

# Caracterização de Potencial Xilanase de *Paenibacillus* sp. WS30

*Sarah Conessa de Moura*<sup>1</sup>, *Betulia de Moraes Souto*<sup>2</sup>, *Andrêssa de Rezende Bastos Araujo*<sup>3</sup>, *Betania Ferraz Quirino*<sup>4</sup>

## Resumo

Xilanases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação glicosídica  $\beta$ -(1,4) da cadeia linear da xilana, um dos principais polissacarídeos estruturais das células vegetais e o segundo mais abundante na natureza. Bactérias e fungos são eficientes produtores de enzimas xilanolíticas, sendo assim nesse trabalho genes de potenciais xilanases da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia foram clonados em cepas de *Escherichia coli* Tuner DE3 por meio do plasmídeo pET21a. Oriundo de *Paenibacillus* sp. o gene P\_X6 foi expresso em *E. coli* e destacou-se pela atividade da enzima produzida sobre xilana. A proteína P\_X6 apresenta 39,65 kDa de massa molecular, tendo o gene que a codifica 1.023 pares de bases. A atividade enzimática de P\_X6 foi avaliada nos substratos sintéticos pNPG, pNPGal, pNPC, pNP $\alpha$ G e pNPX e nos naturais xilana, celobiose, maltose, lactose, salicina e xilobiose. Posto isso, após 72 horas de expressão, concentração da amostra e purificação por cromatografia de afinidade, verificou-se a presença de atividade enzimática em pNPX, pNPC e em xilana. A P\_X6 se mostrou promissora por apresentar alta atividade em xilana de faia.

**Palavras-chave:** xilanases, xilana, genoma, bioquímica e aplicação industrial.

## Introdução

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais comum na natureza, compondo cerca de um terço da biomassa lignocelulósica (Saha, 2003). Trata-se de um polímero heterogêneo agrupado em quatro classes: xiloglucanos, xilanas, mananos e glucomananos e  $\beta$ -glucanos (Scheller; Ulvskov, 2010). A bioconversão de xilana tem recebido cada vez mais atenção, tendo em vista suas aplicações em processos industriais com a síntese orgânica de produtos de valor agregado a partir da hemicelulose (Malgas et al., 2019; Nieto-Domínguez et al., 2019).

A hidrólise enzimática de polissacarídeos surgiu como uma tecnologia proeminente para conversão de biomassa lignocelulósica em monômeros de açúcar e posteriormente em produto com valor agregado (Dyk; Pletschke, 2012). As xilanases são importantes enzimas hidrolíticas responsáveis pela clivagem da ligação glicosídica  $\beta$ -(1,4) da cadeia linear da xilana, gerando xilo-oligossacarídeos curtos como, por exemplo, a xilobiose (Irfan et al., 2016; Motta; Andrade; Sant, 2013; Rennie; Scheller, 2014). A grande maioria das xilanases utilizadas na indústria são produzidas por microrganismos como bactérias e fungos (Choi; Han; Kim, 2015).

<sup>1</sup> Graduanda em Biologia, Universidade Católica de Brasília, sarah.conessam@gmail.com

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

<sup>3</sup> Biotecnologista, mestra em Ciências Genômicas e Biotecnologia, andressa.b.arj@gmail.com

<sup>4</sup> Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

As xilanases microbianas apresentam ampla aceitação no mercado de enzimas industriais, movimentando cerca de 200 a 300 milhões de dólares anuais (Leisola et al., 2011). Dessa forma, despertam cada vez mais o interesse pelo potencial biotecnológico para aplicação em escala industrial que possuem (Burlacu; Cornea; Israel-Roming, 2016). Algumas dessas aplicações, por exemplo, são a clarificação de sucos ou cervejas, panificação, amolecimento e branqueamento de frutas para polpas, processamento de tabaco, extração de óleos vegetais, recuperação de fibras têxteis, bioconversão de resíduos agrícolas e produção de álcool de segunda geração (Kumar et al., 2017; Kumar; Pratyooosh, 2018; Shah; Charlton; Kim, 2017). Porém, cada processo requer enzimas ativas em condições diferentes. Logo, é necessário antes da comercialização a determinação de parâmetros que identifiquem o potencial que cada enzima apresenta em termos de aplicação industrial. Para isso é realizada a caracterização, ou seja, a especificação de seu pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade e parâmetros cinéticos.

Nesse contexto, este trabalho propõe a otimização da expressão e a caracterização bioquímica de uma potencial xilanase selecionada da biodiversidade microbiana brasileira, visando determinar seu potencial para aplicação industrial.

## Material e Métodos

### Seleção do clone a ser trabalhado

Cinco cepas de *Escherichia coli* Tuner DE3 transformadas com o plasmídeo pET21a e contendo os genes de potenciais xilanases (B1096 GH11-1, F43 GH10-2, P\_X6, A\_X1 e A\_X2) foram obtidas. A origem dos genes B1096 GH11-1 e F43 GH10-2 foi do transcriptoma de um fungo, P\_X6 do genoma de *Paenibacillus* sp. e A\_X1 e A\_X2 do genoma de *Arthrobacter*.

As cepas foram estriadas em placas com meio LB agar estéril com 200 µg/mL de ampicilina e dessa forma permaneceram na estufa por 24 horas a 37 °C. Após o crescimento das colônias em placas, para a expressão dos genes clonados, foi realizado um protocolo de autoindução, no qual as células foram primeiramente crescidas em meio MDAG (Studier, 2014) a 37 °C *overnight* e depois inoculadas em meio ZYM5052 (Studier, 2005) a 37 °C *overnight*, e a 20 °C por 48 horas. Após realizar a autoindução, os clones foram avaliados quanto à sua atividade em xilana de faia. Para isso foram testados tanto o sobrenadante quanto o *pellet* da indução, sonificado. A atividade enzimática foi feita com 5 µl de tampão MES pH 6,0, 25 µl de xilana 6% (p/v) e 20 µl do sobrenadante retirado de cada amostra. Os meios reacionais foram colocados em uma placa de PCR e incubados em termociclador por 20 minutos a 50° C. Em seguida, foi adicionado 120 µl de DNS seguido de incubação por mais 10 minutos no termociclador a 99° C. As amostras foram transferidas para uma placa de elisa de fundo chato e foi feita a leitura da absorbância a 540 nm. Uma curva padrão de xilose foi utilizada para quantificação da atividade enzimática.

### Expressão de P\_X6 em *E. coli*

Tendo em vista a continuidade dos testes de atividade com o clone P\_X6 foi realizada uma nova produção em maior quantidade. Logo foi feito um pré-inóculo em

5 mL de meio mínimo de crescimento MDAG (Studier, 2014), com 5  $\mu$ L de ampicilina 200  $\mu$ g/mL. Para o controle negativo em bioensaios, foi utilizada uma cepa de *E. coli* Tuner com pET21a vazio e, para controle positivo, foi usado o clone Xnd01, que possui comprovada atividade em xilana. As amostras foram incubadas a 37 °C, 300 rpm, *overnight*. A partir do pré-inóculo foi realizado um inóculo de 300 mL de meio ZYM 5052 (Studier, 2005) com ampicilina a 200  $\mu$ g/mL. A amostra foi incubada a 37 °C *overnight* e 20 °C por 48 horas.

### Concentração, purificação e quantificação proteica em amostras contendo P\_X6

Após a expressão da proteína conforme descrito anteriormente, a amostra produzida (300 mL) teve o sobrenadante coletado e levado ao concentrador Amicon Stirred Cells 200 mL. O sobrenadante foi concentrado para 50 mL por meio de uma membrana de 10 kDa.

A purificação da xilanase P\_X6 foi feita usando o sistema de purificação de proteínas AKTA PURE (GE Healthcare Life Sciences). O método utilizado foi de cromatografia por afinidade utilizando a coluna GE His-trap HP 5 mL e os tampões Lew e Lew 300 mM imidazol para eluição (segundo o protocolo descrito no manual da Protino Ni-TED/IDA).

Após purificação, o grau de pureza de P\_X6 foi determinado em gel SDS PAGE 12%, no qual a amostra purificada, o extrato bruto e as frações coletadas na purificação (passado e lavado) foram submetidos a eletroforese com uma corrente constante de 30 mA.

A concentração proteica na fração coletada após corrida cromatográfica, que continha atividade catalítica de P\_X6 foi medida utilizando o Kit Pierce™ BCA Protein Assay conforme o protocolo do fabricante (ThermoFisher Scientific).

### Teste de atividade da P\_X6 em derivados de pNP

Foram utilizados diferentes substratos sintéticos derivados de para-Nitrofenol (pNP) para avaliar a atividade enzimática, sendo eles pNPC (p-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo), pNPX (p-nitrofenil- $\beta$ -D-xylopiranosídeo), pNPG (p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo), pNP $\alpha$ G (p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo) e pNPGal (p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo). Esses substratos foram preparados a uma concentração final de 50 mM.

Com cada substrato foi realizado o teste de atividade enzimática em triplicata. Logo, foi adicionado em poços de uma placa de PCR 10  $\mu$ l de cada substrato, 5  $\mu$ l da amostra purificada de P\_X6, 10  $\mu$ l de tampão MES e 75  $\mu$ l de água deionizada em sistema Milli-Q. As reações foram incubadas no termociclador por 15 minutos a 50 °C, em seguida foi adicionado 100  $\mu$ l de carbonato de sódio 1M e coletado 190  $\mu$ l de cada poço para leitura a 405 nm no espectrofotômetro. Os valores de absorbância foram convertidos em concentrações de pNP usando uma curva de calibração previamente construída. As concentrações de pNP determinadas em cada amostra foram utilizadas para o cálculo da atividade enzimática. Uma unidade de atividade (1 UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol/min nas condições utilizadas nesse estudo.

### Teste de atividade da P\_X6 em substratos naturais

O teste foi realizado com os substratos celbiose, maltose, lactose, salicina e xilobiose preparados a 150 mM e xilana 4% (p/v). Foi feito em triplicata com a adição

de 15 µl do substrato, 20 µl de P\_X6, 30 µl de tampão MES 0,5M e 100 µl de água deionizada em sistema milli-Q em cada poço. A reação foi incubada no termociclador por 30 minutos a 50° C e em seguida a 95° C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 150 µl de glicose monorreagente do kit Bioclin e a reação permaneceu no termociclador por mais 10 minutos a 37° C. As amostras foram coletadas e a absorbância avaliada no espectrofotômetro em 505 nm.

O teste de atividade enzimática de P\_X6 em xilana de faia ocorreu conforme descrito no tópico 'Seleção do clone a ser trabalhado'.

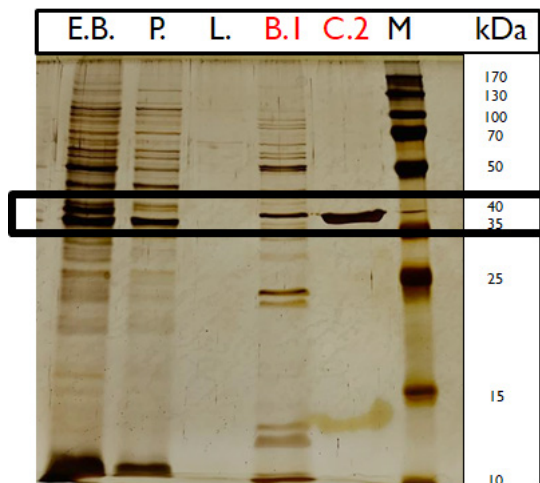
## Resultados e Discussão

### Seleção do clone com maior potencial para hidrólise de xilana

Após análise das atividades hidrolíticas em xilana catalisada pelas enzimas obtidas da expressão dos 5 clones (GH11-1, F43 GH10-2, P\_X6, A\_X1 e A\_X2) avaliados nesse estudo, foi possível verificar que o clone *E. coli* pET21a com inserto P\_X6 apresentou maior atividade enzimática em xilana, quando comparado aos demais clones. Logo, esse clone foi selecionado para prosseguir com a expressão dessa enzima para caracterização. Para esse clone, a enzima é secretada para fora da célula, ou seja, pode ser extraída diretamente do sobrenadante do cultivo, o que facilita o processo de purificação e elimina a necessidade de sonicar as células como ocorre frequentemente em *E. coli*.

### Purificação de P\_X6

Após a passagem do sobrenadante, previamente concentrado, do cultivo de *E. coli* contendo a proteína P\_X6 no AKTA PURE (GE Healthcare Life Sciences) para a purificação, foram coletadas duas frações compreendidas entre dois intervalos de tempos da corrida cromatográfica, ou seja, regiões do cromatograma em que foram observadas frações de absorção referente a proteínas. Essas frações foram submetidas à análise em gel de SDS PAGE 12%, dessa forma verificou-se que na primeira coletada (B1) várias proteínas indesejáveis estavam presentes, contudo, na segunda (C2) foi possível obter a proteína P\_X6 pura, conforme mostra a Figura 1.

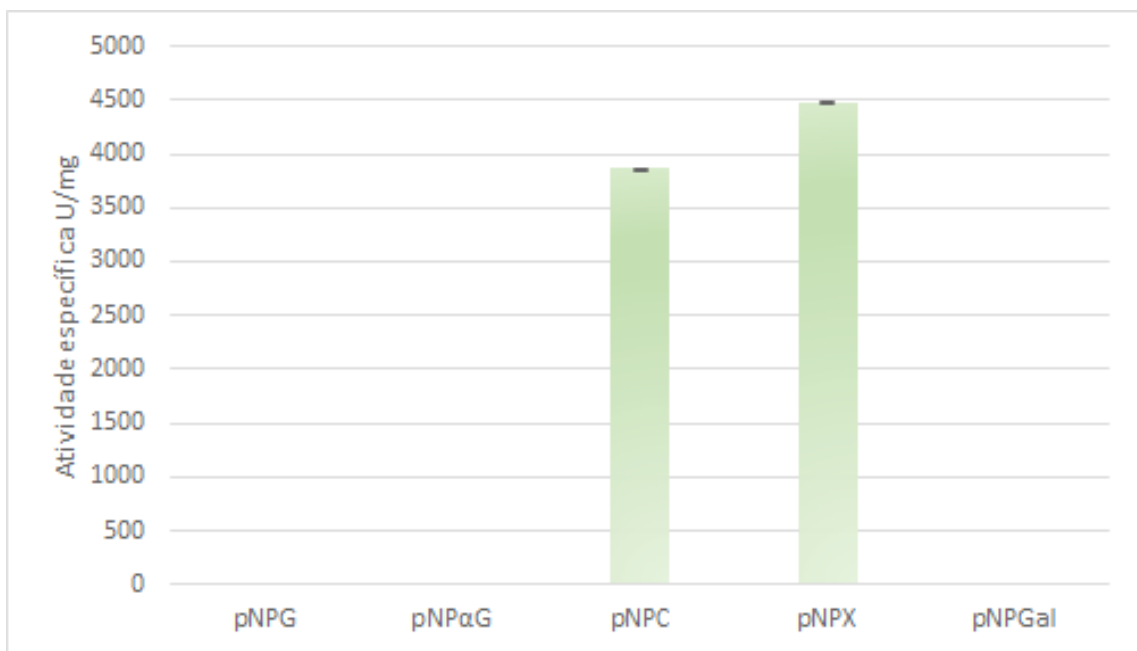


**Figura 1.** Análise eletroforética em gel de poliácridamida 12% das frações coletadas após a purificação de P\_X6 no AKTA PURE (GE Healthcare Life Sciences). A banda na altura de 40 kDa indica que a proteína foi purificada conforme o esperado. E.B: extrato bruto, P: passado, L: lavado, M: marcador de massa molecular "Page Ruler Prestained Protein Ladder" da Thermo Scientific.

## Teste de atividade enzimática da P\_X6 em derivados de pNP

Por meio da quantificação proteica realizada com o Kit BCA Protein Assay, obteve-se um total de 0,12  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de P\_X6 purificada, viabilizando o início dos testes de atividade enzimática em substratos sintéticos e naturais. O primeiro a ser feito foi o teste em derivados de pNP.

Como observado na Figura 2, a potencial xilanase P\_X6 demonstrou alta atividade em pNPC (p-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo) e pNPX (p-nitrofenil- $\beta$ -D-xylopiranosídeo) e nenhuma atividade em pNPG (p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo), pNP $\alpha$ G (p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo) e pNPGal (p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo). Tal atividade é característica de celobio-hidrolases (pNPC) e  $\beta$ -xilosidases, logo é provável que a hidrólise de derivados de pNP possa ser atribuída a mais de uma especificidade da potencial P\_X6.



**Figura 2.** Teste de atividade enzimática da P\_X6 em derivados de pNP sendo eles: pNPG (p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo), pNPGal (p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo), pNPC (p-nitrofenil- $\beta$ -D-Celobiosídeo), pNPX (p-nitrofenil- $\beta$ -D-xylopiranosídeo) e pNP $\alpha$ G (p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo). O desvio padrão foi calculado com base em triplicatas.

## Teste de atividade da P\_X6 em substratos naturais

Por fim, foi realizado o teste nos substratos naturais maltose, celobiose, lactose, salicina, xilobiose e xilana. Porém foi observado atividade apenas em xilana de faixa, conforme o protocolo utilizado no início para seleção dos clones. Foi constatado que a P\_X6 apresenta atividade catalítica semelhante à do controle positivo GH10-1 (Xnd01), com atividade enzimática de 21, 1957 U/mg. Portanto, P\_X6, deve atuar como xilanase.

## Conclusão

A enzima P\_X6 originada de *Paenibacillus* sp. foi produzida de forma heteróloga em *E. coli*. Esta enzima possui atividade em diferentes substratos, mas atua principalmente como uma xilanase. Novos ensaios estão em andamento para prosseguir com a caracterização bioquímica da P\_X6.

## Referências

- BURLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. Microbial Xylanase: A Review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. XX, 2016.
- CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, nov. 2015.
- DYK, J. S. VAN; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — Factors affecting enzymes , conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.
- IRFAN, M. et al. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp . in submerged fermentation ScienceDirect Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp . in submerged. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 139–147, 2016.
- KIM, D. Y. et al. Bioresource Technology Novel intracellular GH10 xylanase from *Cohnella laeviribosi* HY-21: Biocatalytic properties and alterations of substrate specificities by site-directed mutagenesis of Trp residues. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8814–8821, 2010.
- KUMAR, S. et al. Purification , characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- KUMAR, V.; KUMAR, A.; PRATYOOSH, D. Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its Industrial Applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 226–235, 2018.
- L. MOTTA, F.; P. ANDRADE, C. C.; A. SANT, M. H. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**, 2013.
- LEISOLA, M. et al. INDUSTRIAL USE OF ENZYMES. **Physiology and maintenance**, v. II, 2011.
- MALGAS, S. et al. A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1–13, 2019.
- NIETO-DOMÍNGUEZ, M. et al. Exploiting xylan as sugar donor for the synthesis of an antiproliferative xyloside using an enzyme cascade. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019.
- PASTOR, O. G. P. D. F. I. J. Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosides : a new subclass of family 10 xylanases. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 61, n. 3, p. 226–233, 2003.
- RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. Xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100–107, 2014.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.
- SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.
- SHAH, V.; CHARLTON, T.; KIM, J. R. Laboratory Evolution of *Bacillus circulans* Xylanase Inserted into *Pyrococcus furiosus* Maltodextrin-Binding Protein for Increased Xylanase Activity and Thermal Stability Toward Alkaline pH. **Springer Science, Business Media**, 2017.
- 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. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 1091, p. 17–32, 2014.