pET28a (+);
- Realizar a expressão heteróloga do vetor recombinante pET28a_MES em *E. Coli* BL21(DE3) pLysS;
- Estimar a massa molecular da enzima β -glucuronidase por eletroforese SDS-PAGE;
- Determinar pH ótimo, Temperatura ótima da enzima β -glucuronidase recombinante
- Avaliar a termoestabilidade da enzima β -glucuronidase recombinante;
- Determinar os parâmetros cinéticos aparentes da β -glucuronidase recombinante produzida em *E. coli* BL21(DE3) pLysS.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Objeto de estudo

A enzima β -glucuronidase objeto deste trabalho foi isolada de uma Biblioteca Metagenômica de Solo de Terra Preta de Índio, construída previamente no Laboratório de Tecnologia de DNA – CAM – UFAM por LEOMIL *et al.*, 2007 em parceria com o Prof. Dr. Ricardo Henrique Kruger da Universidade de Brasília (UnB). Esta biblioteca é resultado do Projeto de Metagenoma de Microrganismos de Ambientes Naturais da Amazônia coordenado conjuntamente pelos Professores Spartaco Astolfi Filho e José Odair Pereira. Amostras de Terras Pretas de Índio (TPI) do Município de Presidente Figueiredo (AM) foram utilizadas para construir a Biblioteca Metagenômica. O DNA do solo foi extraído pelo método fenol clorofórmio, separado e purificado em gel agarose resolvido em eletroforese de campo pulsado (PFGE). Os fragmentos de DNA foram clonados em vetores fosmidiais, utilizando o sistema Copy Control™ Fosmid Library Production (EPICENTRE Biotechnologies) e inseridos em células de *Escherichia coli* EPI300 por transformação. A biblioteca foi obtida com grandes fragmentos de DNA (40 a 45 kb), com aproximadamente 10.000 clones (CARMO, 2017). A sequência gênica da GUSB de 1626 pb conhecida, foi confirmada através da ferramenta de bioinformática NCBI (Blastp) e pelo website ExPASy.

5.2 Linhagens bacterianas para Clonagem e Expressão.

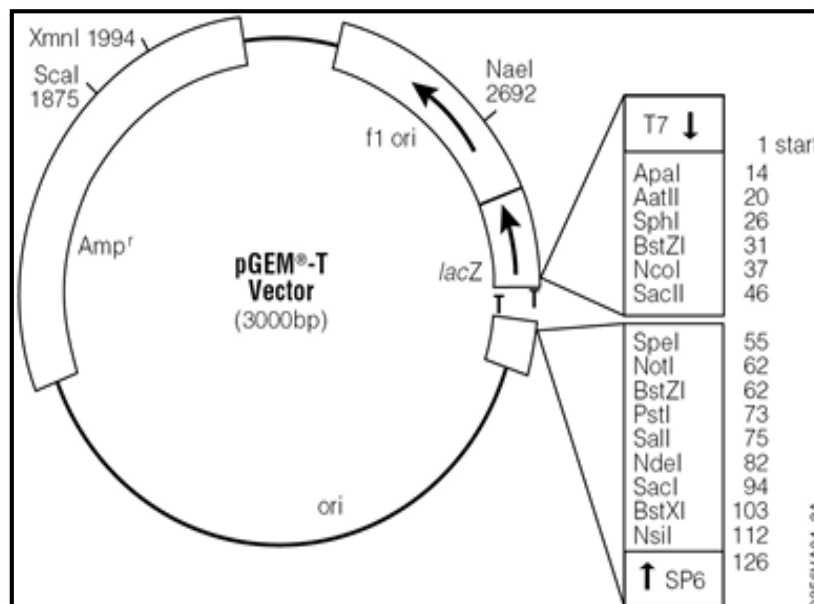
Neste trabalho foi utilizada a estirpe de célula de *Escherichia coli* DH5 α (F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96deoRnupG purB20* ϕ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169,*hsdR17 (rk⁻mk⁺), λ ⁻*) para clonagem, sendo que esta não possui resistência a antibióticos e a estirpe de célula *E. coli* BL21(DE3) pLysS (B F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)* λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7p07ind1 sam7 nin5*]) [*malB⁺*]_{K-12}(λ ^S) pLysS [*T7p20 ori_{p15A}*]) (Cm^R)) com resistência ao antibiótico clorafenicol para expressão da proteína recombinante. Essas linhagens compõem o acervo de células hospedeiras do Centro de Apoio Multidisciplinar e são conservadas por criopreservação a uma temperatura de -80° C na presença de glicerol a 50%.

5.3 Vetores utilizados neste trabalho para clonagem e expressão proteica respectivamente.

Existem diversas opções de vetores a serem utilizados para a clonagem e expressão. Neste trabalho, foi utilizado para a clonagem o plasmídeo pGEM-T (Figura 6). Para a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* foi utilizado o vetor pET (Plasmid for expression by T7 RNA Polimerase).

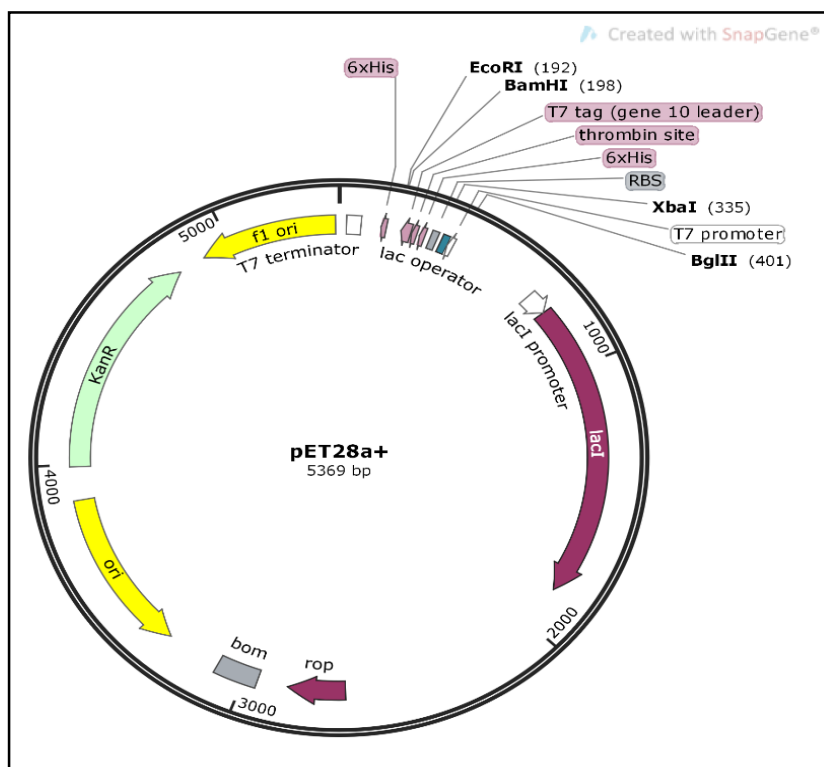
O vetor pET28a (+) (Novagen) foi utilizado para expressão da proteína β -glucoronidase em *E. coli*, sendo a indução da expressão feita por 1 mg/mL de IPTG. Este vetor contém o promotor T7, terminador T7, múltiplo sítio de clonagem, sequência que codifica tanto uma cauda N-terminal ou uma C-terminal contendo 6 histidinas (6xHisTag), com resistência à Canamicina (KanR). Este sistema foi desenvolvido para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, cuja expressão está sob o controle do promotor de transcrição bacteriófago T7 que é reprimido pela região operadora lac onde se liga o repressor lac (Figura 7). Para a utilização deste vetor é preciso transformá-lo em uma célula que possua o gene da T7 polimerase no cromossomo, como é o caso da *E. coli* BL21(DE3) pLysS.

Figura 6. Mapa físico do vetor de Clonagem pGEM-T (PROMEGA) múltiplo sítio de clonagem, sendo resistente à ampicilina.



Fonte: www.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-vector-systems/

Figura 7. Mapa físico do vetor de expressão pET-28a(+). O vetor contém o promotor T7, terminador T7, múltiplo sítio de clonagem, sequência que codifica uma cauda N-terminal e C-terminal contendo 6 histidinas (6xHisTag), sendo resistente à Canamicina.



Fonte: Fonte: Batalha Junior, (2018) com auxílio do programa SnapGene® Viewer, (2018).

5.4 Kits de Extração, Purificação e Enzima de Restrição

Para a extração plasmidial seguiu-se o protocolo do kit illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit. A purificação de bandas ocorreu por eletroforese em gel de agarose, sendo o DNA extraído da agarose seguindo o protocolo do kit illustra™ GFX™ PCR DNA and gel Band Purification Kit da GE Healthcare (USA).

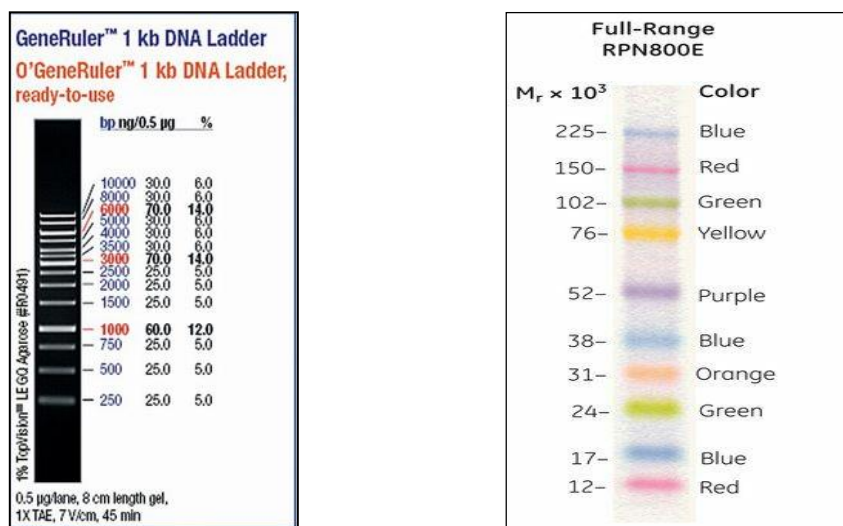
As endonucleases de restrição *Bgl*III (AGATCT), *Bam*HI (GGATCC), *Xba*I e *Eco*RI (GAATTC), a *T4 DNA ligase*, DNA Polimerase e os tampões utilizadas nas construções genéticas são provenientes da empresa *New England Biolabs*® Inc. (USA), todas as reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante.

O meio de cultura utilizado para o cultivo das bactérias transformantes e recombinante foi o meio Luria Bertani (LB) líquido, cuja composição para 1 litro são 10 g/L de Triptona, 0,5 g/L de Extrato de levedura, 5 g/L de Cloreto de sódio em pH 7. Para o meio sólido adicionamos 15 g/L de Ágar. Todos meios de cultura foram autoclavados a 120 °C por 15 minutos.

5.5 Marcador Molecular

O marcador para peso molecular de DNA utilizado neste estudo foi o Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder, ready-to-use da Thermo Scientific (USA) para gel de agarose e para o gel de proteína SDS-PAGE foi utilizado o marcador Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers - GE Healthcare - RPN800E para o gel de proteína SDS-PAGE.

Figura 8. Marcadores molecular em pb de DNA (1) e massa molecular em kDa de proteína (2).



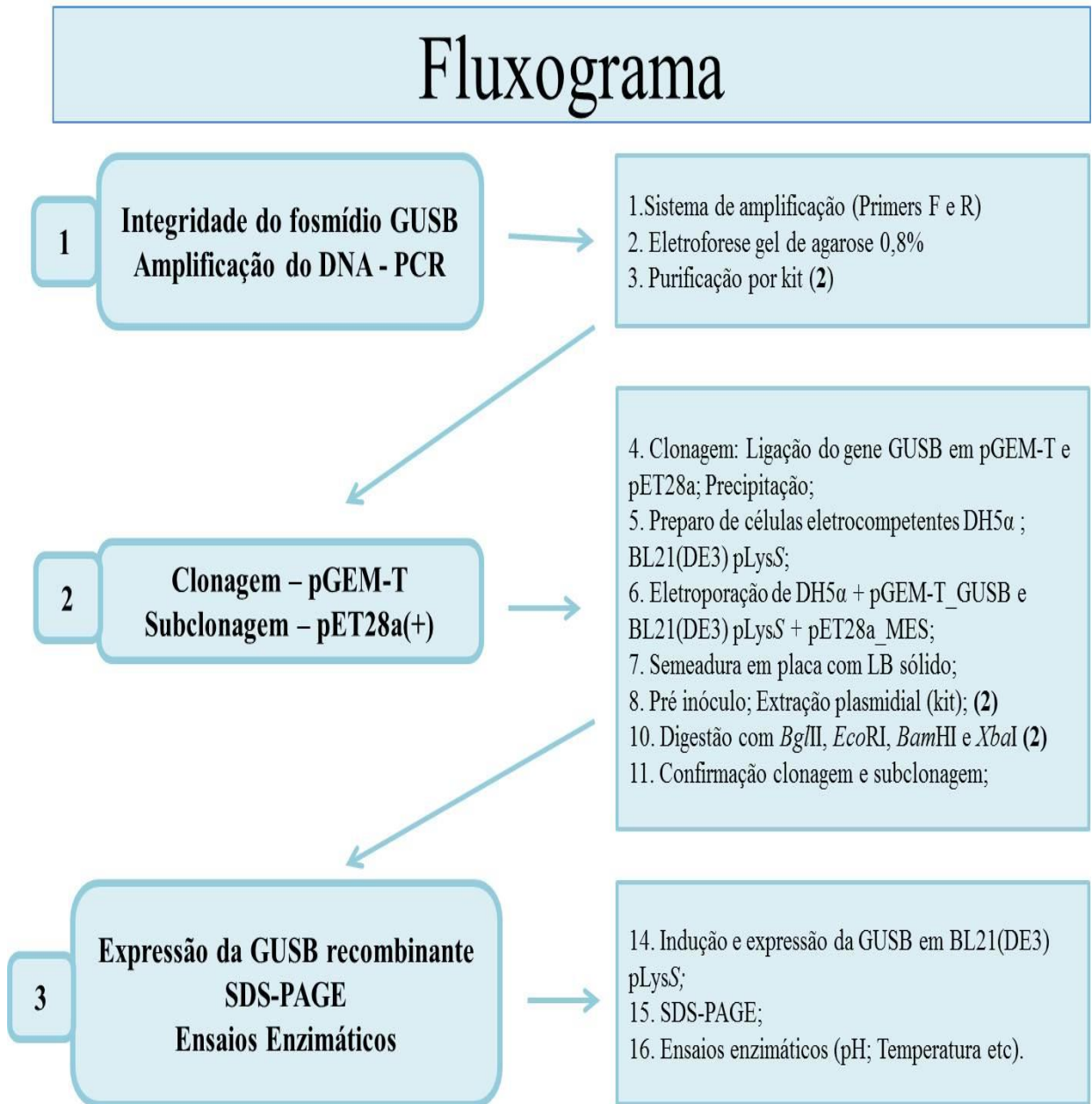
1. Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder.

2. Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular

5.6 Métodos

As metodologias e análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologias de DNA, Laboratório de Microbiologia Industrial do Centro de Apoio Multidisciplinar/Divisão de Biotecnologia e Laboratório de Proteômica da Universidade Federal do Amazonas. A sequência codificadora da enzima β -glucuronidase, isolada da Biblioteca Metagenômica de TPI, está depositada no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas. As etapas desenvolvidas neste trabalho para a conclusão dos objetivos estão esquematizadas no fluxograma que segue abaixo (Figura 9). Resumidamente, dividimos em três etapas distintas como a Amplificação gênica por PCR na primeira etapa; Clonagem e Subclonagem da sequência codificadora da GUSB em vetores de clonagem e expressão na segunda etapa e terceira etapa com a expressão enzimática, determinação da massa molecular da proteína por SDS-PAGE e caracterização enzimática preliminar. As atividades desenvolvidas estão numeradas de 1 a 13 e os números que aparecem em negrito ao lado de cada metodologia indicam atividades que se repetiram (Figura 9).

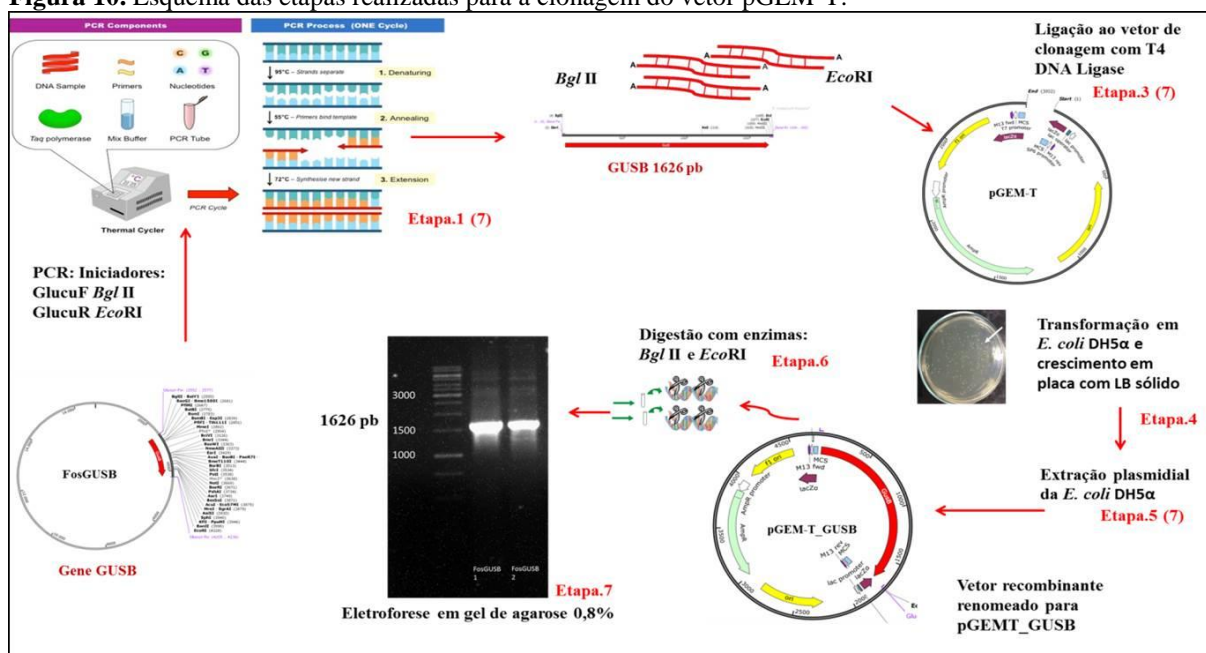
Figura 9. Fluxograma das metodologias realizadas neste trabalho para a conclusão dos objetivos.



5.6.1 Clonagem e subclonagem da GUSB em vetores pGEM-T e pET28a(+)

O esquema abaixo (Figura 10) resume as etapas realizadas para a clonagem e as mesmas etapas foram seguidas para subclonar o fragmento gênico da GUSB no vetor de expressão com algumas modificações nas enzimas utilizadas e ausência da etapa de PCR. Os mapas físicos dos vetores recombinantes foram elaborados com auxílio do programa SnapGene, (2018).

Figura 10. Esquema das etapas realizadas para a clonagem do vetor pGEM-T.



Fonte: Batalha Junior, (2018)

5.6.2 Amplificação da GUSB pela técnica de PCR

O fosmídeo contendo a sequência nucleotídica do gene da enzima β -glucuronidase (GUSB) chamado “FosGus” foi amplificado pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (primers *forward* e reverse) GlucuF 5'- GCAAGATCTATGCCGGCGAGCTACAAC - 3' (cria sítio de restrição, sequência reconhecida pela enzima endonuclease de restrição *Bgl*III - A'GATCT) e GlucuR 5'- GCAGAATTCTCACGTTCTTCAAGCTTAAATG - 3' (cria sítio de restrição, sequência reconhecida pela endonuclease de restrição *Eco*RI - G'AATTC) que amplificam a sequência codificante de 1626 pares de bases para a clonagem no vetor pGEM-T. A reação PCR foi realizada utilizando duas concentrações de DNA (FosGUS) 1 ng e 5 ng, tampão 1X, MgCl₂ 0,4 Mm, dNTPs 0,2 mM, 0,3 pmol de cada iniciador e 2,0 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) em um volume final de 25 μ L. A reação de polimerização seguiu a seguinte programação, desnaturação inicial a temperatura de 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores com as fitas moldes na temperatura de 55 °C por 30 segundos, extensão das novas fitas por 2 minutos a 68 °C e

um passo de extensão final de 2,5 minutos a 68 °C. Os produtos de amplificação (PCR) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e visualizados em luz ultravioleta (UV) para confirmação de amplificação de DNA.

5.6.3 Purificação do produto amplificado por PCR

Após amplificação do fragmento gênico GUSB e confirmação do tamanho esperado de 1626pb, foram usadas 25 μL do produto da PCR e aplicado em gel de agarose, conforme descrito anteriormente. Após eletroforese as bandas de interesse foram excisadas com lâminas de bisturi estéreis e purificadas utilizando o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and gel Band Purification Kit da GE Healthcare (USA). Os produtos da purificação pelo kit foram analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e visualizados em luz ultravioleta (UV) para confirmação da purificação de DNA bem como sua qualidade.

5.6.4 Clonagem e Precipitação do Sistema de Ligação

Para a clonagem foi selecionado o sistema pGEM-T (Promega) que tem como característica um plasmídeo linear com uma deoxitimidina (T) em cada uma das suas extremidades 3' e que permite a inserção direta de produtos de PCR adenilado, formando assim um plasmídeo recombinante a ser introduzido posteriormente dentro da bactéria *E. coli* DH5 α visando a multiplicação plasmidial. Após a purificação, o gene da GUSB foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T com a utilização da enzima T4 DNA ligase, conforme orientação estabelecida no protocolo do fornecedor (Promega). O sistema de ligação foi montado para o volume final de 10 μL , onde foram utilizados 0,5 μL de H₂O deionizada, 5 μL de tampão T4 DNA ligase (10X), 1 μL do vetor (50 ng/ μL), 2,5 μL do produto da PCR (80 ng/ μL) e 0,5 μL de T4 DNA ligase incubado a 16°C durante 18 horas. A razão 1:3 (vetor:inserto) foi empregada em concentração em massa em ng de DNA. O sistema foi purificado por precipitação para concentração do sistema (DNA do vetor pGEM-T + GUSB, assim como o sistema pET-28a + GUSB) e eliminação das impurezas para transformação genética. Para purificação o sistema de ligação inicialmente foi transferido para um microtubo estéril de 1,5 mL. Neste microtubo foram adicionados 3 μL de glicogênio, adicionando 1/10 volume de NaCl (3 M) e completando com 2,5 x o volume de etanol 100% PA absoluto. O sistema de ligação com os respectivos reagentes foram incubados por 1 hora a 4°C e centrifugado a 12000 rpm a 4 °C por 15 minutos. Após a centrifugação foi adicionado no sistema de ligação, 1 mL de etanol 70% gelado cuidadosamente pelas bordas do microtubo. Em seguida o sistema foi centrifugado por 12000 rpm, 4°C por 10 minutos e então retirado o excesso de álcool do microtubo em fluxo laminar.

O tubo contendo o DNA foi ressuspensão em 6 μL de H_2O deionizada e deixado para eluição por 2 hora a 37 °C.

5.6.5 Preparo de células eletrocompetentes

Células de *E. coli* DH5 α cresceram overnight a 37°C em meio LB líquido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) para serem preparadas para eletrocompetência e possibilitar melhor transformação. Para tal, foi inoculado em 5 mL de meio LB uma colônia da bactéria e mantida em agitação constante overnight a 37°C. Após passadas 16 horas de crescimento, foi retirado 0,2 mL do meio celular e inoculado em 200 mL de meio LB sob agitação constante a 37°C para atingir $\text{O.D}_{600} = 0,6$ a 0,7. Atingindo a densidade óptica estabelecida, a cultura bacteriana foi mantida em gelo durante 40 minutos e posteriormente separada em tubos tipo *falcon* cada um contendo 50 mL da cultura e então centrifugados a 4000g durante 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspensionado gentilmente com 20 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Em seguida os tubos foram submetidos à nova centrifugação de 4000 g durante 10 minutos a 4° C, o sobrenadante foi descartado e ressuspensionado em 20 mL de glicerol 10% estéril e gelado, este procedimento foi realizado 3 vezes consecutivas. O pellet celular obtido ao final desta etapa foi ressuspensionado gentilmente em 1 mL de glicerol 10% gelado e estéril e retiradas alíquotas de 80 μL em microtubos de 600 μL que foram congelados e estocados em freezer a -80 °C, até serem utilizados. Este procedimento foi realizado nas *E. coli* DH5 α e BL21(DE3) pLysS.

5.6.6 Transformação bacteriana por eletroporação

Após a ligação da GUSB nos vetores pGEM-T (clonagem) e pET28a (expressão de proteínas), estes foram submetidos a eletroporação nas estirpe DH5 α e BL21(DE3) pLysS. Essa técnica consiste na aplicação de impulsos elétricos a fim de desestabilizar a membrana externa das células provocando a formação de poros nessas estruturas que permitem a entrada do DNA exógeno para o citoplasma da bactéria hospedeira (DE-SOUZA *et al.*, 2016).

Na transformação bacteriana, alíquotas de 80 μL de células eletrocompetentes que estavam estocadas a -80 °C, foram degeladas em gelo, após uns 20 minutos seguidos foi adicionado 2 μL do sistema de ligação gentilmente e deixado por 15 minutos. Foram feitos dois sistemas nas transformações realizadas com as *E. coli* DH5 α e BL21(DE3) pLysS (2 μL do vetor intacto + 80 μL de células competentes e 2 μL do vetor com inserto + 80 μL de células competentes). O conjunto foi transferido para uma cuveta *BIO-RAD* de eletroporação

(0,2 cm) e submetidos a 1900 kV durante 5 milissegundos. Após os conteúdos foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 500 µL de meio LB e incubando à 37°C por 60 minutos com agitação de 150 rpm para a recuperação das células e para expressão do gene de resistência ao antibiótico. Em seguida alíquotas da suspensão de células (25, 50, 100, 200 µL) com auxílio da alça de Drigalsky, foram plaqueadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo o antibiótico correspondente (ampicilina 100 ng/mL (pGEM-T) e canamicina 50 ng/mL (pET-28a)), indutor da expressão proteica IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) e substrato cromogênio X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopiranosídeo), usado como marcador de colônias de bactérias transformadas com plasmídeo com o gene *lacZ* truncado, no sistema branco/azul. Ao final do plaqueamento as placas foram incubadas invertidas a 37°C overnight para posterior visualização do crescimento bacteriano e seleção dos clones transformantes através da resistência a ampicilina conferida pela introdução do plasmídeo. Após o período de incubação acima, colônias brancas resistentes ao antibiótico (possíveis recombinantes ou clones positivos) foram selecionadas para repique.

5.6.7 Extração plasmidial e Análise de restrição

As colônias transformantes foram repicadas, individualmente em tubos com 5,0 mL de meio LB com 5 µL de ampicilina (100 mg/mL) (pré-inóculo) e incubados sob agitação de 150 rpm, a 37°C, por 16 horas. A extração do DNA plasmidial foi realizada através do kit comercial illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA plasmidial foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5µg/mL). Como marcador de peso molecular foi usado o *Ladder* de 1Kb (Invitrogen) as imagens foram fotodocumentadas usando o *software* Major Science. A quantificação do DNA plasmidial foi realizada no espectrofotometro NanoDrop 2000c (*Thermo Scientific*). A confirmação da clonagem se deu por análise de restrição com as endonucleases *Bgl*III e *Eco*RI que flanqueiam a região estrutural do fragmento gênico.

A reação de restrição foi preparada com 1 µL de tampão de enzima 3.1 (10x), 1,0µL *Eco*RI, 1 µL *Bgl*III (BioLabs), 3 µL de DNA plasmidial, água ultrapura para completar o volume de 10 µL incubada por 2 horas a 37° C. A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio 0,5µg/mL, com marcador de peso molecular foi usado o *Ladder* de 1Kb e as imagens foram fotodocumentadas usando o *software* Major Science. A banda correspondente a 1626pb do gene da proteína recombinante GUSB foi excisada do gel

de agarose e purificada usando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE) e concentrado e purificado por precipitação como no item 5.4.

5.6.8 Preparo do plasmídeo pET-28a (+) para Subclonagem

O vetor de expressão pET-28a (+) foi linearizado por dupla restrição com as endonucleases de restrição *Bam*HI (5U) 3 μ L e *Eco*RI (5U) 3 μ L ambas da *BioLabs*, usando 8 μ L de tampão de enzima 3.1, na concentração de 1X, 12 μ L de DNA (37 ng/ μ L) plasmidial, e água ultrapura para completar o volume de 60 μ L. Depois de montado, o sistema foi incubado por 3 horas a 37° C. O resultado foi analisado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e visualizados em luz ultravioleta (UV). Depois de confirmado a linearização do vetor, o mesmo foi excisado do gel e purificado usando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE). Para confirmar a eficiência da purificação, os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e visualizados em luz ultravioleta (UV).

5.6.9 Subclonagem da GUSB no plasmídeo pET-28a (+) e transformação

Para a ligação do fragmento codificante da GUSB ao vetor de expressão pET28a (+) (figura xx) foram ligados usando o seguinte sistema de ligação: 4,0 μ L inserto (80 ng/ μ L), 2,0 μ L pET28a (+) (50 ng/ μ L), 1,5 μ L Tampão 3.1 (10X), 1 μ L T4-DNA Ligase durante 24 horas a 16°C. O sistema após a ligação foi necessário purificar por precipitação para concentração do sistema para posterior transformação genética. Foram utilizadas na transformação genética, células eletrocompetentes e *E. coli* DH5 α para a nova propagação plasmidial. O procedimento empregado na transformação das células competentes *E. coli* DH5 α no vetor de expressão pET-28a (+), assim como a transformação do vetor recombinante pET-28a_MES em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS foi o mesmo descrito anteriormente no item 5.6.6. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora com agitação (150 rpm) para estabilização e revigoramento. Em seguida, alíquotas dos sistemas foram plaqueadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo o antibiótico canamicina (50 μ g/mL). Ao final do plaqueamento as placas foram incubadas invertidas a 37°C overnight.

Uma observação importante a ser dita é que o fragmento gênico da β -glucuronidase, foi liberado do vetor pGEM-T utilizando as endonucleases de restrição *Bgl*III e *Eco*RI. E a linearização do vetor pET-28 a (+) foram utilizadas as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. O sítio de restrição da enzima *Bgl*III criado no fragmento gênico da β -glucuronidase reconhece o sítio de restrição da enzima *Bam*HI criado no vetor pET-28a (+), com essa ligação houve a

perda dos sítios de restrição da enzima *Bam*HI do vetor pET28a(+) e do sítio de restrição *Bg*III do gene GUSB. O sítio da enzima *Eco*RI foi restaurado.

5.6.10 Confirmação da subclonagem do vetor recombinante pET28a _MES

Os clones transformantes crescidos nas placas de Petri foram analisados e submetidos à pré-inóculos (5 mL de meio LB líquido) por 150 rpm por 37°C durante a noite. A cultura bacteriana crescida foi submetida à extração plasmidial pelo kit illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit. O resultado foi analisado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados em luz ultravioleta (UV). Após o resultado o plasmídeo recombinante foi renomeado para pET-28a_MES (Figura 16). Para confirmação da clonagem e analisando o mapa do plasmídeo pET-28a(+), verificou-se a existência de um sítio de restrição da enzima de restrição *Xba*I a montante do promotor T7. Neste caso se utilizássemos as enzimas de restrições *Xba*I e *Eco*RI, retiraríamos somente a GUSB para confirmação da subclonagem. Baseada nesta estratégia foi realizada a digestão com as enzimas *Xba*I e *Eco*RI para liberação da GUSB. Foi montada a reação analítica da digestão do vetor recombinante com os seguintes componentes: DNA do vetor pET28a (+) _MES: 4 µL; tampão 1x 3.1: 1 µL; enzima *Xba*I e *Eco*RI: 0,5 µL de cada e completado com H₂O para o volume final de 10 µL. Após montada a reação analítica, o sistema também foi incubado por 3 horas a 37° C e o resultado analisados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,1µg/mL) visualizados em luz ultravioleta (UV).

5.6.11 Expressão da GUSB recombinante em BL21 (DE3) pLysS

Uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformada com plasmídeo recombinante foi transferida para 5,0mL de meio LB líquido contendo 50 µg/mL de antibiótico Canamicina. Essa cultura foi incubada a 37°C sob agitação contínua por 16 horas. Em seguida, 200 µL dessa cultura foram transferidos para 20 mL de meio LB líquido contendo antibiótico Canamicina 50 µg/mL e glicose 1%, incubando a 37° C até atingir a O.D_{600nm} (densidade óptica) de 0,6 a 0,7. Ao atingir esta faixa foi adicionado 1mM de IPTG para fazer a indução e a cultura foi incubada por 8 horas a 37 °C. Após este período, 1mL da cultura foi centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao *pellet* 100µl de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE (Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 300 mM, 2mM β-mercaptoetano 15%, azul de bromofenol 2%, Triton X-10, 0,5% e glicerol 10%). Em seguida, a amostra foi ressuspenso e fervida por 5 minutos para posterior análise por eletroforese em gel de SDS-PAGE solução de Comassie-*blue* (SAMBROOK *et al.*, 2001). O controle negativo foi uma colônia de BL21(DE3) pLysS transformada com o vetor pET-28a

intacto. O controle positivo foi uma colônia de BL21(DE3) pLysS transformada com plasmídeo pGSM_TGH que produz o hormônio de crescimento do tambaqui com massa molecular de 23 kDa.

5.6.12 Gel de SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, também conhecida como SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) é comumente usada, para estimar a massa molecular de proteínas com precisão de até 95% (DE-SOUZA *et al.*, 2016; SAMBROOK *et al.*, 1989). Nesta técnica utilizamos um detergente aniônico forte SDS, em combinação com um agente redutor β -mercaptoetanol e aquecimento das amostras a 100 ° C. Nestas condições as proteínas da amostra dissociam, preservando apenas as cadeias primárias que se ligam ao SDS tornando-se carregadas negativamente (SAMBROOK *et al.*, 1989; DE-SOUZA *et al.*, 2016). A análise eletroforética de gel SDS-PAGE foi realizada utilizando o sistema de minigéis *Mini-protean* da BioRad. A análise das proteínas recombinantes secretadas foi realizada em malha de acrilamida a 12%. Após a indução da expressão da GUSB, foi recolhido 1 mL de meio da cultura, centrifugada a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C, descartando o sobrenadante. O pellet foi ressuspenso em 150 μ L tampão de amostra 1X (200 mM Tris pH 6,8; 0,1% azul de bromofenol p/v; 4% SDS v/v; β -mercaptoetanol; 20% glicerol v/v) para SDS-PAGE e fervida por 5,0. As amostras foram aplicadas em um sistema de gel concentrador de 5,0% e separador de 12%. O gel foi polimerizado em placa de vidros em sistema vertical, usando tampão de corrida Tris-Glicina (50mM Tris, pH 8,6 1,92M glicina e 1% SDS).

A migração eletroforética ocorreu nas condições de 200 V, 30 w e 15 mA durante 80 minutos em tampão de corrida Tris-glicina 1x (Tris-base 25 mM, glicina 250 mM e SDS 0,1%). Finalizada a corrida, o gel foi corado em solução Coomassie Blue R-250 2,5% (USB Corporation) durante 60 minutos. Em seguida, o gel foi lavado em água ultrapura e descorado em solução descorante (água/metanol/ácido acético nas porcentagens 4,5/4,5/1,0 v/v/v) até atingir um contraste desejado para capturar a imagem via *scanner* (ImageScanner GE Healthcare – USA). A massa molecular da proteína obtida foi comparado com padrão de peso molecular Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers - GE Healthcare - RPN800E (SAMBROOK *et al.*, 2001). Esta análise possibilitou a detecção de produção da GUSB por clones de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, assim como a massa molecular da proteína expressada.

5.6.13 Obtenção do extrato enzimático e teste rápido para detecção de atividade

O extrato enzimático foi obtido após a indução da expressão com IPTG 1mM em 20mL de LB líquido por 8 horas a 37 °C em agitação de 180 rpm. Após esse período foi retirado amostras de 1,5 mL das culturas, a mesma foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e adicionado mais 1,5 mL da respectiva cultura repetindo a centrifugação. Após o descarte do sobrenadante foi adicionado 70 µL de clorofórmio (lise celular) para ressuspender o *pellet* de forma que dissolvesse totalmente e deixado à temperatura ambiente por 15 minutos. Passados os 15 minutos, foi adicionado 100 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7, onde misturou-se por inversão e por último a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado para evitar tirar o *pellet* e/ou o clorofórmio que ficou embaixo, sendo armazenados e estocado em tubo tipo *falcon* de 15 mL até serem utilizados nos ensaios enzimáticos. Em microtubos de 2 mL ou em placas foram adicionados 100 µL de tampão fosfato (100 mM, pH 7), 10 µL de cromogênio 5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal 20 mg/mL) que foi utilizada para função análoga ao sistema de colônia branco/azul e 10 µL extrato enzimático. O sistema foi incubado a 37 °C por 30 minutos. Passados os 30 minutos observou-se a formação de coloração azulada no fundo do microtubo e nas placas indicando que a enzima estava ativa. O controle (branco) desse experimento foi tampão com o X-gal sem o extrato enzimático.

5.6.14 Ensaios enzimáticos

Os ensaios enzimáticos iniciais para avaliar a atividade da β-glucuronidase recombinante produzida por BL21(DE3) pLysS empregaram o cromogênico X-gal 20 mg/mL (5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) da Thermo Scientific #R0941 como substrato. Para montagem dos sistemas das reações foram empregados 50 µL do extrato bruto enzimático, 10 µL X-gal (20 mg/mL) diluído em 100 µL do tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7 (JEFFERSON, 1987) no branco dos ensaios eram utilizados somente o tampão com o X-gal sem o extrato enzimático. A mistura foi mantida em banho a 50 °C por 40 minutos, o volume foi completado para 1,5 mL de água destilada e ao final analisado por métodos espectrofotométricos no comprimento de onda 650_{nm} de acordo com (ZHANG *et al.*, 2012). Todos os ensaios foram montados nas mesmas condições e em triplicata. Os valores de absorbância dos brancos da enzima e do substrato foram subtraídos dos valores de absorbância das triplicatas experimentais.

A atividade enzimática foi determinada pela concentração de 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo utilizando a fórmula $C = A/\epsilon.l$.

Em que:

C= concentração do produto de reação enzimática

A= Absorbância em 650 nm

$\epsilon = 1,04 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Coeficiente de absorvidade molar do 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo em 650 nm - Li, 2010)

l = caminho óptico (comprimento da cubeta)

5.6.15 Cinética de reação

As condições básicas de reações foram estabelecidas utilizando 25, 50 e 100 μL o volume de extrato bruto enzimático e durante 60 minutos com medida da atividade enzimática a cada 10 minutos.

5.6.16 Efeito do pH sobre a atividade enzimática da GUSB: determinação do pH ótimo da atividade catalítica

A determinação do pH ótimo da atividade da β -glucuronidase recombinante foi realizada medindo a atividade enzimática em soluções tampão com pH diferentes. Neste ensaio foi utilizado o tampão citrato-fosfato (Na_2HPO_4 0,2 M; ácido cítrico 50 mM) com pH variando de 2 a 10 adaptado de McIlvane, (1921). O hidróxido de sódio (NaOH) foi usado para ajustar os valores de pH das soluções com pH 8,0 a 10. O ensaio foi realizado em triplicata nas condições padrões utilizando 50 μL de tampão citrato-fosfato pH 2 a 10, 50 μL de extrato enzimático bruto e 10 μL do substrato X-gal 20 mg/mL. A mistura foi incubada a 50 °C durante 40 min, a reação foi paralisada em banho de gelo/água e realizada leitura a 650 nm em espectrofotômetro.

5.6.17 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da GUSB

Para este experimento foi analisada a atividade da β -glucuronidase recombinante em função da temperatura de reações de 20 a 99,5 °C. O ensaio foi realizado nas condições padrões por espectrofotometria, utilizando o tampão fosfato de sódio (100 mM) no pH 7 determinado ótimo para atividade glicosídica sobre o X-gal (20 mg/mL).

5.6.18 Estabilidade térmica da enzima β -glucuronidase Recombinante

Na avaliação da estabilidade térmica da GUSB o extrato enzimático foi incubado até 60 minutos a 40 °C. Nesta avaliação o extrato enzimático foi incubado nas dadas temperaturas e a cada 10 minutos eram feitas coletas de amostras para a dosagem da atividade enzimática sobre o X-gal, nas condições padrões do ensaio.

5.6.19 Determinação de K_m e V_{max} aparentes da GUSB

Para a caracterização das constantes catalíticas e parâmetros cinéticos, o ensaio enzimático foi realizado utilizando concentrações variáveis de ordem crescente do substrato X-gal, fixando os valores ótimos de pH e temperatura determinados. As concentrações de X-gal variaram de 2 mg/mL a 20 mg/mL. O ensaio de atividade enzimática foi realizado nas condições padrões para enzima e os dados foram utilizados para plotar um gráfico dos duplos recíprocos que determina os valores aparentes de K_m e $V_{máx}$ da enzima.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência gênica da GUSB de 1626 pb conhecida, foi confirmada através da ferramenta de bioinformática NCBI (Blastx) onde, não foi possível afirmar a qual organismo pertence, mas aponta a enzima como uma β -glucuronidase com pontuação máxima e total de 539, cobertura de 98 %, e-value de 0.0 e identidade maior de 47,12 %. Foi realizado ensaio *in silico* pelo website Expasy.org/translate/ e Expasy.org/comput_pi/, predizendo a massa molecular de 61 kDa, Ponto Isoelétrico de 10.47 para uma sequência de 541 resíduos de aminoácidos.

6.1 Confirmação da amplificação da GUSB do fosmídeo “fosGUSB” por PCR

Antes da amplificação da GUSB pela PCR, foi verificado a integridade do FosGUSB como pode ser observado no gel de agarose 0,8% está bem conservado (Figura 11).

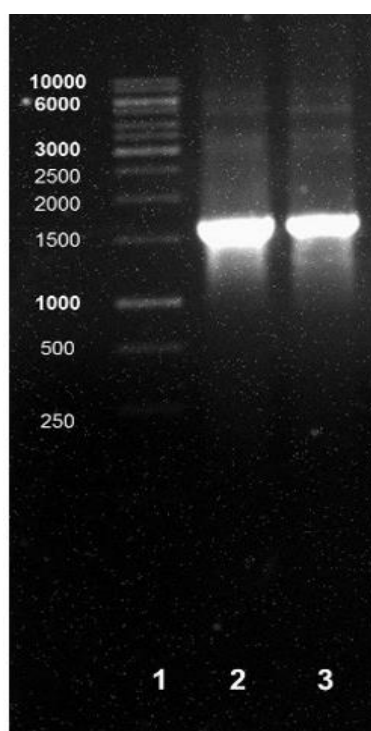
Figura 11. Fosmídeo com gene da GUSB Intacto em gel agarose 0,8%.



Fonte: Batalha Junior, (2018).

Após confirmação, foi realizada a reação de amplificação seguindo o protocolo do kit de PCR (reação em cadeia da polimerase) descrito no item 5.6.2. O produto da amplificação por PCR utilizando o fosmídeo nomeado “fosGUSB” possui 1626 pb de tamanho (Figura 12), foram utilizados iniciadores Glucu Fw e Glucu_Rv (Item 5.6.2) para criarem sequências reconhecidas pelas enzimas de restrição *Bgl*III e *Eco*RI respectivamente utilizadas para análise de restrição do fragmento gênico da GUSB no vetor pGEM-T. As duas amostras foram purificadas e quantificadas por nanodrop, apresentando concentração aproximada de 80 ng/μL, em seguidas foram ligadas ao vetor de clonagem e verificadas em gel de agarose 0,8%.

Figura 12. Amplificação do gene GUSB por PCR. 1: Marcador Molecular Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb; 2 e 3: Fragmentos gênicos da GUSB amplificada por PCR.



Fonte: Batalha Junior, (2018).

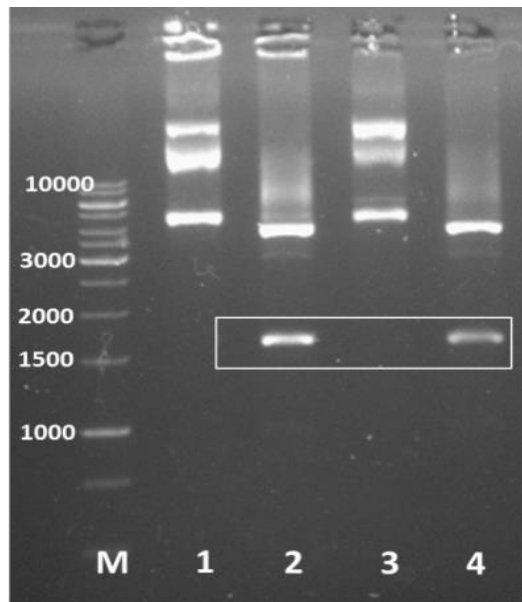
6.2 Confirmação da Clonagem do Sistema pGEM-T_GUSB

Uma alíquota do sistema de ligação (gene GUSB + vetor pGEM-T) após concentrado foi inserido em células de *Escherichia coli* DH5α eletrocompetentes para multiplicação do plasmídeo e confirmação por análise de restrição (Figura 13). Dos clones transformantes e recombinantes que apresentaram resistência ao antibiótico ampicilina, foi extraído o DNA plasmidial e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5μg/mL). Nas canaletas 1 e 3 está o sistema pGEM-T + GUSB intactos, nestas podem ser observados as 3 topologias diferentes e comuns em plasmídeos (LIMA, 2008). A forma mais

relaxada (menos condensada) fica mais acima do perfil de banda do marcador de 1kb. A topologia superenrolada (mais condensada) aparece mais em baixo entre as bandas de 4000 a 5000 pb. Nas canelatas 2 e 4 está o sistema pGEM-T + GUSB digeridos com as enzimas de restrição *Bgl*III e *Eco*RI, apresentando duas topologias linearizadas, a do vetor em cima e do fragmento liberado pela dupla digestão mais abaixo.

O fragmento liberado possui um padrão de banda acima um pouco do perfil de 1500 pares de bases apresentado pelo marcador, indicando que este padrão de banda seja da sequência gênica da GUSB que possui 1626 pb (Figura 13).

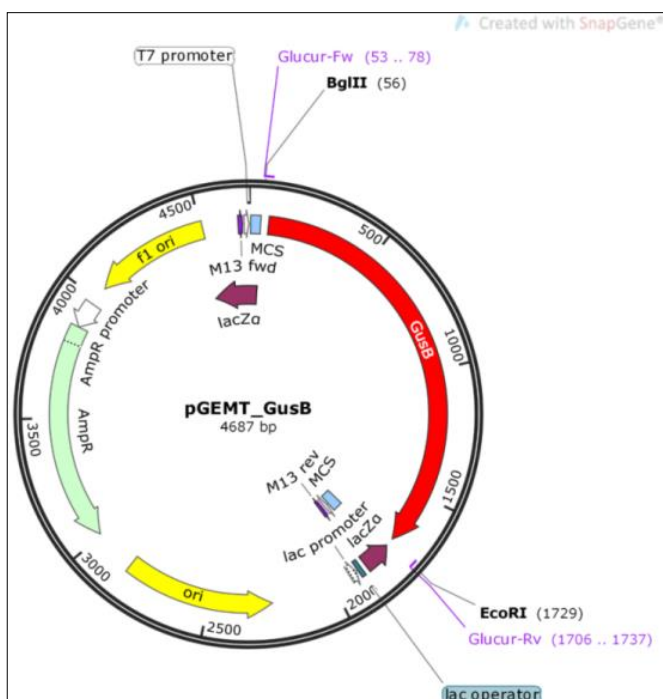
Figura 13. Perfil eletroforético dos produtos da digestão dupla pelas enzimas *Bgl*III e *Eco*RI. M= Marcador Molecular Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb .1. pGEM-T + GUSB intacto. 2. pGEM-T + GUSB com *Bgl*III e *Eco*RI. 3. pGEM-T + GUSB intacto.4 pGEM-T + GUSB com *Bgl*III e *Eco*RI.



Fonte: Batalha Junior, (2018).

Após a confirmação da clonagem, o vetor recombinante foi renomeado para pGEM-T_GusB e o mapa físico foi elaborado no programa SnapGene (Figura 14).

Figura 14. Mapa físico do plasmídeo recombinante renomeado para pGEM-T_GusB, destacando as regiões de criadas pelas enzimas de restrições *Bgl*III e *Eco*RI nas extremidades do fragemento gênico da GUSB, multi sitio de clonagem, marcador de seleção pela ampicilina, origem de replicação e seu promotor LacZ.



Fonte: Batalha Junior, (2018)

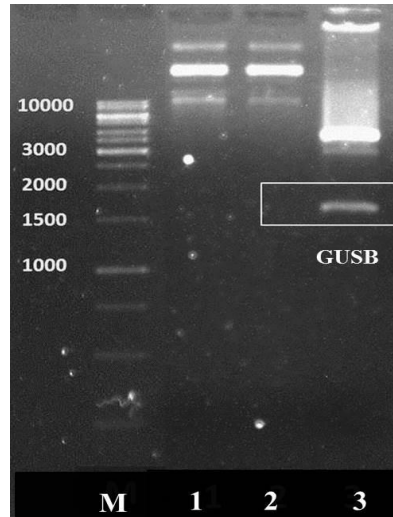
6.3 Confirmação da subclonagem por análise de restrição

No perfil eletroforético do gel de agarose a 0,8% do sistema de digestão, na canaleta 1 e 2 temos os sistemas de subclonagem pET-28a + GUSB (recombinante) intacto apresentando diferentes topológica típicas de plasmídeos (LIMA, 2008). Na canaleta 3 temos o fragmento gênico liberado pela restrição com *Xba* I e *Eco*RI um pouco acima altura de 1500 pb do marcador 1kb, supondo que seja o fragmento gênico da GUSB recombinante. Analisando as localizações dos sítios reconhecidos pela *Bgl*III no vetor pET28a, este sítio está antes do promotor T7 (Figura 7).

Na expressão heteróloga da GUSB, não foi utilizada a enzima *Bgl*III, pois uma digestão por restrição dupla com *Bgl*III e *Eco*RI, retira o promotor T7 do vetor de expressão pET28a. Como as enzimas *Bgl*III e *Bam*HI criam regiões reconhecidas para restrição de ambas (GATC), optou-se por linearizar o vetor pET28a com *Bam*HI. No entanto, quando *Bam*HI é ligada no sítio de *Bgl*III, os sítios de restrição das duas enzimas são destruídos. Para confirmar a subclonagem através da liberação do fragmento gênico da GUSB de 1626 pb do vetor pET28a, foi utilizada a enzima *Xba*I que está dentro do múltiplo sítio de clonagem. Desta forma foi possível confirmar a subclonagem da GUSB no vetor de expressão, como pode ser observado,

o fragmento gênico da GUSB de 1626 pb está um pouco acima do perfil de banda de 1500 pb do marcador (Figura 15).

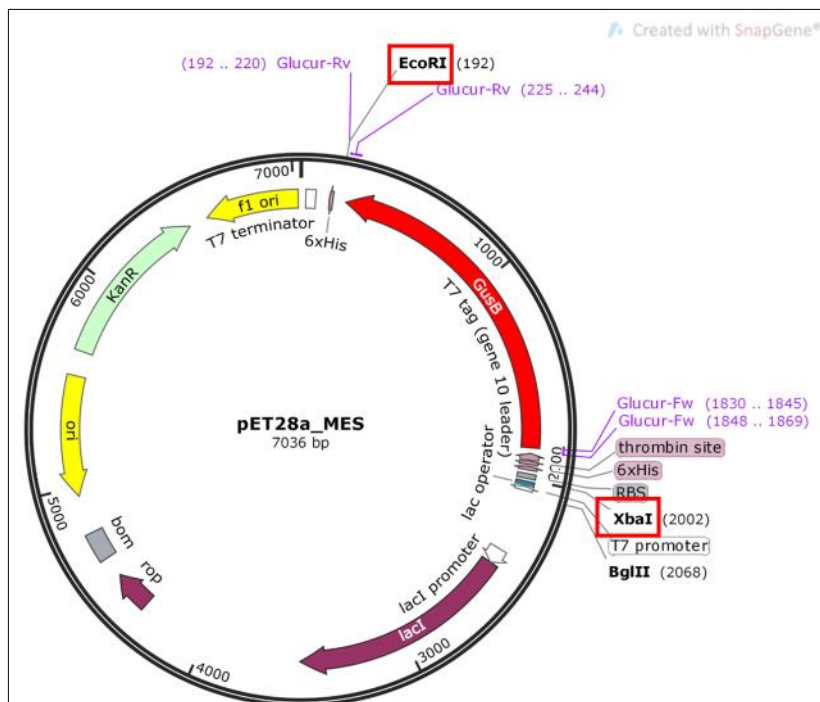
Figura 15. Perfil eletroforético dos produtos da digestão dupla pelas enzimas *XbaI* e *EcoRI* no sistema pET28a + GUSB para confirmação da subclonagem: M. Marcador molecular 1kb; canaletas 1 e 2 pET28a_MES intacto; 3. pET28a_MES digerido com *XbaI* e *EcoRI*.



Fonte: Batalha Junior, (2018)

Confirmada a subclonagem do gene da β -glucuronidase no vetor pET28a por análise de restrição com as enzimas *XbaI* e *EcoRI*, renomeamos o vetor recombinante que ficou conhecido como pET28a_MES.

Figura 16. Mapa físico do plasmídeo recombinante renomeado para pET28a_MES. Apresenta resistência ao antibiótico Canamicina, possui origem de replicação bacteriana pBR322, promotor T7 e 6xHIS. O gene da β -glucuronidase é mostrado em vermelho.



Fonte: Batalha Junior, (2018)

6.4 Teste de atividade positiva para GUSB em placa e Seleção de clones recombinantes

Verificou-se que a GUSB, tem a mesma capacidade que a enzima β -galactosidase de hidrolisar o substrato cromogênico X-gal, tornando as colônias recombinantes com o gene da GUSB com cor azul índigo.

O sistema de expressão em *E. coli*, é extensamente utilizado comercialmente, devido ao vasto conhecimento genético e fisiológico dessa cepa de bactéria, seu rápido crescimento celular e bom rendimento de expressão da proteína a baixos custos (MEDICI, 2013). Os vetores da família pET possuem alto nível de expressão proteica recombinante. Nesse sistema, o inserto contendo o gene de interesse é expresso sob o controle transcricional do promotor induzível T7 (STUDIER & MOFFATT, 1986). A expressão é induzida pelo fornecimento de lactose ou seu análogo IPTG, que ativam a transcrição de uma fonte de RNA polimerase de T7 na célula hospedeira e quando completamente induzida, os recursos das células são convertidas para expressar o gene de interesse (STUDIER & MOFFATT, 1986).

Na expressão de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos é de extrema importância a escolha correta da linhagem bacteriana que devem ser deficientes na maioria de protease I_{on} e Ompt naturais que possam desestabilizar o plasmídeo e apresentar baixo nível de expressão. A *E. coli* BL21 (DE3) pLysS é indicada para expressão de proteínas de alta eficiência de qualquer gene que esteja sob o controle do promotor T7, pois além de serem deficientes em proteases apresenta o plasmídeo pLysS, que contém o gene da lisozima T7, uma proteína bifuncional que digere uma ligação específica do peptidoglicano de parede de *E. coli* e que se liga à RNA polimerase T7 e inibe a expressão de genes sob o controle desta polimerase antes da indução (STUDIER & MOFFATT, 1986).

Figura 17. Teste para confirmação da atividade catalítica da GUSB recombinante. 1. Placa estoque com colônias BL21(DE3) pLysS crescida em LB sólido (LB com canamicina 50 mg/mL), eletroporadas com pET28a_MES na parte superior e pET28a (+) intacto na parte inferior; 2. Placa estoque com as mesmas colônias e ordem da placa 1 em meio LB com canamicina 50 mg/mL, glicose 1%, IPTG 1mM e X-gal (20 mg/mL) incubadas por 16h a 37 °C.

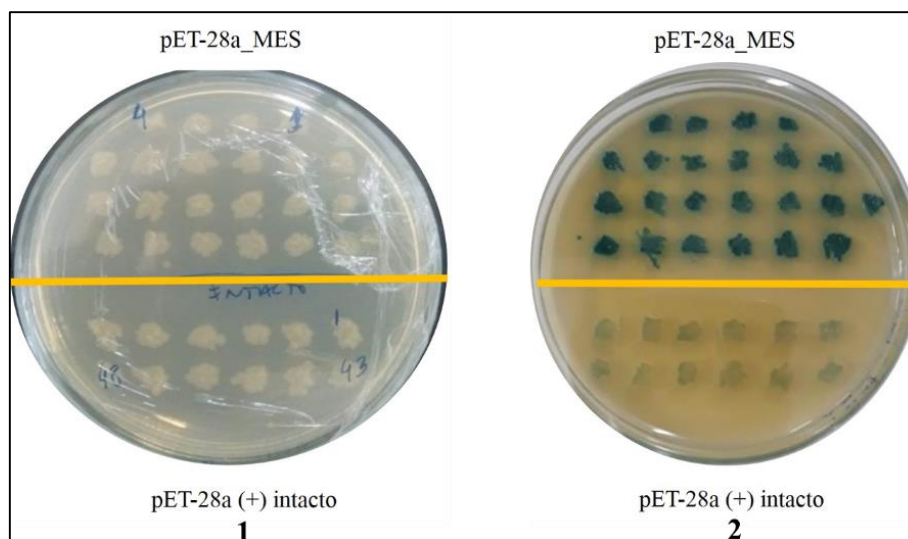


Foto: Batalha Junior, (2018)

Na placa estoque 1 o LB sólido está com antibiótico canamicina 50 mg/mL, nela é observado colônias transformantes e recombinantes. Na parte superior está o sistema recombinante de subclonagem com pET28a + GUSB transformada em BL21(DE3) pLysS e na parte inferior da placa, temos o sistema pET28a sem o genes da GUSB, transformado em BL21(DE3) pLysS, estes chamados de controles negativos. Na placa teste 2 com LB sólido com 50 mg/mL de Canamicina, adicionado glicose 1% IPTG 1mM e X-gal (20 mg/mL) temos replicadas as mesmas colônias da placa 1. Na parte superior, estão colônias transformantes e recombinantes positivos para a GUSB com coloração azul índigo, isto, devido a atividade catalítica de na parte inferior os transformantes sem o controles negativos.

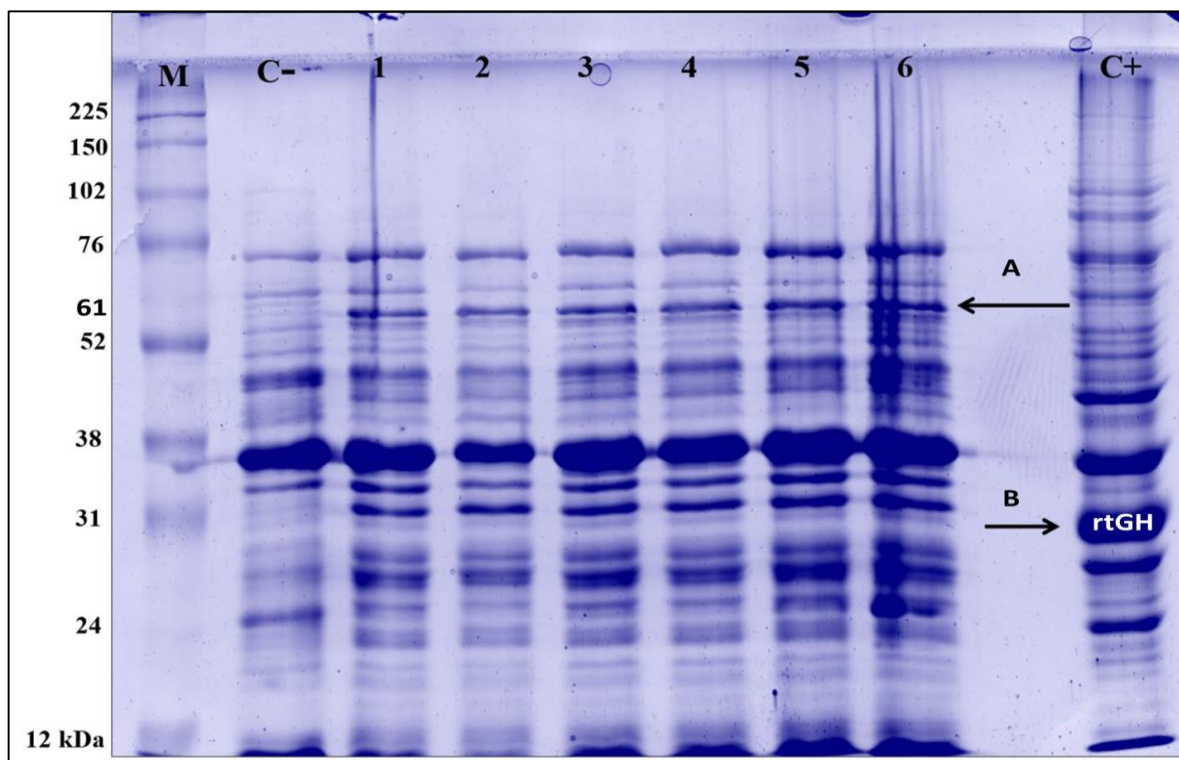
É observado nas colônias recombinantes que possuem o gene da GUSB, na parte superior têm capacidade de hidrolisar a molécula de X-gal ao contrário das colônias transformadas com vetor intacto. Essa coloração acontece porque o X-gal é um glicosídeo artificial análogo a lactose substrato da enzima β -galactosidase que hidrolisa esta molécula convertendo em um corante conhecido como azul índigo. Foi verificada que a GUSB possui a mesma capacidade hidrolítica da β -galactosidase em relação ao X-gal. A β -glucuronidase pertence à mesma família da β -galactosidase GH2 (HENRISSAT, 1997; HASSAN *et al.*, 2013). A GUSB catalisa ligações glicosídicas, hidrolisando ligações O-glicosil e S-glicosil entre dois ou mais carboidratos ou entre uma porção de carboidrato e não carboidrato de glicoproteínas,

oligossacarídeos de glico-conjugados. Não foi encontrado na literatura trabalhos que utilizam o X-gal como substrato para a GUSB.

6.5 Análise em gel SDS-PAGE 12%

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, também conhecida como SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis) é comumente usada, para estimar a massa molecular de proteínas com precisão de até 95% (DE-SOUZA *et al.*, 2016). Nesta técnica utilizamos um detergente aniônico forte SDS, em combinação com um agente redutor β -mercaptoetanol e aquecimento das amostras a 100 ° C. Nestas condições as proteínas da amostra dissociam, preservando apenas as cadeias primárias que se ligam ao SDS tornando-se carregadas negativamente (SAMBROOK *et al.*, 1989; DE-SOUZA *et al.*, 2016).

Figura 18. Análise eletroforética em SDS-PAGE 12% da GUSB produzida por *E. coli* BL21(DE3) pLysS. M= marcador molecular Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers - GE Healthcare - RPN800E. C- = Controle negativo da produção da GUSB (hospedeira BL21 (DE3) pLysS com vetor intacto); As colunas de 1 a 6 hospedeira BL21 (DE3) pLysS com vetor recombinante pET28a_MES; C+= controle positivo da indução, hospedeira BL21 (DE3) pLysS com vetor pGSM com genes do hormônio de crescimento do tabaqui. Pré-inóculo com glicose 1% e Indução com IPTG 1mM, a 37 °C com rotação de 180 rpm por 4h.



Foram selecionadas seis colônias de *E. coli*. BL21(DE3) pLysS com vetor recombinante (1,2,3,4,5,6), uma colônia da hospedeira BL21 (DE3) pLysS com pET28a intacto servindo como controle negativo (C-), uma colônia BL21 (DE3) pLysS transformada com vetor

de expressão pGSM_rtGH que expressa o hormônio de crescimento do tabaqui utilizado como controle positivo (C+) do protocolo da indução.

Análise eletroforética em SDS-PAGE 12% da GUSB produzida por *E. coli* BL21(DE3) pLysS com vetor recombinante nos mostra nas colunas de 1 a 6, o aparecimento de um banda na altura entre 52 kDa a 76 kDa (seta A) no perfil de massa molecular do marcador (M). A banda indicada com a seta A, está ausente no controle negativo C- com BL21(DE3) pLysS transformada com vetor intacto e no controle positivo C+ BL21(DE3) pLysS transformada com rtGH. A banda indicada com seta A, indica a possível banda da proteína recombinante GUSB com massa molecular aproximada de 61 kDa. A banda indicada com seta B, indica a proteína recombinante do hormônio do crescimento do tabaqui (rtGH) com massa molecular de 23 kDa utilizada como controle positivo do protocolo de indução. No ensaio *in silica* no site web.expasy.org a massa molecular da GUSB apresentou 61 kDa, condizente com a massa molecular visualizada no gel de poliacrilamida (Figura 18).

6.6 Atividade do extrato enzimático GUSB em tampão fosfato de sódio 100mM, pH7

Figura 19. Teste para confirmação da atividade catalítica da GUSB recombinante em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7; B. Branco com 200 μ L de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7, 20 μ L de X-gal 20 mg/mL, sem o extrato enzimático; Poços de 1 a 7 com 100 μ L de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7, 20 μ L de X-gal 20 mg/mL, 100 μ L de extrato enzimático.

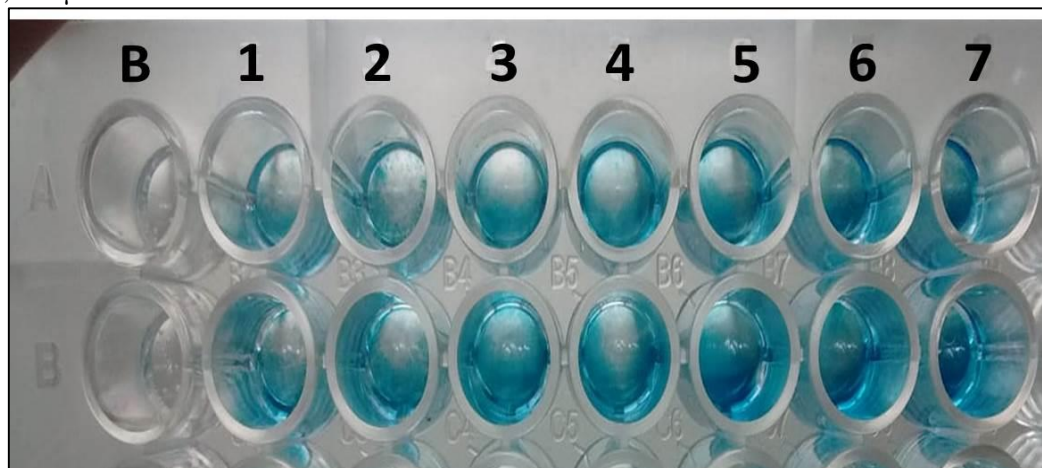


Foto: Batalha Junior, (2018)

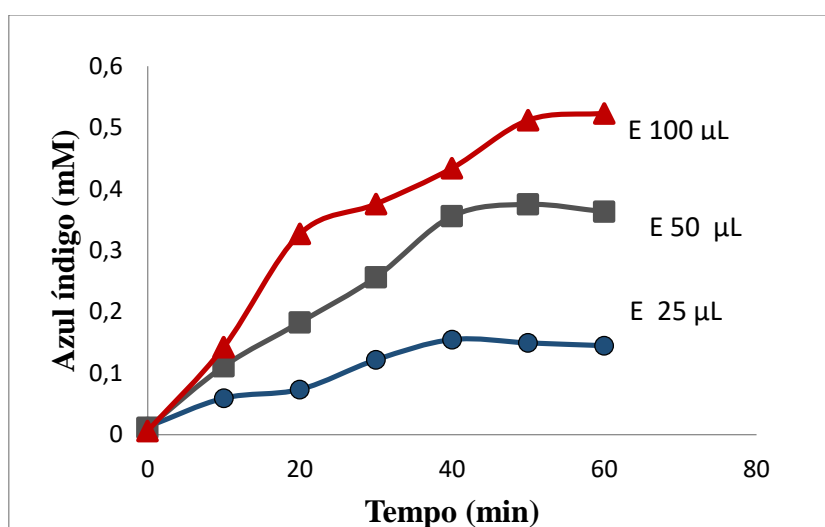
O extrato enzimático foi obtido após a indução da expressão com IPTG 1mM em 20mL de LB líquido por 8 horas a 37 °C em agitação de 180 rpm (Figura 19). A coloração pôde ser visualizada com 30 min em 37 °C em tampão fosfato de sódio pH 7. A reação sem o extrato enzimático (branco) nas mesmas condições, não houve hidrólise do cromogênio X-gal permanecendo sem coloração. Ao contrário do branco (B), os poços de 1 a 7 com extrato

enzimático é observado a coloração de azul índigo, confirmando atividade da GUSB. A partir desses resultados seguiu para os ensaios de caracterização e cinética da GUSB.

6.7 Ensaio da cinética

Após a verificação da atividade enzimática qualitativa de clones, executou-se o ensaio de cinética da reação para determinação do tempo e volume de enzima utilizada nas reações enzimáticas como observado na Figura 20. As análises espectrofotométricas permitiram a determinação da atividade quantitativa da enzima recombinante hidrolisando o substrato X-gal.

Figura 20: Perfil cinético da enzima recombinante. As reações foram realizadas durante 60 minutos utilizando extrato enzimático, X-gal 20 mg/mL, tampão citrato-fosfato pH 7,0 e enzima, em cinética de ponto final.



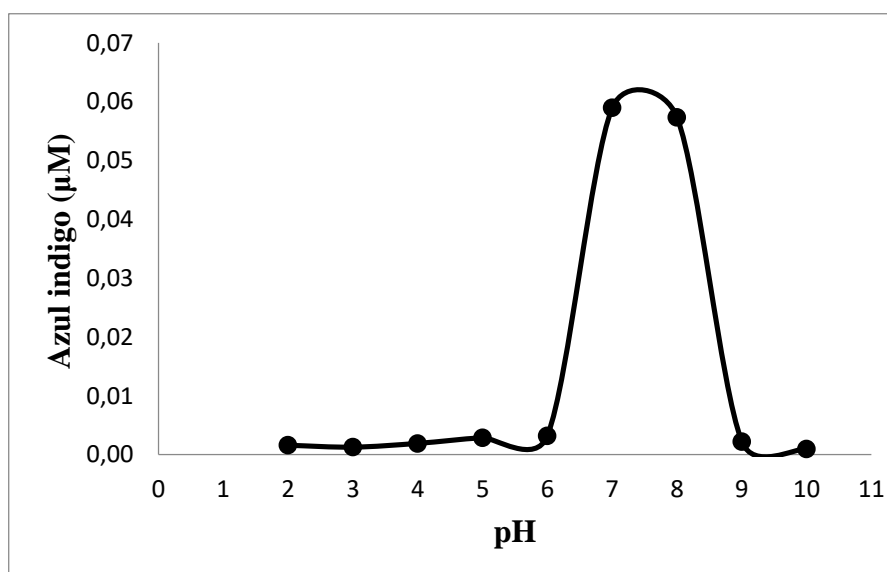
Fonte: Batalha Junior, (2018)

A atividade enzimática aumenta progressivamente ao longo do tempo de reação, mostrando que a reação atinge o máximo de atividade em 40 minutos de incubação alcançando a partir daí a reação de ordem 0 (zero) para os volumes de 25 e 50 µL de enzima. Quando utilizados 100 µL de enzimas o platô reacional é alcançado após 50 minutos de incubação. Foi estabelecido o volume de 50 µL para a realização dos ensaios enzimáticos e o tempo de 40 minutos devido a apresentação da melhor inclinação na curva de progresso cinético.

6.8 Efeitos do pH na atividade enzimática

As propriedades físico-químicas influenciam enormemente o funcionamento dos sistemas biológicos, sendo o potencial hidrogeniônico uma das condições mais importantes (SOARES & FERREIRA, 2004). Assim, o conhecimento da faixa de atividade ótima é fundamental para otimização de processos enzimáticos. A avaliação do efeito da variação do pH na reação enzimática apresentou picos de atividade da β -glucuronidase nos valores 7,0 e 8,0. Fora desta faixa de pH ocorre rápido declínio da atividade enzimática (Figura 21).

Figura 21: Determinação dos valores de pH ótimo pra enzima presente no extrato bruto após indução com IPTG



Fonte: Batalha Junior, (2018)

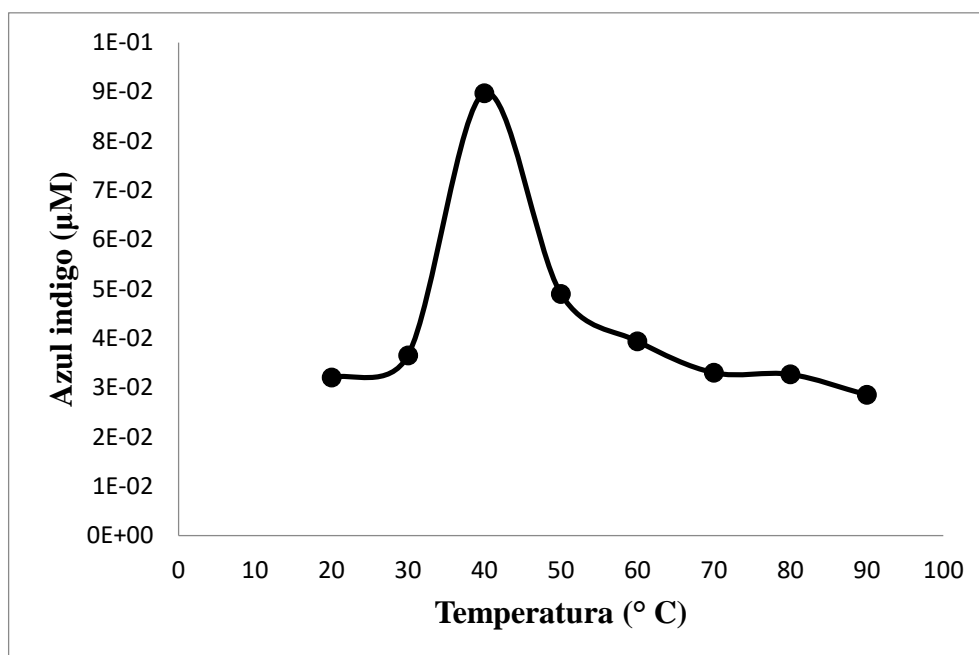
Entre as inumeras pesquisa realizadas como a GUSB eatá uma obordagem para terapia de cancer que visa à ativação específica de um fármaco ativo de um pró-fármaco não tóxica inativa por uma proteína de fusão enzima-anticorpo localizada nos locais do tumor. Uma das desvantagens da GUSB humana é sua ação majoritária em pH 4,5 (JAIN *et al.*, 1996) em contrapartida, o pH ótimo de atuação das enzimas procarióticas é em 7,5 bastante similar ao resultado encontrado para a enzima isolada da biblioteca metagenômica apresentou atividade ótima em pH 7, 0 e 8,0 satisfazendo o pH fisiológico (7,4) podendo ser testada para fins terapêuticos.

A faixa de pH de atuação da enzima desenvolvida neste trabalho é concordante com a condição que afasta *backgrounds* da atividade da GUSB. GALLAGHER, (1992) relatou que a atividade da enzima é facilmente controla em pH 8,0.

6.9 Determinações da temperatura ótima da atividade catalítica da GUSB

As reações enzimáticas são fortemente dependentes da temperatura e estabelecer as condições ideais da reação é primordial em cinética enzimática. A avaliação da temperatura ótima para reação com a GUSB mostrou um pico de atividade em 40 °C (Figura 22). Temperaturas abaixo e acima da faixa ótima reduzem a atividade enzimática. Em temperaturas muito superiores, ocorre a inativação da enzima, provavelmente devido à desnaturação proteica.

Figura 22: Efeito da temperatura na atividade da enzima recombinante GUSB.



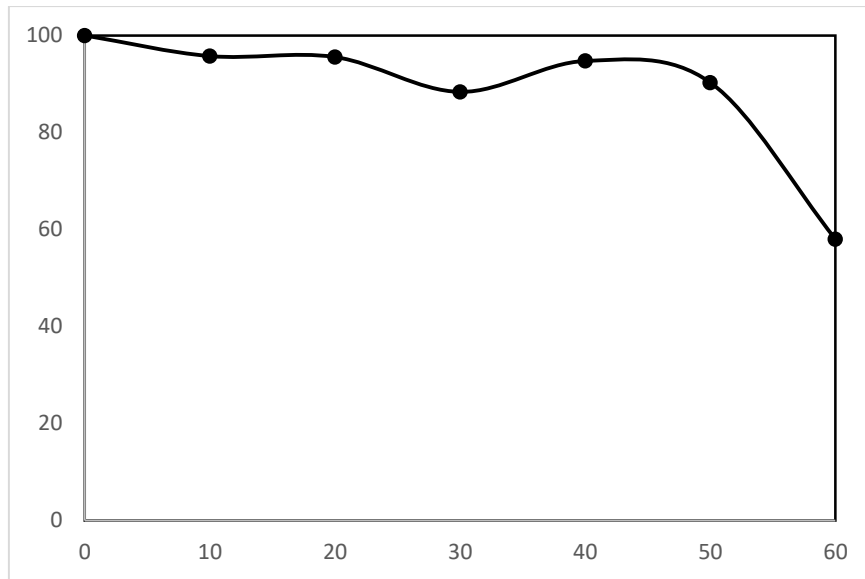
Fonte: Batalha Junior, (2018)

O potencial de aplicação para determinada enzima em processos industriais depende de sua atuação catalítica, ou seja, sua atividade e sua estabilidade sob diferentes condições físicas, como temperatura. A temperatura ótima de atividade da GUSB recombinante (40 °C) torna a enzima boa candidata para aplicação em processos industriais. A utilização de algumas enzimas glicolíticas requer temperaturas brandas que não geram subprodutos, odor e não modifique as propriedades dos produtos, sobretudo aplicação em alimentação (LADERO *et al.* 2002)

6.10 Estabilidades da enzima no meio reacional

O estudo da estabilidade enzimática da β -glucuronidase presente no extrato bruto mostrou elevada estabilidade quando incubada na temperatura ótima 40 °C. Após 10 e 20 minutos de incubação a enzima retém mais de 95% da atividade relativa com 20 minutos mantendo se estável ao longo do tempo, indicando o decréscimo da estabilidade em 50 minutos atingindo 58 % de atividade (Figura 23).

Figura 23: Determinação da estabilidade da enzima recombinante GUSB



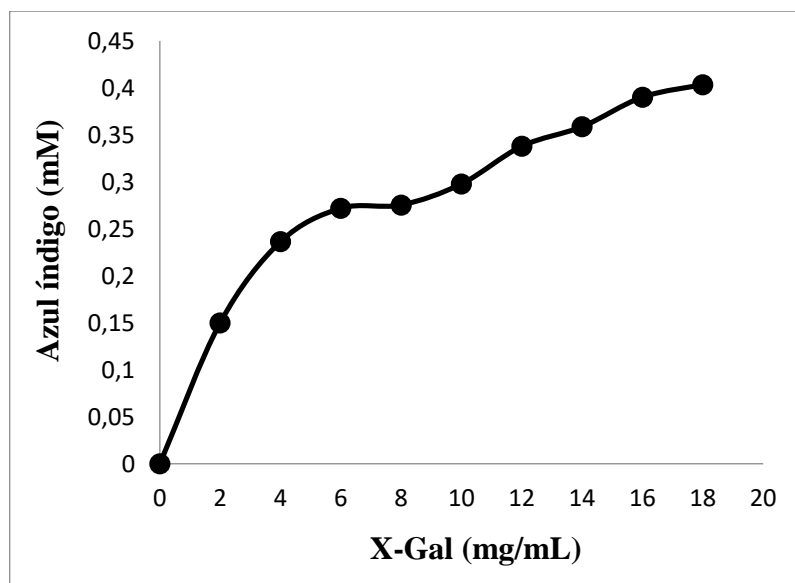
Fonte: Batalha Junior, (2018)

A alta estabilidade encontrada neste estudo indica uma enzima com características de interesse industrial. A sua aplicação é indicada em processos com longas reações na temperatura de 40 °C que foi a temperatura recomendada para processos de longos períodos utilizando glicosidases (MATIOLI, 1991; ROSSETTO et al., 2013).

6.11 Determinação da K_m e V_{max} aparentes da GUSB

A cinética da GUSB, assim como a maioria das reações catalisadas por enzimas segue o modelo Michaelis-Menten (Figura 24).

Figura 24: Parâmetros cinéticos aparentes da GUSB recombinante descritos pelo modelo cinético de Michaelis-Menten.

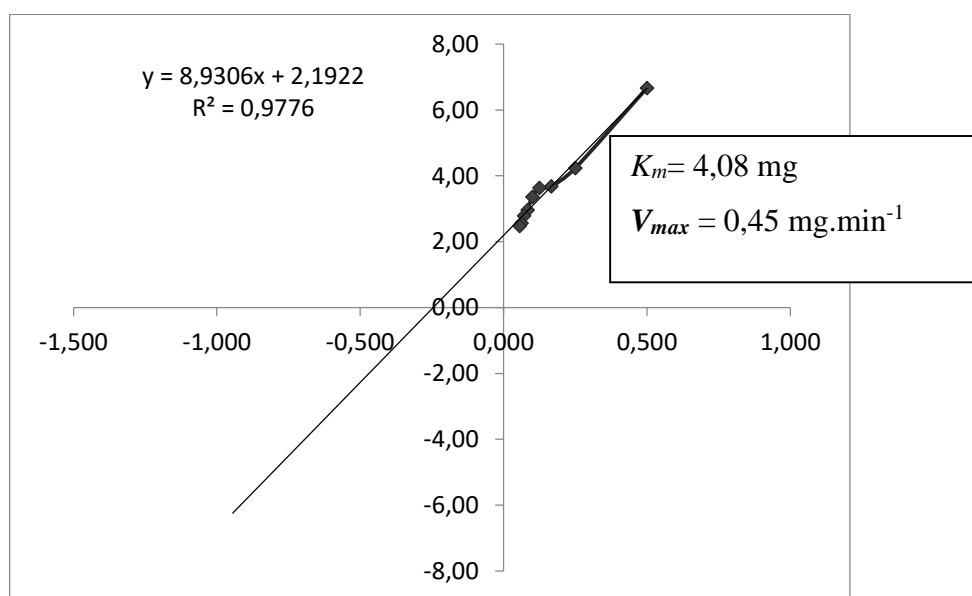


Fonte: Batalha Junior, (2018)

A ação da enzima testada com diferentes concentrações do substrato X-gal, mostrou que o aumento da concentração do substrato tem um aumento imediato da velocidade da reação de primeira ordem (concentração de substrato é menor que K_m), mas somente até um determinado ponto que corresponde ao valor da concentração de X-gal em que a capacidade catalítica da β -glucuronidase atinja o máximo (V_{max}), não aumentando mesmo que a concentração do substrato seja aumentada, caracterizando, portanto o modelo cinético de Michaelis-Mentem.

O estudo das constantes cinéticas foi realizado empregando o método gráfico de Lineweaver Burk (Figura 25). A partir destas análises foram determinados 4,08 mg e 0,45 $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$ os valores aparentes de K_m e V_{max} respectivamente.

Figura 25. Gráfico dos Duplos Recíproco de Lineweaver Burk para os parâmetros cinéticos aparentes da GUSB recombinante.



Fonte: Batalha Junior, (2018)

O valor de V_{max} descreve a taxa máxima de reação e o K_m é a medida da afinidade de uma enzima por um substrato particular. A literatura relativa a enzimas mostra escassez de informações sobre os parâmetros cinéticos da GUSB.

7. CONCLUSÃO

A subclonagem da sequência codificadora da GUSB no vetor de expressão pET28a (+) foi realizada com sucesso gerando o plasmídeo recombinante pET28_MES. O sistema de expressão em *E. coli* BL21(DE3) funcionou de forma eficiente possibilitando realizar ensaios enzimáticos e determinar sua cinética aparente K_m 4,08 mg e V_{max} 0,45 mn.min⁻¹ confirmando sua atividade hidrolítica em relação ao substrato X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopiranosídeo).

8. PERSPECTIVAS

- Determinar perfil de cinética de crescimento celular com produção de β -glucuronidase;
- Purificar a enzima recombinante;
- Identificar a proteína por espectrometria de massas;
- Realizar teste enzimáticos com múltiplos substratos (lactose, x-gluco, pNPG, ONPG);
- Analisar os domínios catalíticos da GUSB e estudar proximidade estrutural com outras glicosidases

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOO, S., PLETSCHE, B. Effect of phenolic compounds on the rapid direct enzymatic detection of β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase. *African Journal Online*. 36 (1): 133-137, 2010. Doi: [org/10.4314/wsa.v36i1.50919](http://dx.doi.org/10.4314/wsa.v36i1.50919).

AICH, S; DELBAERE, L.T.J.; CHEN, R. Expression and Purification of *Escherichia coli* β -Glucuronidase. *Protein Expression and Purification* **22**, 75–81 (2001).

ALDRICH. Sigma-Aldrich. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com>> Acessado em: 02/12/2019.

AL, A *et al.* “Use of Reporter Genes in the Generation of Vaccinia Virus-Derived Vectors” *Viruses* vol. 8,5 134. 21 May. 2016, doi: 10.3390/v8050134.

ARUL, L., BENITA, G., BALASUBRAMANIAN, P. Functional insight for beta-glucuronidase in *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp. RLH1, *Bioinformation* 2, 2008. 339–343.

BILAL, M., IQBAL, H.M.. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation—a review. *Environ. Int.* 124, 2019. 336–353.

BEAUD D, TAILLIEZ P, ANBA-MONDOLONI J. Genetic characterization of the beta-glucuronidase enzyme from a human intestinal bacterium, *Ruminococcus gnavus*. *Microbiology (Reading, England)* 2005; 151(Pt7):2323–2330. doi: 10.1099/mic.0.27712-0.

BASU, C *et al.* Use of β -glucuronidase reporter gene for gene expression analysis in turfgrasses. Author links open overlay panel Chhandak Basu Volume 320, Issue 1, 16 July 2004, Pages 7-10. doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.128.

BERGMANN, J. C *et al.* Discovery of two novel β -glucosidases from an Amazon soil metagenomic library. *FEMS Microbiology Letters* 351, 147–155, 2014. doi:10.1111/1574-6968.12332.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2647–2653, 1997.

BON, E.P.S; PEREIRA JUNIOR, N., PEREIRA, P.S., ROSEIRO, J.C., FERRARA, M.A. Bioprocessos para produção de enzimas. *Enzimas em biotecnologia: Aplicações, tecnologias e mercado*. Ed. Interciência. 2008. p. 95 – 122.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein: utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR – MDIC. SECRETARIA DE INOVAÇÃO. FUNDAÇÃO BIO-RIO. Diagnóstico de referência sobre serviços de escalonamento de biotecnologias no Brasil. 2019.

BROSSI, M. J. L. Diversidade de genes catabólicos em solos de “Terra Preta de Índio” da Amazônia sob diferentes coberturas vegetais. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 164 f. 2012.

BROSSI, M. J. D. L., MENDES, L. W., GERMANO, M. G., LIMA, A. B., TSAI, S. M. Assessment of bacterial bph Gene in Amazonian Dark Earth and their adjacent soils. *PLoS ONE* 9, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0099597.

BROW, T. CLONAGEM GENICA E ANALISE DE DNA e Análise de DNA- 4ª ed, Porto Alegre: Artmed, 2003. isbn: 9788536300955

BURCHETT, G. G *et al.* “Native Electrophoresis-Coupled Activity Assays Reveal Catalytically-Active Protein Aggregates of Escherichia coli β -Glucuronidase.” *PloS one* vol. 10,6 e0130269. 29 Jun. 2015, doi:10.1371/journal.pone.0130269

CANTAREL B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy) : an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Res** 37: D233-238, 2009. [PMID : 18838391].

CARMO, E. J. Clonagem e caracterização enzimática de uma lipase isolada de uma biblioteca metagenômica de terra preta de índio. C287c. 152 f.: il. color; 31 cm, 2017.

CARVALHO, C. F. Caracterização Funcional e Estrutural de uma enzima Lipolítica encontrada na Biblioteca Metagenômica de Solo de Terra Preta de Índio. 2015. 161 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CHENG, Y et al. Mucopolissacaridose tipo VII como causa de hidropisia fetal não imune recorrente. *Journal of Perinatal Medicine* , 31 (6), 2005 .pp. 535-537. doi: 10.1515 / JPM.2003.083

CHOI EJ, AHN HW, KIM WJ. Effect of α -acetolactate decarboxylase on diacetyl content of beer. *Food Sci Biotechnol.* 2015;24:1373–80. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-015-0176-y>.

COCHRANE, T. T.; SÁNCHEZ, P. A. Land resources, soils and their management in the Amazon region: a state of knowledge report. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON AMAZONIAN AGRICULTURE AND LAND USE RESEARCH, 1982, Cali, Colombia. **Proceedings...** Cali: CIAT, 1982. p. 137-209. (CIAT Series 03E-3-82).

DE-SOUZA, M.T.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Técnicas básicas de biologia molecular. Brasília: Universidade de Brasília. 2 ed. 2016.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Eds.). **Defining soil quality for a sustainable environment.** Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 3-21. (SSSA special publication, 35).

DUCHICELA, J. *et al.* Soil aggregate stability increase is strongly related to fungal community succession along an abandoned agricultural field chronosequence in the Bolivian Altiplano. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 50, p. 1266-1273, 2013.

FALESI, I.C.; CRUZ, E.S.; PEREIRA, F.B.; LOPES, E.C. Os solos da área de Manaus-Itacoatiara. Belém: Ipean, 1969. 116p.

FANG W, VIKERPUUR M, SANDHOLM M. A fluorometric beta-glucuronidase assay for analysis of bacterial growth in milk. *Vet Microbiol.* 1995;46:361–367. doi: 10.1016/0378-1135(95)00044-B.

FENG S. J., C. Li, X. L. Xu and X. Y. Wang, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2006, 43,63–67.

FISHMAN, W. H. p-glucuronidase. *Methods of Enzymatic Analysis*, 1974. 929–943. doi: 10.1016 / b978-0-12-091302-2.50082-7.

FARNLEITNER, A. H *et al.* Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide in differing sample fractions of river waters and its implication for the detection of fecal pollution. *Water Res.* 2002;36:975. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00288-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00288-3).

GEHRMANN, M. C *et al.* Biochemical properties of recombinant human β -glucuronidase synthesized in baby hamster kidney cells. *Biochem J.*, 1994. 301: 821–828.

GALLAGHER, S. R. *in* “GUS Protocols: Introduction” (Gallagher,S. R., Ed.), pp 1–4, Academic Press, San Diego, 1992.

GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. The ‘Terra Preta’ phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. *Naturwissenschaften*, v. 88, n. 1, p. 37-41, 2001.

GUO, L *et al.* Glycyrrhetic Acid 3-O-Mono- β -d-glucuronide (GAMG): An innovative High-Potency Sweetener with Improved Biological Activities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2017.

GHURYE JS, CEPEDA-ESPINOZA V, POP M. Metagenomic assembly: overview, challenges and applications. *Yale J Biol Med*;89:353–62, 2016.

HASSAN, M. I., *et al.* High resolution crystal structure of human β -glucuronidase reveals structural basis of lysosome targeting. *PLoS ONE* 8: e79687 10.1371/journal.pone.0079687

HANDELSMAN J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(4):669-85, 2004.

HANDELSMAN, J., M. R. RONDON, S. F. BRADY, J. CLARDY, AND R. M. GOODMAN. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5:R245–R249, 1998.

HANSAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzym. Microb. Tech.*, v.39, p. 235-251, 2006.

HENRISSAT B, DAVIES GJ (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.* 7:637-644 [PMID : 9345621].

HESS, M et al. Bacterial glucuronidase as general marker for oncolytic virotherapy or other biological therapies. *J Transl Med.* 2011; 9: 172. Published online 2011 Oct 11. doi: 10.1186/1479-5876-9-172 PMID: PMC3207905.

HIRAOKA, S.; YANG, C.; IWASAKI, W. Metagenomics and bioinformatics in microbial ecology: current status and beyond. *Microbes and Environments* 31(3):204-212, 2016.

HONG, K. S., HE, K. L., CHUNG, E. J., PARK, E. J., LEE, M. H., KIM, J. C., *et al.* Selection and characterization of forest soil metagenome genes encoding lipolytic enzymes. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 1655–1660, 2007. doi:7023 [pii].

ISLAM, M. R. *et al.* Active site residues of human beta-glucuronidase. Evidence for Glu(540) as the nucleophile and Glu(451) as the acid-base residue. *J. Biol. Chem.* 274, 1999. 23451-23455.

ICMSF. Microorganismos de los Alimentos 1: Su significado y métodos de enumeración. 2ª Edición. Editorial ACRIBIA. SA. Zaragoza, Espanha, 2000.

KERMODE, A. R.; MCNAIR, G.; PIERCE, O. Plant Recombinant Lysosomal Enzymes as Replacement Therapeutics for Lysosomal Storage Diseases. *Molecular Pharming*, v. 2012, p. 181–215, 2018.

KHAN, Shaukat. A. et al. Epidemiology of mucopolysaccharidoses, *Molecular Genetics and Metabolism*, Volume 121, Issue 3, 2017, Pages 227-240, ISSN 1096-7192, doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.05.016.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA Jr., A. Precipitação. In: PESSOA Jr., A.; KILIKIAN, B. V. (coords.). *Purificação de produtos biotecnológicos*. Barueri: Manole, 2005. p. 89-113. (v. 1).

JACKSON SR, AVERY NC, TARLTON JF, ECKFORD SD, ABRAMS P, BAILEY AJ. Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse. *Lancet* 1996; 347:1658-61.

JAIN, S., DRENDEL, W. B., CHEN, Z-W, MATHEWS, F. S., SLY, W. S., AND GRUBB, J. H. Structure of human b-glucuronidase reveals candidate lysosomal targeting and active-site motifs. *Nature Struct. Biol.* 3, 1996. 375–381.

JANSSON, J *et al.* “Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease.” *PloS one* vol. 4,7 e6386. 28 Jul. 2009, doi:10.1371/journal.pone.0006386.

JEFFERSON, R. A.; BURGESS, S. M. D. HIRSH, beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 8447–8451.

JEFFERSON, R. A *et al.* GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, v. 6, p. 3901-3907, 1987.

JEONG, J.H., SONG, H.R., KO, J.H., JEONG, Y.M., KWON, Y.E., SEOL, J.H., AMASINO, R.M., NOH, B., AND NOH, Y.S. Repression of FLOWERING LOCUS T chromatin by

functionally redundant histone H3 lysine 4 demethylases in Arabidopsis. PLoS One 4: e8033, 2009.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.170, n.1, p.75-86, 1995.

KENNEDY, J. et al. Marine metagenomics: New tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 608–628, 2010.

KERN, D.C.; D`AQUINO, G.; RODRIGUES, T.E.; FRAZÃO, F.J.L.; SOMBROEK, W.; NEVES, E.G.; MYERS, T.P. Distribution of antropogenic dark earths. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; WOODS, W.; GLASER, B. (Org.). Amazonian dark Earths: origin, properties, management. 1.ed. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.51-76.

KERN, D.C.; KÄMPF, N. O efeito de antigos assentamentos indígenas na formação de solos com terra preta arqueológicas na região de Oriximiná – PA. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.13, p.219-225, 1989.

KÄMPF, N.; KERN, D.C. O solo como registro da ocupação humana pré-histórica na Amazônia. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.j.. (Ed.). Tópicos em Ciência do Solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005, p.277-320.

KIM, D. H *et al.* Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. Arch Pharm Res. 1998 Feb; 21(1): 17–23.

LADERO, M.; PEREZ, M. T.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Hydrolysis of lactose by free and immobilized β -galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2. Biotechnology and Bioengineering, Washington, v. 81, n. 2, p. 241-252, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259). 1970. p. 680-685.

LEE, M. H., LEE, S.-W. Bioprospecting potential of the soil metagenome: novel enzymes and bioactivities. *Genomics & informatics* 11, 114–20, 2013. doi:10.5808/GI.2013.11.3.114.

LEE, S. W., WON, K., LIM, H. K., KIM, J. C., CHOI, G. J., CHO, K. Y. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 720–726, 2004. doi:10.1007/s00253-004-1722-3.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

LEOMIL L, REIS AMM, TAVARES P, ARAÚJO JF, KRUGER RH, ASTOLFI-FILHO S. Construção de biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio. Brasília: Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, p. 56, 2007.

LIU, Y *et al.* Effects of a Non-Conservative Sequence on the Properties of β -glucuronidase from *Aspergillus terreus* Li-20. PLoS ONE 7(2): e30998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030998>

LOGUIDICE, A. *et al.* Pharmacologic targeting of bacterial β -glucuronidase alleviates nonsteroidal antiinflammatory drug-induced enteropathy in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 341:447–454

LUCHETA, A. R., DE SOUZA CANNAVAN, F., ROESCH, L. F. W., TSAI, S. M., KURAMAE, E. E. Fungal Community Assembly in the Amazonian Dark Earth. *Microbial Ecology* 71, 962–973, 2016. doi:10.1007/s00248-015-0703-7.

MADARI, B. E.; CUNHA, T.J.F.; NOVOTNY, E.H.; MILORI, D.M.B.P.; MARTIN NETO, L.; BENITES, V.M.; COELHO, M.R.; SANTOS, G.A. Matéria Orgânica dos Solos Antrópicos da Amazônia (Terra Preta de Índio): suas características e papel na sustentabilidade da fertilidade do solo. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). *As terras pretas de índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas.* Manaus: 2009. Cap. 13, p.172-188.

MANAFI, M., KNEIFEL, W., BASCOMB, S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiological Reviews.* 55 (3): 335-348, 1991.

MANGRICH, A. S.; MAIA, C. M. B. F.; NOVOTNY, E. H. Biocarvão - As terras pretas de índios e o sequestro de carbono. *Ciência Hoje*, v.47, p.48-52, 2011.

MATSUI, S. *et al.* Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line. *International Immunopharmacology*, v. 4, n. 13, p. 1633–1644, 2004.

MATTA, L. D. M. – Identificação de Glicosidases e Sulfatases em Extratos do Molusco *Aplysia cervina*. – (Dissertação) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2001.

MATIOLI, G., MORAES, F. F. e ZANIN, G. M. Hydrolysis of lactose by betagalactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, p. 655-659, 2001.

MEDICI, M. A: Clonagem e expressão da aquaporina-4 recombinante em *E. coli* para aplicação no imunodiagnóstico da neuromielite óptica /Campinas, SP : [s.n.], 2013.

MERCANTE F. M *et al.* Aplicação de genes marcadores em estudos de ecologia microbiana com ênfase no sistema GUS. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 533-539, 2000.

MCILVAINE, T. C. A Buffer Solution for colorimetric comparison. 1921.

MICHIKAWA, M *et al.* “Structural and biochemical characterization of glycoside hydrolase family 79 β -glucuronidase from *Acidobacterium capsulatum*.” *The Journal of biological chemistry* vol. 287,17 (2012): 14069-77. doi:10.1074/jbc.M112.346288.

MDIC -Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços, 2018.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161, 497-505, 2010. doi:10.1016/j.resmic.2010.04.010

MOREIRA, A. Fertilidade, matéria orgânica e substâncias húmicas em solos antropogênicos da Amazônia Ocidental. *Bragantia*, v.66, p.307-315, 2007.

MOREIRA, A.; FAGERIA, N. K. Soil Chemical Attributes of Amazonas State, Brazil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 40, n. 17-18, p. 2912-2925, 2009. <http://dx.doi.org/10.1080/00103620903175371>.

MOREIRA, A *et al.* **Métodos de caracterização química de amostras de horizontes antrópicos das Terras Pretas de Índio** In: TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. N.; WOODS, W. (Ed.). *As terras pretas de índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas*. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. p. 201-211.

NAKAMURA, F. M., GERMANO, M. G., TSAI, S. M. Capacity of aromatic compound degradation by bacteria from Amazon dark earth. *Diversity* 6, 339–353, 2014. doi:10.3390/d6020339.

NEUFELD, E; MUENZER, The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York: 2001.

NIEHAUS, F., GABOR, E., WIELAND, S., SIEGERT, P., MAURER, K. H., ECK, J. Enzymes for the laundry industries: Tapping the vast metagenomic pool of alkaline proteases. *Microbial Biotechnology* 4, 767–776, 2011. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00279.x.

NOYCE, G. L., WINSBOROUGH, C., FULTHORPE, R., BASILIKO, N. The microbiomes and metagenomes of forest biochars. *Scientific Reports* 6, 26425, 2016.

NAKAMURA, F. M., GERMANO, M. G., TSAI, S. M. Capacity of aromatic compound degradation by bacteria from Amazon dark earth. *Diversity* 6, 339–353, 2014. doi:10.3390/d6020339

OLIVEIRA-NEVES, R. Caracterização da microbiota bacteriana da água do rio Negro em diferentes períodos sazonais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas Manaus. 134p, 2013.

ODONKOR, S., AMPOFO, J. Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*. 4 (2): 5-11, 2013. Doi: 10.4081/mr.2013.e2.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Revista Saúde e Biol.* n.3, v.7, 2012. p. 97 – 109.

ODONKOR, S., AMPOFO, J. Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*. 4 (2): 5-11, 2013. Doi: 10.4081/mr.2013.e2.

POLLET, R. M. et al. An atlas of β -glucuronidases in the human intestinal microbiome. *Structure*, v. 25, n. 7, p. 967–977, 2017.

- RAVEENDRAN, S., PARAMESWARAN, B., UMMALYMA, S. B., ABRAHAM, A., MATHEW, A. K. *Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. Food Technology and Biotechnology*, 56(1). 2018. doi:10.17113/ftb.56.01.18.5491.
- ROSSETTO, B. P.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F. Determinação da Atividade da Enzima B-galactosidase por Lactose do Soro de Queijo. *BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 1, p. 28–32, 2013.
- SATHYA, T. A., JACOB, A. M., KHAN, M. Cloning and molecular modelling of pectin degrading glycosyl hydrolase of family 28 from soil metagenomic library. *Molecular Biology Reports* 41, 2645–2656, 2014. doi:10.1007/s11033-014-3123-8.
- SATINSKY, B. M., FORTUNATO, C. S., DOHERTY, M., SMITH, C. B., SHARMA, S., WARD, N. D., *et al.* Metagenomic and metatranscriptomic inventories of the lower Amazon River, May 2011. *Microbiome* 3, 39, 2015. doi:10.1186/s40168-015-0099-0.
- SAMBROOK, J. E, F, Fritschi and Maniatis, T. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- SCHLOSS PD, HANDELSMAN J. A statistical toolbox for metagenomics: Assessing functional diversity in microbial communities. *BMC Bioinformatics* 9: 34, 2008. doi: 10.1186/1471-2105-9-34.
- SCHLOSS, P. D., AND J. Handelsman. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:303–310, 2003.
- SLY, W. S., Quinton, B. A., McAlister, W. H., & Rimoin, D. L. Beta glucuronidase deficiency: Report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. *The Journal of Pediatrics*, 82(2), 249–257, 1973. doi:10.1016/s0022-3476(73)80162-3.
- STEIN, J. L., MARSH, T. L., WU, K. Y., SHIZUYA, H. AND DELONG, E. F. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J. Bacteriol.* 178, 1996. 591-599.
- STEELE, H. L.; JAEGER, K. E.; DANIEL, R.; STREIT, W. R. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *J. Mol. Microbiol. Biotech.*, v. 16, p. 25-37, 2009.
- SOARES, T.A.; FERREIRA, R. Aplicação da equação de Poisson-Boltzman ao cálculo de propriedades dependentes do pH em proteínas. *Química Nova*. n.4. v.27. 2004. p.640-647.
- SOMBROEK, W.G.; RUIVO, M.L.; FEARNside, P.M.; GLASER, B.; LEHMANN, J. Amazonian Dark Earths as carbon stores and sinks. In.: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Eds.). *Amazonian Dark Earths: origin, properties, and management*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.125-139.
- STUDIER, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219, 37-44.
- TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. E.; WOODS, W. *As Terras Pretas de Índio da Amazônia: As Terras Pretas de Índio da Amazônia: Manaus Embrapa Ocidental*[s.l: s.n.]. 2009

TESSLER, M., BRUGLER, M. R., DESALLE, R., HERSCH, R., VELHO, L. F. M., SEGOVIA, B. T., *et al.* A Global eDNA Comparison of Freshwater Bacterioplankton Assemblages Focusing on Large-River Floodplain Lakes of Brazil. *Microbial Ecology*, 1–14, 2016. doi:10.1007/s00248-016-0834-5.

TOMATSU S., MONTAÑO A.M., DUNG V.C., GRUBB J.H., SLY W.S. Mutations and polymorphisms in GUSB gene in mucopolysaccharidosis VII (Sly Syndrome) *Hum. Mutat.* 2009;30:511–519. doi: 10.1002/humu.20828.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V, V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS,N.F.;MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M.. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v. 2, p. 195-276.

TSONEVA, D *et al.* “Drug-Encoded Biomarkers for Monitoring Biological Therapies” *PloS one* vol. 10, 9 e0137573. 8 Sep. 2015, doi:10.1371/journal.pone.0137573.

VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T. & WELLINGTON, E.M.H., eds. *Modern soil microbiology*. New York, Marcel Dekker, 1997. p.1-20.

VAYA, J *et al.* M. Antioxidant Constituents from Licorice Roots: Isolation, Structure Elucidation and Antioxidative Capacity Toward LDL Oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(2), 1997.302–313.doi:10.1016/s0891-5849(97)00089-0.

VOGLER *et al.* Murine mucopolysaccharidosis type VII: the impact of therapies on the clinical course and pathology in a murine model of lysosomal storage disease. *Metab Dis.* 1998 Aug; 21(5):575-86.

WALLACE, B. D *et al.* Estrutura e inibição das β -glucuronidasas do microbioma essenciais para o alívio da toxicidade dos medicamentos contra o câncer. *Chem Biol.* 2015; 22 : 1238–1249.

WANG, X. *et al.* Properties and structures of β -glucuronidasas with different transformation types of glycyrrhizin. *RSC Advances*, v. 5, n. 84, p. 68345–68350, 2015.

WANG SM, CHERN JW, YEH MY, NG JC, TUNG E, ROFFLER SR. Specific activation of glucuronide prodrugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer therapy. *Cancer Res.* 1992;52:4484–4491.

WANG H, FANG L, WEN Q, LIN J, LIU X. Application of beta-glucuronidase (GusA) as an effective reporter for extremely acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:3283–3294, 2017. doi:10.1007/s00253-017-8116-9.

WALLACE B. D, REDINBO M. R. The human microbiome is a source of therapeutic drug targets. *Current Opinion in Chemical Biology.* vol. 17: 379–384, 2013.

WALLACE B. D, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, Venkatesh M, Jobin C, Yeh L-A, Mani S, Redinbo MR. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science.* Vol. 330: 831–835, 2010.

WANG, S. DI, GUO, G. SHAN, LI, L., CAO, L. CHUANG, TONG, L., REN, G. HUI, *et al.* Identification and characterization of an unusual glycosyltransferase-like enzyme with β -galactosidase activity from a soil metagenomic library. *Enzyme and Microbial Technology* 57, 26–35, 2014. doi:10.1016/j.enzmictec.2014.01.007.

WEI, B *et al.* Characteristics and molecular determinants of a highly selective and efficient glycyrrhizin-hydrolyzing β -glucuronidase from *Staphylococcus pasteurii* 3I10. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol.102: 9193, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9285-x>

WILSON KJ, Hughes, SG, Jefferson RA. GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression. San Diego: Academic Press; 7–22 p. . San Diego: Academic Press, 1992; 7–22 p.

XIAOYING, W.; HAN, Z.; YU, W. *Glycyrrhiza glabra* (Licorice): Ethnobotany and Health Benefits. *Ethnobotany and Health Benefits*. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

XU, Y *et al.* “A Novel β -Glucuronidase from *Talaromyces pinophilus* Li-93 Precisely Hydrolyzes Glycyrrhizin into Glycyrrhetic Acid 3-O-Mono- β -d-Glucuronide.” *Applied and environmental microbiology* vol. 84,19 e00755-18. 17 Sep. 2018, doi:10.1128/AEM.00755-18

XU, P., GUNSOLLEY, J. Application of metagenomics in understanding oral health and disease. *Virulence* 5, 424–32, 2014. doi:10.4161/viru.28532.

ZHAO, Y *et al.* A Perspective on Biotransformation and De Novo Biosynthesis of Licorice Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(51), 2017. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04470.

ZIELINSKI, B. L., ALLEN, A. E., CARPENTER, E. J., COLES, V. J., CRUMP, B. C., DOHERTY, M., *et al.* Patterns of transcript abundance of eukaryotic biogeochemically-relevant genes in the Amazon river plume. *PLoS ONE* 11, 1–20, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0160929.

ZIMMER, K. R *et al.* Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, v. 10, n. 14, p. 123-137, jul./dez. 2009.

ZOU, S. P *et al.* Purification and characterization of a highly selective glycyrrhizin-hydrolyzing beta-glucuronidase from *Penicillium purpurogenum* Li-3. *Process Biochem* 48:358–363, 2013. doi:10.1016/j.procbio.2012.12.008.