

Avaliação da atividade enzimática de biofábricas produtoras de Beta-glicosidases baseadas em microalgas

Artur F. B. Arantes¹, Hellen C. A. Braga¹, Thais D. Mendes¹, Félix G. Siqueira¹, Bruno S. A. F. Brasil¹

Introdução

A demanda por combustíveis no mercado agroindustrial brasileiro é crescente. Atualmente, o principal fator limitante para conversão eficiente da energia contida na biomassa lignocelulósica em etanol consiste na indisponibilidade de tecnologias de baixo custo, em especial, no que diz respeito à desconstrução da holocelulose presente na parede celular vegetal em açúcares fermentescíveis por meio de hidrólise enzimática. Frente a este panorama, a utilização de organismos geneticamente modificados ganha destaque como uma alternativa para produção de enzimas em grandes quantidades e com propriedades desejáveis. A utilização de microalgas como biofábricas de proteínas recombinantes é uma alternativa promissora, devido à alta taxa de crescimento destes microrganismos e ao seu baixo custo potencial (POSTEN; ROSELLO-SASTRE, 2012) Como modelo conceitual, propõe-se a expressão de novas Beta-glicosidases de alta eficiência, previamente prospectadas a partir de bibliotecas metagenômicas obtidas da biodiversidade brasileira pela Embrapa Agroenergia. O trabalho teve como objetivo avaliar os melhores métodos de recuperação da atividade enzimática de Beta-glicosidases heterólogas expressas a partir de microalgas (cianobactérias) geneticamente modificadas (*Synechococcus elongatus*) construídas no projeto Algasec. Potencialmente, essas biofábricas fotossintetizantes produtoras de enzimas poderiam capturar as emissões de carbono geradas na própria usina sucroenergética, o que reduziria os custos para produção de etanol lignocelulósico e diminuiria o passivo ambiental gerado pela indústria.

Métodos

Primeiramente seis cepas de cianobactérias *Synechococcus elongatus* (*S. elongatus* 1 LPB – 24-15; *S. elongatus* 5 LPB – 25-15; *S. elongatus* 6 LPB – 26-15; *S. elongatus* 9 LPB – 27-15; *S. elongatus* 10 LPB – 28-15; *S. elongatus* Controle LPB – 29-15) geneticamente modificadas (vetor pSyn1 – Life Technologies) pela inserção de gene codificador para enzima beta-glicosidase de origem procariótica. Os clones foram cultivados em meio BG-11

¹ Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901; artur.arantes@colaborador.embrapa.br, bruno.brasil@embrapa.br

(LPB-103) sob iluminação (6.000 Lux) constante a 34°C durante 15 dias até alcançarem a densidade óptica 2,9 a 730nm (ZHOU et al., 2014a e b). As amostras foram submetidas ao rompimento da parede celular, no qual foram pipetadas em tubos eppendorfs de 1,5 ml e centrifugadas a 14.000 rpm – 4min. Logo em seguida, descartou-se o meio sobrenadante e foi adicionado 0,2 g de carboneto de silício (200-450 mesh – Sigma Aldrich) ao pellet de células. Consequente, foram realizados três ciclos de maceração manual com auxílio de um pilão, alternados por três ciclos de descanso em cuba de gelo. O tempo total de processamento é de 6 minutos para cada amostra, um minuto para cada ciclo respectivamente. Por fim, foi adicionado às amostras 0,5ml tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7 para em seguida serem novamente centrifugadas nas prévias condições (ZHOU et al., 2014b). Para realização dos testes enzimáticos, usou-se o sobrenadante obtido de cada uma das seis cepas. Para análise proteica total empregou-se o método de Bradford e nas análises de atividade enzimática empregaram-se testes com 4-Metilumbeliferil Beta-D-Glucoronida (MUG).

Resultados e Conclusões

Nos resultados obtidos a partir do método de Bradford foi observado alto teor proteico em todas as amostras, destacando-se a cepa LPB 24-15 possuindo $0,87 \pm 0,0185$ mg/ml de proteína solúvel. Referente aos testes com MUG foi possível detectar atividade em todas as cepas, evidenciando maior grau na cepa LPB 25-15. Dessa forma, pode-se comprovar o promissor uso de microalgas como biofábricas no mercado agroindustrial. Nas próximas etapas do projeto, serão desenvolvidos métodos de cultivo otimizados em fotobiorreatores suplementados com CO₂ visando o incremento da expressão enzimática.

Apoio Financeiro

Embrapa (Projeto AlgaSEC – SEG: 03. 12. 11. 006. 00. 00)

Referências

POSTEN, C.; ROSELLO-SASTRE, R. Microalgae reactors. In: ULLMANN'S Encyclopedia of Industrial Chemistry. [New York]: Wiley, 2012.

ZHOU, J.; ZHANG, F.; MENG, H.; ZHU, Y.; BAO, G.; ZHANG, Y.; YIN, L.; YANHE, M. Discovery of a super-strong promoter enables efficient production of heterologous proteins in cyanobacteria. **Scientific Reports**, n. 4, article n° 4500, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep04500>>. Acesso em: Julho/2015.

ZHOU, J.; ZHANG, F.; MENG, H.; ZHU, Y.; BAO, G.; ZHANG, Y.; YIN, L. Development of a silicon carbide disruption method enables efficient extraction of proteins from cyanobacterium *Synechocystis* sp. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 49, n. 12, p. 2199-2202, 2014b.