

Avaliação do perfil de oligossacarídeos produzidos por celulose do tipo PASC em diferentes tampões por MALDI-TOF MS

Tallyta Santos Teixeira¹, Jéssica Souza de Barros², Jéssica Kele Arruda Macêdo³, Kelly Barreto Rodrigues⁴, Léia Cecília de Lima Fávaro⁵, Félix Gonçalves de Siqueira⁶, Patricia Verardi Abdelnur⁷

Resumo

Os biocombustíveis vêm se destacando no atual cenário energético. Porém, a necessidade da desconstrução da parede celular vegetal e a obtenção de açúcares fermentescíveis da porção holocelulósica requerem processos adicionais. Nesse sentido, as hidrólises enzimáticas, que fazem uso de celulasas e hemicelulasas, têm recebido atenção quanto à utilização de enzimas acessórias, como monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs). As LPMOs são capazes de realizar clivagem oxidativa de polissacarídeos na presença de doador de elétrons, cujos produtos podem ser verificados por meio de espectrometria de massas. Esta técnica é uma ferramenta analítica capaz de identificar compostos, a partir de uma razão massa/carga (m/z). Porém, alguns fatores reacionais, como tampões de incubação, podem influenciar no perfil dos oligossacarídeos obtidos na reação enzimática entre LPMOs (enzimas) e celulose (substrato) na análise espectrométrica. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar qual o melhor tampão de incubação para o substrato celulósico PASC (*Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) por MALDI-TOF MS (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time-of-flight e Mass spectrometry*), a fim de otimizar o método analítico para detecção da atividade de LPMOs. Os tampões de acetato de amônio, fosfato de potássio, fosfato de sódio e fosfato-salino foram testados e apresentaram nítida influência na ionização dos oligossacarídeos. Dentre os tampões avaliados, o fosfato de potássio e fosfato-salino mostraram-se inviáveis, em virtude da possibilidade de dupla interpretação dos valores m/z detectados. Destaca-se que o fosfato de sódio seria o mais indicado, tendo em vista a maior quantidade de oligossacarídeos nativos identificados, sugerindo sua utilização em processo de hidrólise de PASC por LPMOs.

Palavras-chave: oligossacarídeos. sacarificação da biomassa lignocelulósica. monoxigenases líticas de polissacarídeos. espectrometria de massas.

¹ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, tallyta.santos@colaborador.embrapa.br

² Farmacêutica, Universidade de Brasília, jessica_souza182@hotmail.com

³ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pós-doutoranda na Área de Espectrometria de massas e metabolômica, Universidade de Kentucky, macedojka@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, pesquisadora colaboradora, Embrapa Agroenergia, kellybiobarreto@gmail.com

⁵ Bióloga, doutora em Ciências na Área em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Biologia Molecular (Enzimologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, felix.siqueira@embrapa.br

⁷ Química, doutora em Química Orgânica (Espectrometria de Massas), pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

Introdução

Os bicompostíveis são fontes renováveis e sustentáveis alternativas aos combustíveis fósseis. Tal energia pode ser obtida a partir de resíduos agroindustriais e/ou florestais (NAIK et al., 2010). Porém, isso envolve processos adicionais de pré-tratamento e hidrólise da biomassa utilizada como matéria-prima (SOREK et al., 2014), o que onera o processo e, conseqüentemente, o produto final.

Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de otimizar a etapa de sacarificação da biomassa lignocelulósica, por meio do emprego de enzimas como celulases e hemicelulases para desconstrução da parede celular (RYTIOJA et al., 2014). Porém, a utilização de enzimas acessórias podem auxiliar na atuação dessas glicosídeo hidrolases. Dentre as enzimas acessórias, as monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) têm sido apontadas como promissoras para a degradação da celulose e de outros polissacarídeos (HORN et al., 2012; AGGER et al., 2014; BEESON et al., 2015).

As LPMOs clivam as ligações β -1,4 glicosídicas dos substratos, que são inacessíveis à clivagem por enzimas hidrolíticas. Tais enzimas atuam com clivagens oxidativas dependentes de oxigênio molecular e doador de elétrons (enzimático ou não enzimático) (EIBINGER et al., 2014). A redução da recalcitrância e a degradação de polissacarídeos por hidrólise enzimática são aceleradas quando se faz uso de LPMOs. Essas monoxigenases aumentam a concentração de terminais redutores e reduzem a presença de inibidores enzimáticos (VERMAAS et al., 2015), facilitando assim a ação sinérgica entre as celulases.

Ensaio enzimáticos na presença de substratos celulósicos sintéticos podem ser realizados a fim de verificar a atividade enzimática das LPMOs. Como substratos celulósicos sintéticos utilizados nesses ensaios, podem ser mencionados Avicel e PASC (*Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) (ISACKEN et al., 2014; FORSBERG et al., 2011). O substrato PASC permite melhor atuação enzimática, em decorrência de seu prévio tratamento ácido, que facilita a formação de oligossacarídeos de menor grau de polimerização (ZHANG et al., 2009).

Além do substrato empregado nos ensaios enzimáticos de LPMOs, outros fatores devem ser considerados, tais como: doador de elétrons, temperatura, agitação, tempo e tampão de incubação. Os produtos obtidos nessas reações podem ser analisados a partir da técnica de espectrometria de massa, tendo em vista a baixa concentração dos produtos da reação e a alta sensibilidade da técnica (WESTERENG et al., 2011; BEY et al., 2013; FROMNHAGEN et al., 2015). A espectrometria é uma ferramenta analítica, que permite caracterizar moléculas, por meio da razão massa-carga (m/z) desses analitos (HARRIS, 2008). O tipo de espectrômetro de massas utilizado em uma análise depende das características da amostra (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

O MALDI-TOF MS (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization e Time-of-flight*) é um equipamento bastante utilizado para análise de moléculas maiores, como carboidratos e proteínas. Esse equipamento emprega a ionização por MALDI e a análise de massas por tempo de voo (TOF). Os íons são então detectados e enviados a um sistema como uma razão m/z em função da intensidade, indicando assim o perfil da amostra (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; SKOOG et al., 2010).

O método analítico com maior acurácia, ou seja, que determina o perfil dos componentes envolvidos em reações enzimáticas são de suma importância para validar a ação de uma enzima. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar

por MALDI-TOF MS o perfil do substrato celulósico PASC, que é muito utilizado no ensaio para detecção da atividade de LPMOs, quando incubado em diferentes tampões.

Materiais e Métodos

O substrato PASC (*Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) foi preparado conforme a metodologia descrita por Zhang et al. (2009) e Wood (1988).

Para os ensaios, preparou-se uma solução estoque de PASC de 10 mg/mL, sendo utilizado na concentração de 2 mg/mL, em um volume final de 100 µL. O substrato foi incubado com os tampões de acetato de amônio, fosfato de potássio, fosfato de sódio e fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline* - PBS), na concentração final de 50 mM e pH 6,0. Cada tampão foi testado individualmente, e a água foi utilizada como padrão da reação. Os ensaios foram realizados em triplicata. Tais ensaios foram homogeneizados em vórtex por 1 minuto, centrifugados a 14.000 rpm por 5 min, para obtenção do sobrenadante (que continha os oligossacarídeos solúveis), do qual foram retirados 10 µL nos tempos 0 h, 6 h, 24 h e 48 h. Estes foram incubados a 50 °C a 900 rpm até a análise do tempo seguinte.

As alíquotas do sobrenadante foram imediatamente analisadas por espectrometria de massas, conforme metodologia descrita por Rodrigues et al. (2017). As amostras foram preparadas por meio do método *two-layer*, utilizando o ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) como matriz aplicada na proporção de 3:1 (matriz-amostra), com adição de cloreto de sódio (2 mM). A análise desses produtos foi realizada em MALDI-TOF/TOF MS (*UltrafleXtreme, Bruker Daltonics*) em modo refletor positivo, adquirindo dados na faixa m/z 0 - 7000 (Full Scan) e, em seguida, de m/z 640 - 2000. Para calibração do equipamento, foi utilizado o Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics), que possui a mesma faixa de massa a ser analisada. Os dados de massas foram obtidos utilizando o software *flexControl* versão 3.4 (*Bruker Daltonics*) e processados utilizando o software *Flexanalysis* versão 3.4 (*Bruker Daltonics*).

Resultados e Discussão

O perfil dos oligossacarídeos provenientes do substrato celulósico PASC não se alterou no decorrer do tempo entre 0 e 48 horas de incubação a 50 °C e 900 rpm nos tampões avaliados. Assim, para avaliação da influência dos diferentes tampões, considerou os perfis dos oligossacarídeos do tempo zero, como pode ser visto na Figura 1.

Os oligossacarídeos obtidos após a reação de PASC apresentaram grau de polimerização (DP) de 6 a 10 glicoses, cuja identificação de cada íon (visualizado na Figura 1), pode ser visualizada na Tabela 1.

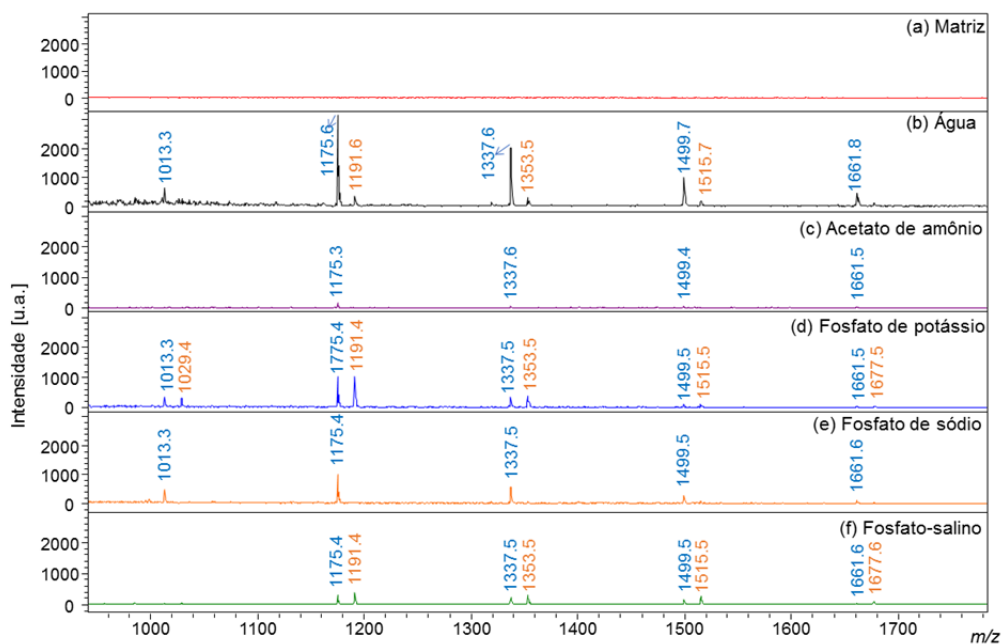


Figura 1. MALDI-(+)-TOF MS do substrato PASC nos diferentes tampões e em água. No primeiro espectro (a) pode ser visualizada a matriz (em vermelho), que é utilizada como branco da reação. Nos demais espectros, são observados o perfil do substrato PASC quando incubado em água (b) e nos tampões de: (c) acetato de amônio – em roxo, (d) fosfato de potássio – em azul, (e) fosfato de sódio – em marrom e (f) fosfato-salino – em verde. Valores m/z em azul referem-se aos oligossacarídeos nativos, com adutos de sódio, enquanto aqueles em laranja referem-se a possíveis oligossacarídeos oxidados, na forma de ácido aldônico ou ainda a adutos de potássio de oligossacarídeos nativos.

Nota-se que, ao utilizar o tampão de acetato de amônio (Figura 1c) e de fosfato de sódio (Figura 1e), os produtos detectados nas reações foram iguais aos oligossacarídeos nativos com adutos de sódio (em azul) em todos os tempos analisados. Sendo a intensidade desses sinais superior quando se empregou o tampão de fosfato de sódio (Figura 1e). Isso era esperado tendo em vista a adição de cloreto de sódio durante o preparo da amostra, além dos íons de sódio provenientes do próprio tampão de incubação (fosfato de sódio). Esses sais podem melhorar a ionização de oligossacarídeos e, por isso, são indicados para esse tipo de análise (BRUKER DALTONICS, 2015).

Ao utilizar o tampão de fosfato de potássio (Figura 1d) e fosfato-salino (PBS) (Figura 1f), foram visualizados valores m/z referentes a oligossacarídeos nativos com aduto de potássio ou a oligossacarídeos oxidados com aduto de sódio (Tabela 1). E esses valores apresentaram alta intensidade em todos os tempos de análise.

Tabela 1. Valores m/z encontrados na análise espectrométrica de PASC em diferentes tampões e suas respectivas relações com celo-oligossacarídeos (nativos e/ou oxidados) com vários graus de polimerização (DPn), detectados como adutos de sódio $[M+Na]^+$ e potássio $[M+K]^+$.

Meio de incubação (Água/Tampões)	Massa/carga (m/z) dos oligossacarídeos	Oligossacarídeos sodiado $[M+Na]^+$	Oligossacarídeos potassidos $[M+K]^+$
Água/Fosfato de Potássio/Fosfato de Sódio	1013	$[DP6 + Na]^+$	-
Fosfato de Potássio	1029	$[DP6aa + Na]^+$	$[DP6 + K]^+$
Todos	1175	$[DP7 + Na]^+$	-
Água/Fosfato de potássio/Fosfato-salino	1191	$[DP7aa + Na]^+$	$[DP7 + K]^+$
Todos	1337	$[DP8 + Na]^+$	-
Água/Fosfato de potássio/Fosfato-salino	1353	$[DP8aa + Na]^+$	$[DP8 + K]^+$
Todos	1499	$[DP9 + Na]^+$	-
Água/Fosfato de potássio/Fosfato-salino	1515	$[DP9aa + Na]^+$	$[DP9 + K]^+$
Todos	1661	$[DP10 + Na]^+$	-
Fosfato de potássio/Fosfato-salino	1677	$[DP10aa + Na]^+$	$[DP10 + K]^+$

*aa refere-se ao oligossacarídeo oxidado na forma de ácido aldônico.

(WESTERENG et al., 2011; FORSBERG et al., 2011; BEY et al., 2013; GHATGE et al., 2015)

É importante destacar que o fosfato-salino é um tampão composto pela mistura dos sais de cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monohidratado. Como esse tampão possui tanto íons de sódio quanto de potássio, e as amostras do tampão de fosfato de potássio foram preparadas com a adição de cloreto de sódio, a dualidade na interpretação desses valores permanece. Porém, devido ao fato de esse produto estar presente neste ensaio (que é um controle nas reações enzimáticas), sugere que ele se refere a um oligossacarídeo nativo que foi detectado como aduto de potássio e não ao oligossacarídeo oxidado (produto esperado na reação com a enzima LPMO), que, por sua vez, possui mesmo valor m/z .

Destaca-se ainda que os tampões de acetato de amônio e de fosfato de sódio seriam os mais viáveis para o emprego em ensaios de atividade de LPMOs, tendo em vista que os perfis dos oligossacarídeos nesses tampões se assemelham àquele obtido quando o substrato está em água. Entre esses dois tampões, o de fosfato de sódio destacou-se por permitir detecção de mais oligossacarídeos (DP6 a DP10), quando comparado com o tampão de acetato de amônio, que, por sua vez, não detectou o DP6.

Os resultados obtidos demonstram claramente que os tampões podem influenciar na ionização dos produtos avaliados (Tabela 1), evidenciando a necessidade de estudar o perfil dos substratos empregados nos ensaios em diferentes tampões, para garantir a correta interpretação dos produtos detectados durante a análise, além de permitir uma análise mais sensível.

Considerações Finais

Foi possível notar a influência dos tampões na ionização dos oligossacarídeos. Percebeu-se que os oligossacarídeos detectados nos tampões que contêm sais de potássio (fosfato de potássio e fosfato-salino) podem referir-se tanto a oligossacarídeos nativos com adutos de potássio ou a produtos da ação enzimática de LPMOs (oligossacarídeos oxidados). Dessa forma, torna-se inviável a utilização desses tampões, bem como de outro que contenha o íon de potássio em sua composição. Isso permitirá minimizar os possíveis interferentes na detecção da atividade da enzima de interesse. Dentre os tampões avaliados, o mais indicado para ensaios enzimáticos de LPMO foi o fosfato de sódio, uma vez que identificou um maior número de oligossacarídeos nativos (DPs), com destaque para o m/z 1013, que não foi identificado pelos demais tampões.

Agradecimentos

Ao SEG (Sistema Embrapa de Gestão), pelo suporte financeiro por meio do Projeto UPZYME. À Embrapa Agroenergia e à Universidade Federal do Tocantins, pelo apoio técnico, científico e acadêmico.

Referências

- AGGER, J. W.; ISAKEN, T.; VÁRNAI, A.; VIDAL-MELGOSA, S.; WILLATS, W. G.; LUDWIG, R.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G.; WESTERENG, B. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 17, p. 6287-6292, 2014.
- BEESON, W. T.; VU, V. V.; SPAN, E. A.; PHILLIPS, C. M.; MARLETTA, M. A. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 923-946, 2015.
- BEY, M.; ZHOU, S.; POIDEVIN, L.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; BERRIN, J. G.; SIGOILLOT, J. C. Cello-Oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (Family GH61) from *Podospora anserina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 488-496, 2013.
- BRUKER DALTONICS. **Bruker guide to MALDI sample preparation**: instructions for use. 15 p. [S.l.], 2015. Revision E.
- EIBINGER, M.; GANNER, T.; BUBNER, P.; ROSKER, S.; KRACHER, D.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R.; PLANK, H.; NIDETZKY, B. Cellulose surface degradation by lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulose hydrolytic efficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 52, p. 35929-35938, 2014.
- FORSBERG, Z.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; BUNÆS, A.C.; STENSTRØM Y.; MACKENZIE, A.; SØRLIE M.; HORN, S.J.; EIJSINK, V.G.H. Cleavage of cellulose by CBM33 protein. **Protein Science**, v. 20, n. 9, p. 1479-1483, 2011.
- GHATGE, S. S.; TELKE, A. A.; WAGHMODE, T. R.; LEE, Y.; LEE, K. W.; OH, D. B.; SHIN H. D.; KIM, S. W. Multifunctional cellulolytic auxiliary activity protein HcAA10-2 from *Hahella chejuensis* enhances enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 3041-3055, 2015.

HARRIS, D. C. Espectrometria de massas. In: HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. p. 523-524.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry**: principles and applications. 3. ed. Chichester: Wiley, 2007.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, artigo 45, 2012.

ISACKEN, T.; WESTERENG, B.; AACHMANN, F. L.; AGGER, J. W.; KRACHER, D.; KITTL, R.; LUDWIG, R.; HALTRICH, D.; EIJSINK, V. G.; HORN, S. J. A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 289, n. 5, p. 2632-2642, 2014.

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.

RODRIGUES, K. B.; MACÊDO, J. K. A.; TEIXEIRA, T.; BARROS, J. S.; ARAÚJO, A. C. B.; SANTOS, F. P.; QUIRINO, B. F.; BRASIL, B. S. A. F.; SALUM, T. F. C.; ABDELNUR, P. V.; FÁVARO, L. C. L. Recombinant expression of *Thermobifida fusca* E7 LPMO in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* and their functional characterization. **Carbohydrate Research**, v. 448, p. 175-181, 2017.

RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; VRIES, R.P.; MÄKELÄ, M. R. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

SOREK, N.; YEATS, T. H.; SZEMENYEI, H. J.; YOUNGS, H.; SOMERVILLE, C. R. The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. **BioScience**, v. 64, n. 3, p. 192-201, 2014.

VERMAAS, J. V.; CROWLEY, M. F.; BECKHAM, G. T.; PAYNE, C. M. Effects of lytic polysaccharide monooxygenase oxidation on cellulose structure and binding of oxidized cellulose oligomers to cellulases. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 20, p. 6129-6143, 2015.

WESTERENG, B.; ISHIDA, T.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WU, M.; EIJSINK, V. G. H.; IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; STAHLBERG, J.; HORN, S. J.; SANDGREN, M. The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose. **PloS One**, v. 6, n. 11, artigo e27807, 2011.

WOOD, T. M. Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates. **Method in Enzymology**, v. 160, p. 19-25, 1988.

ZHANG, J.; ZHANG, J.; LIN, L.; CHEN, T.; ZHANG, J.; LIU, S.; LI, Z.; OUYANG, P. Dissolution of microcrystalline cellulose in phosphoric acid—molecular changes and kinetics. **Molecules**, v. 14, n. 12, p. 5027-5041, 2009.