

## Expressão, purificação e caracterização da Ferrochelatase de *Bacillus subtilis*.

Marcella O. Paganelli<sup>1</sup> (PG)\*, Marisvanda R. Gonzaga (TM)<sup>1</sup>, Daniel R. Cardoso<sup>1</sup> (PQ), Júlio C. Borges<sup>1</sup> (PQ)

<sup>1</sup> Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, CEP 13560-970, São Carlos-SP

e-mail: \*mahpa@iqsc.usp.br

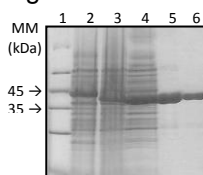
Palavras Chave: Expressão, purificação, caracterização, Ferrochelatase.

### Introdução

A cor vermelha brilhante característica do presunto Parma é resultante, principalmente, de um pigmento lipofílico conhecido como Zinco-protoporfirina IX (ZnPP).<sup>1</sup> A ZnPP é formada a partir da mioglobina por uma reação de transmetalção, catalisada pela Ferrochelatase (FECH), em que o Fe<sup>2+</sup> do grupo heme é substituído por Zn<sup>2+</sup>.<sup>2</sup> O presunto Parma apresenta uma maior estabilidade oxidativa em relação aos demais produtos cárneos curados e, portanto, são considerados mais saudáveis<sup>3</sup>. A utilização da FECH no processamento de carnes curadas pode permitir a produção de produtos cárneos curados mais saudáveis e em menor tempo, justificando assim o estudo dessa enzima.

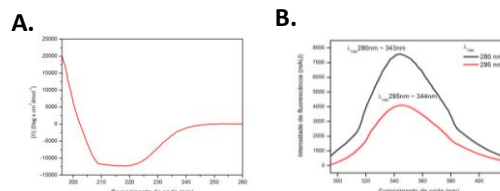
### Resultados e Discussão

O vetor de expressão contendo a sequência de DNA que codifica a FECH de *Bacillus subtilis* (BsFECH) foi obtido comercialmente. A proteína recombinante foi expressa solúvel em células *Escherichia coli* BL21(DE3) e foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel seguida de uma cromatografia de exclusão molecular.



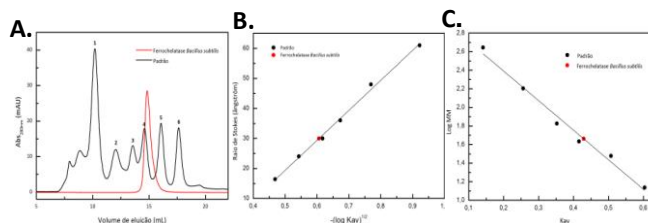
**Figura 1.** SDS-PAGE 12% mostrando as etapas de produção e purificação; 1) Marcador de massa molecular; 2) Cultura induzida; 3) Fração insolúvel; 4) Fração solúvel; 5) Cromatografia de afinidade ao Níquel; 6) Cromatografia de exclusão molecular.

A proteína foi caracterizada inicialmente pela técnica de dicroísmo circular (CD). Os espectros de CD mostraram que a proteína foi produzida enovelada, sendo constituídas tanto por hélices alfa quanto por folhas-beta. Em seguida foi realizada a fluorescência intrínseca de triptofano. Os espectros de fluorescência sugerem que a BsFECH apresenta exposição parcial dos seus triptofanos ao solvente, já que o  $\lambda_{\text{máx}}$  observado foi de 344 nm.



**Figura 2.** A. Espectro de CD e B. Espectro de emissão de fluorescência da BsFECH.

Por fim, a BsFECH foi submetida à cromatografia de exclusão molecular analítica, em que foi possível estimar seu raio de Stokes (Rs), 30 Å, e sua massa molecular aparente (MMap), 45kDa.



**Figura 3.** Cromatografia de exclusão molecular analítica: A. Perfil de eluição da BsFECH e do padrão de proteínas; B. Determinação da MMap; C. Determinação do Rs.

### Conclusões

A BsFECH recombinante foi expressa em cepa *E. coli* BL21(DE3) em sua forma solúvel. O processo de purificação mostrou-se eficiente, obtendo-se a proteína com grau de pureza acima de 95%. Uma vez purificada a proteína foi caracterizada pelas técnicas de cromatografia de exclusão molecular analítica, fluorescência intrínseca de triptofano e dicroísmo circular.

### Agradecimentos

À FAPESP (2011/51555-7) pelo apoio financeiro ao projeto e ao CNPq pela bolsa de mestrado.

- Wakamatsu, J.; Uemura, J.; Odagiri, H.; Okui, J.; Hayashi, N.; Hioki, S.; Nishimura, T.; Hattori, A. Formation of zinc protoporphyrin IX in Parma-like ham without nitrate or nitrite. **Animal Science Journal**, v. 80, p. 198–205, 2009.
- Becker, E. M.; Westermann, S.; Hansson, M.; Skibsted, L. H. Parallel enzymatic and non-enzymatic formation of zinc protoporphyrin IX in pork. **Food Chemistry**, v.130, p. 832–840, 2012.
- Chau, T. T.; Ishigaki, M.; Kataoka, T.; Taketani, S. Ferrochelatase Catalyzes the Formation of Zn-protoporphyrin of Dry-Cured Ham via the Conversion Reaction from Heme in Meat. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 12238–12245, 2011.