

SUPREXPRESSÃO DO GENE NATIVO DA FITASE EM *Bacillus subtilis* PELA INTEGRAÇÃO NO LOCUS *amyE*

GUSTAVO GRUTZMANN BORCHARDT¹; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE²;
NATÁLIA MACHADO RAHAL³; PEDRO MACHADO MEDEIROS
ALBUQUERQUE⁴; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – gustavo.grutzmann@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas – fabio_leite@ufpel.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas - rahal.natalia@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – albuquerque95pedro@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O fósforo é um macronutriente essencial para o desenvolvimento e a produtividade de animais de interesse zootécnico. Contudo, em dietas baseadas em vegetais, como grãos e farelos, grande parte do fósforo encontra-se na forma de ácido fítico (fitato), um antinutriente. A fitase (mio-inositol-hexafosfato fosfohidrolase) é uma enzima da classe das fosfatases que catalisa a hidrólise sequencial do fitato, liberando fosfato inorgânico e tornando-o biodisponível para absorção por animais monogástricos (Nakashima et al., 2007). Com base em seus mecanismos catalíticos, as fitases são classificadas em quatro classes principais: histidina fosfatase ácida (HAP), cisteína fosfatase (CP), fosfatase ácida púrpura (PAP) e beta-hélice fitase (BP) (Zhao et al., 2021). Essas classes enzimáticas exibem diferentes perfis de pH ideal, o que influencia sua eficácia no trato gastrointestinal do animal.

A suplementação de rações com fitases exógenas é uma estratégia consolidada. Fitases de origem bacteriana, em particular, têm demonstrado vantagens sobre as fitases fúngicas tradicionais, como maior termoestabilidade e atividade específica, tornando-as alvos de grande interesse biotecnológico (Dersjant-Li et al., 2014). Entre os microrganismos, a bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* se destaca como uma plataforma robusta para a produção industrial de enzimas (Saadi et al., 2021). Visando potencializar a produção de sua fitase nativa, este trabalho objetiva desenvolver uma cepa geneticamente modificada com superexpressão desta enzima.

2. METODOLOGIA

A estratégia metodológica consiste na substituição do gene da α -amilase (*amyE*), uma enzima não essencial, pelo gene da fitase nativa de *B. subtilis*, por meio de recombinação homóloga. Para isso, foi desenhado *in silico* um cassete de integração. O cassete contém o gene da fitase sob controle de um promotor de alta expressão, flanqueado por sequências homólogas às regiões adjacentes ao gene *amyE*. Este cassete será sintetizado e clonado em um vetor de integração, que será propagado em *E. coli*. O plasmídeo recombinante será então introduzido em *B. subtilis* para promover a integração cromossômica por duplo crossover. A atividade da fitase secretada será quantificada no sobrenadante da cultura por ensaio colorimétrico.

O cassete conterá o gene da fitase sob controle de um promotor de alta expressão e um gene de resistência ao cloranfenicol, flanqueado por sítios *lox*, que permitirá a seleção dos mutantes. O conjunto será delimitado por sequências homólogas às regiões adjacentes ao gene *amyE*. Este cassete será sintetizado e clonado em um vetor de integração, propagado em *E. coli*. O plasmídeo recombinante será introduzido em *B. subtilis* para promover a integração cromossômica. Após a seleção e confirmação dos transformantes, o gene de resistência será removido através da expressão transiente da recombinase *Cre*, que atua sobre os sítios *lox* para excisar o marcador. Esta etapa resulta em uma cepa final sem marcadores de resistência, adequada para aplicações biotecnológicas seguras. A atividade da fitase secretada será então quantificada no sobrenadante da cultura por ensaio colorimétrico.

Por razões de proteção intelectual e de patente, as sequências específicas da construção do cassete de expressão não são detalhadas neste trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado preliminar, concluiu-se o desenho *in silico* do cassete de integração, contendo o gene da fitase e as regiões de homologia para o locus *amyE*. A construção gênica encontra-se em fase de síntese comercial para posterior utilização nos ensaios de transformação e expressão.

4. CONCLUSÕES

Espera-se que a realocação do gene nativo da fitase para um sítio genômico de alta expressão resulte em uma cepa de *B. subtilis* com produção significativamente aumentada da enzima. Esta abordagem tem o potencial de contribuir para a produção de aditivos enzimáticos mais acessíveis, melhorando a biodisponibilidade de fósforo nas rações e, conseqüentemente, promovendo a sustentabilidade na produção animal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DERSANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H.; PARTRIDGE, G.; Phytase in non-ruminant nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 95, n.5, p.878-896, 2014.

IRAVANI SAADI, M.; DOOSTI, A.; JALALI, H.; ABDOLYOUSEFI, E. N.; HOOSHIYAR, M.; TABRIZI, R.; NOSHADI, E. Cloning in *Bacillus subtilis* phytase gene construct in *Escherichia coli*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.13, n.5, p.664-670, 2021.

NAKASHIMA, B. A.; McALLISTER, T. A.; SHARMA, R.; SELINGER, L. B. Diversity of phytases in the rumen. **Biological Sciences**, Lethbridge, v.53, n.1, p.82-88, 2007.

ZHAO, T.; YONG, X.; ZHAO, Z.; DOLCE, V.; LI, Y.; CURCIO, R. Research status of *Bacillus* phytase. **3 Biotech**, v.11, n-415, p.1-14, 2021.