

Expressão heteróloga de uma β -glicosidase de *Chryseobacterium* sp.

*Mateus Florentino Barbosa*¹, *Betulia de Moraes Souto*², *Andrêssa de Rezende Bastos Araujo*³, *Rosângela Vieira de Andrade*⁴, *Betania Ferraz Quirino*⁵

Resumo

As enzimas são utilizadas em muitas áreas da indústria para se conseguir, como resultado da reação, um produto específico ou melhorar a qualidade do produto final. As β -glicosidases são um exemplo disso, possuindo aplicação em diferentes áreas industriais como na indústria alimentícia e na conversão de biomassa, podendo ser usada individualmente ou associada a outras enzimas. No presente estudo uma β -glicosidase triada do genoma de *Chryseobacterium* sp. foi nomeada de C-B1, transformada em *Escherichia coli* TunerDE3 no vetor pET21a(+) e expressa utilizando o método de autoindução. Após a sua expressão, C-B1 foi purificada usando coluna GE His-trap HP 5 mL (GEHealthcare) no sistema de purificação de proteínas ÄKTA Pure, tendo a pureza desta enzima sido comprovada por meio de eletroforese em gel SDS PAGE 12% das frações proteicas coletadas. A fração que continha a proteína pura foi submetida a análise para determinação da concentração proteica usando o Kit BCA ProteinAssay (Pierce) e a atividade enzimática da mesma foi testada nos substratos sintéticos pNPG (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo), pNP α G (p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo), pNPC (p-nitrofenil- β -D-celobiose), pNPX (p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo), pNPGal (p-nitrofenil- α -D-glucopyranosídeo), e nos substratos naturais celobiose, maltose, lactose e salicina. C-B1 mostrou atividade em pNPG, pNPX, pNPGal, celobiose e salicina, mostrando sua versatilidade para uso industrial, pois sua atividade indica sua atuação como β -glicosidase, β -xilosidase, β -galactosidase, o que demonstra que a enzima pode ser usada para diferentes processos, para a obtenção de diferentes produtos.

Palavras-chave: β -glicosidase, expressão heteróloga, purificação enzimática.

Introdução

Enzimas são catalisadores biológicos que modificam a velocidade de uma reação química, tornando-a mais rápida. Elas realizam essa função em organismos vivos, porém também podem ser extraídas das células e utilizadas com diferentes propósitos, alguns com grande importância industrial (Robinson, 2015). Enzimas possuem grande potencial para utilização industrial, pois quando comparada com processos químicos convencionais elas trazem vários benefícios como, por exemplo, uma redução na geração de subprodutos químicos e tóxicos, além de elevar a qualidade final dos produtos (Arbige; Shetty; Chotani, 2019).

¹ Graduando em Biomedicina, Universidade Católica de Brasília, mateus.barbosa@a.ucb.br

² Bióloga, mestre em Biologia Molecular, analista da Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

³ Biotecnologista, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, bolsista na Embrapa Agroenergia, andressa.b.arj@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Bioquímica e Biologia Molecular, professora da Universidade Católica de Brasília, rosangelavand@gmail.com

⁵ Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

As β -glicosidases são enzimas com grande importância biológica, fazendo a hidrólise de ligações glicosídicas e liberando os resíduos glicosídeos terminais não redutores de glicosídeos e oligossacarídeos. Essas enzimas podem ser encontradas em diferentes organismos na natureza atuando em diferentes funções biológicas. As β -glicosidases podem ser utilizadas em diferentes áreas da indústria. Uma das suas aplicações é na indústria alimentícia, pois algumas possuem a capacidade de hidrolisar precursores de sabor β -glicosídicos em alimentos e bebidas, melhorando assim o sabor desses produtos e elevando sua qualidade final (Cairns; Esen, 2010).

Além de poderem melhorar o sabor de alimentos e bebidas β -glicosidases podem ser utilizadas para melhorar o aroma de mostos e vinhos. Nestes produtos a proporção de constituintes glicosídicos é alta, sendo que quando encontrados nessa forma eles são não voláteis, ou seja, não emitem odor (Jesús Ibarz et al., 2006). As β -glicosidases podem ser utilizadas para hidrolisar esses precursores aromáticos liberando assim o odor latente desses produtos, o que auxilia na produção de vinhos de alta qualidade (Jesús Ibarz et al., 2006; Loscos et al., 2010).

β -glicosidases também podem ser utilizadas em alimentos à base de soja para a hidrólise de isoflavonas, gerando agliconas. A soja é um componente alimentício utilizado em muitos alimentos e bebidas, mas as suas isoflavonas só se encontram biodisponíveis quando estão em sua forma aglicosídica (agliconas). Assim, a utilização de β -glicosidases no processamento da soja pode elevar significativamente a qualidade nutricional destes alimentos (Hati et al., 2015 apud Park Yk et al., 2002).

Estas enzimas também possuem grande importância na degradação da biomassa, pois a hidrólise enzimática é uma das formas de se conseguir extrair a glicose desta. A glicose extraída pode ser posteriormente utilizada para a conversão em etanol. Para uma hidrólise completa da biomassa são necessárias enzimas distintas como as celulases, que pela grande quantidade de celulose presente na biomassa são as que possuem maior importância (Singhania et al., 2013). As β -glicosidases hidrolisam celodextrinas solúveis e celobiose em glicose, sendo que por conta da celobiose ser um inibidor das celobiohidrolases e das endoglucanases o papel das β -glicosidases é de grande importância para garantir que todo o processo ocorra de forma eficaz (Zhang; Zhang, 2013).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é expressar, purificar e realizar testes de atividade enzimática em uma potencial β -glicosidase proveniente de *Chryseobacterium* sp., dando início a sua caracterização bioquímica por meio de teste de atividade em diferentes substratos, tanto sintéticos como naturais.

Material e Métodos

Expressão Heteróloga: A metodologia escolhida para a expressão da β -glicosidase em *E. coli* foi o protocolo de autoindução. Esta metodologia foi desenvolvida por Studier et al., 1990, para linhagens de *E. coli* DE3 lisogênicas como BL21(DE3) e B834(DE3), que suplementam T7 RNA polimerase quando o promotor do lacUV5 é induzido em combinação com os vetores pET de expressão, nos quais a expressão é controlada pelo promotor T7lac (Studier et al., 1990; Studier, 2005). O meio utilizado permite o crescimento de células em alta densidade, com estabilidade do plasmídeo e promove uma autoindução da expressão heteróloga em shaker. Assim, fica eliminada a indução

espontânea que ocorre em meios complexos (Grossman et al., 1998). Foi utilizada a linhagem TunerDE3 e o vetor pET21a(+) para expressão de proteínas heterólogas.

Uma cepa de *E. coli* contendo o plasmídeo com a possível β -glicosidase nomeada de C-B1, estocada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi utilizada para fazer um segundo estoque onde ela foi cultivada em uma placa de Petri com meio LB Sólido e ampicilina a $200\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, onde ficou *overnight* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a cepa crescer na placa ela foi inoculada em um tubo falcon de 50 mL contendo 3 mL de meio LB líquido e $3\text{ }\mu\text{L}$ de ampicilina, em seguida foi mantida em um *shaker overnight* a 300 RPM e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Deste inóculo foi-se colocado em 2 microtubos, $360\text{ }\mu\text{L}$ como estoque da bactéria, nos microtubos também foram colocados $24\text{ }\mu\text{L}$ de glicerol a 50 %, esses estoques foram congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Do estoque foi usado $2\text{ }\mu\text{L}$ para fazer o pré-inóculo em 2 mL de meio MDAG-135 em um falcon de 50 mL com $2\text{ }\mu\text{L}$ de ampicilina, o falcon foi colocado no *shaker overnight* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 RPM. Do pré-inóculo $130\text{ }\mu\text{L}$ foram usados para se fazer o inóculo em 130 mL de meio ZYM 5052 em um erlenmeyer de 1 litro que foi colocado a 300 RPM, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ *overnight* e depois por 2 dias a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 RPM. Depois disso o inóculo foi centrifugado a 3000 xg por 10 minutos, o pellet foi descartado e o sobrenadante foi separado e filtrado em um filtro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ para ser purificado.

A purificação foi feita no sistema de purificação de proteínas ÄKTA Pure com uma coluna GE Histrap 5 ml, usando água MilliQ, Tampão LEW, Tampão LEW com 300 nM de imidazol.

Após purificação da β -glicosidase, o grau de pureza da enzima foi analisado em gel SDS PAGE 12%. A concentração da enzima purificada foi determinada usando o Kit BCA ProteinAssay (Pierce).

Caracterização Bioquímica: Foram realizados ensaios com $10\text{ }\mu\text{L}$ dos substratos sintéticos pNPG, pNPGal, pNPC, pNP α G e pNPX a 50 mM , $10\text{ }\mu\text{L}$ de tampão MES $0,5\text{ M}$ $5\text{ }\mu\text{L}$ da amostra contendo a enzima ou $5\text{ }\mu\text{L}$ da amostra contendo a enzima inativada por fervura (ensaio controle) e $75\text{ }\mu\text{L}$ de água Milli-Q, foram incubados por 15 minutos à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, após isso foi adicionado $100\text{ }\mu\text{L}$ de carbonato de sódio 1 M , foi coletado $190\text{ }\mu\text{L}$ e lido em espectrofotômetro a 405 nm . Dos substratos naturais foram testados celobiose, maltose, lactose e salicina à 150 mM . Neste ensaio utilizou-se, $15\text{ }\mu\text{L}$ da solução de substrato, $20\text{ }\mu\text{L}$ da solução de enzima, $30\text{ }\mu\text{L}$ de tampão MES $0,5\text{ M}$ e $35\text{ }\mu\text{L}$ de água Milli-Q, as misturas foram incubadas por 30 minutos à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e por mais 10 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi adicionado $150\text{ }\mu\text{L}$ de glicose monorreagente e incubado por mais 10 minutos à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por fim, foi coletado $200\text{ }\mu\text{L}$ de cada amostra e a leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro à 505 nm para determinar a atividade específica.

Resultados e Discussão

A cepa de *E. coli* foi usada para expressão da proteína C-B1 seguindo o método de autoindução criado por Studier et al., 1990, resultando em 130 mL de inóculo que foi centrifugado e purificado, depois disso a proteína teve sua pureza comprovada por eletroforese em gel SDS PAGE 12% (Figura 1).

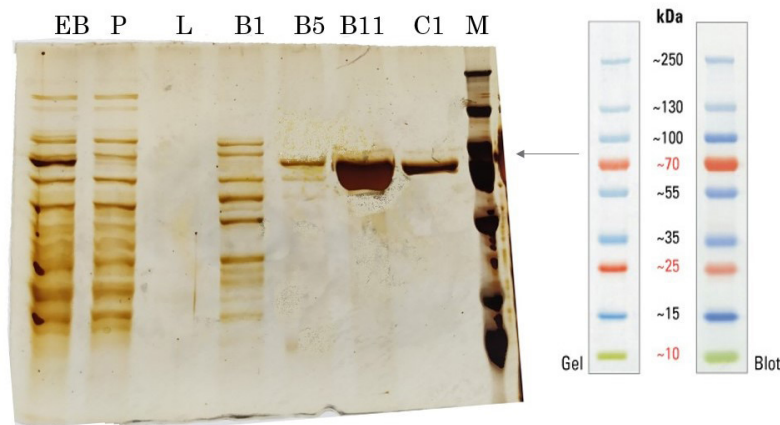


Figura 1. Gel de eletroforese SDS PAGE 12 %. Legenda: EB: Extrato Bruto (Inóculo Filtrado antes da purificação); P: Passado (Proteínas que não se ligaram a coluna GE Histrap durante a purificação); L: Lavado (Amostra resultante da lavagem da coluna após a passagem da amostra); B1: Poço B1 da placa resultante da purificação; B5: Poço B5 da placa resultante da purificação; B11: Poço B11 da placa resultante da purificação; C1: Poço C1 da placa resultante da purificação; M: Marcador PageRuler Plus da ThermoScientific, a imagem das bandas formadas pelo marcador se encontram ao lado do gel.

A quantificação foi feita usando o Kit BCA ProteinAssay (Pierce) onde a concentração proteica medida foi de 0,130 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Em seguida, a atividade enzimática foi testada em diferentes substratos, tanto substratos sintéticos como naturais como mostram os resultados na Figura 2.

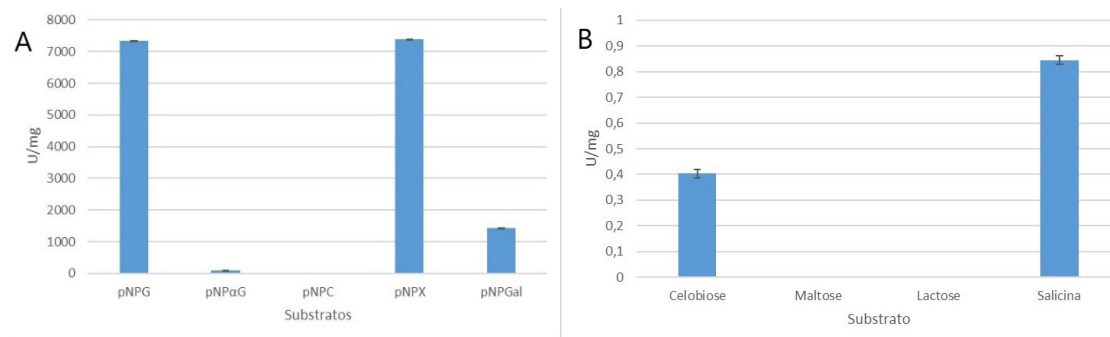


Figura 2. A. Atividade específica da C-B1 em substratos sintéticos; B. Teste de atividade específica da C-B1 em substratos naturais.

Na Figura 2A observa-se que a C-B1 teve atividade de 7348,4 U/mg de atividade em pNPG, 101 U/mg em pNP α G, 0 U/mg em pNPC, 7386,4 U/mg em pNPX e 1429,4 U/mg em pNPGal. Enquanto na Figura 2B observa-se que a C-B1 teve atividade de 0,403 U/mg em celobiose, 0 U/mg em maltose e lactose, e 0,844 U/mg em salicina.

A C-B1 demonstrou atividade em diferentes substratos. Isto é uma vantagem, pois aumenta as possibilidades de seu uso em diferentes áreas da indústria, tendo ela atividade em pNPG indicando sua atuação como uma β -glicosidase, em pNPX o que indica que ela possui atividade como β -xilosidase, em pNPGal indicando atividade como β -galactosidase. A enzima terá ainda sua atividade testada em xilobiose uma vez que

ela possuiu atividade em pNPX. Além disso, a enzima também possui atividade nos substratos naturais celobiose e salicina.

A enzima C-B1 até agora tem se apresentado como uma β -glicosidase bastante promissora, com alta atividade em substratos como pNPG e celobiose. Ela também apresentou alta atividade em salicina. Os produtos gerados pela salicina podem ser utilizados na indústria farmacêutica e estética.

Considerações Finais

No presente estudo uma β -glicosidase, nomeada de C-B1, que havia sido triada de *Chryseobacterium* sp. e que teve seu gene transformado em *E. coli*, foi expressa utilizando o método de autoindução (Studier et al., 1990). Após a sua expressão a enzima foi purificada na coluna GE His-trap HP 5 mL (GEHealthcare), e teve sua purificação acompanhada em gel SDS PAGE. Por fim, ela foi quantificada usando o Kit BCA ProteinAssay (Pierce). A proteína purificada teve sua atividade testada em diferentes substratos, tanto sintéticos como naturais. C-B1 mostrou alta atividade em pNPG, pNPX, celobiose e salicina, demonstrando que há diferentes possibilidades para sua utilização industrial.

Referências

- ARBIGE, M. V.; SHETTY, J. K.; CHOTANI, G. K. Industrial Enzymology: The Next Chapter. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1355–1366, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.09.010>>.
- CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3389–3405, 2010.
- GROSSMAN, T. H.; KAWASAKI, E. S.; PUNREDDY, S. R.; OSBURNE, M. S. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. **Gene**, v. 209, n. 1–2, p. 95–103, 1998.
- HATI, S.; VIJ, S.; SINGH, B. P.; MANDAL, S. β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 216–220, 2015.
- JESÚS IBARZ, M.; FERREIRA, V.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; LOSCOS, N.; CACHO, J. Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 217–229, 2006.
- LOSCOS, N.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 205–216, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.008>>.
- ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 2015.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>>.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein expression and purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.
- STUDIER, F. W.; ROSENBER, A. H.; DUNN, J. J.; WUBENDORFF, J. W. [6] Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. In: **Methods in enzymology**. [s.l.: s.n.]185p. 60–89.
- ZHANG, X.; ZHANG, Y. P. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. [s.l.: s.n.]