

# Expressão heteróloga de uma potencial $\beta$ -glicosidase de *Paenibacillus* sp.

Rodrigo Mauricio Marinsek Sales<sup>1</sup>, Betulia Morais de Souto<sup>2</sup>, Andrêssa de Rezende Bastos Araujo<sup>3</sup>, Betania Ferraz Quirino<sup>4</sup>

## Resumo

O mercado industrial de enzimas cresce em bilhões de dólares todos os anos de acordo com a empresa *Business Communication Company Research* (BCC), pois as enzimas desempenham papel importante na catálise de muitas reações químicas em processos industriais. As  $\beta$ -glicosidases desempenham uma posição importante no mercado de enzimas, devida a sua alta versatilidade, criando a possibilidade de imergi-las em muitas áreas do mercado. Em projetos anteriores da Embrapa Agroenergia, foram construídas bibliotecas metagenômicas e genomas de microrganismos da biodiversidade brasileira foram sequenciados. A partir dessas bibliotecas foi possível fazer triagens funcionais na busca de atividade  $\beta$ -glicosidase. Alguns dos genes encontrados foram expressos em *Escherichia coli*, entretanto, ainda é necessário realizar as etapas de seleção das  $\beta$ -glicosidases com mais atividade e posteriormente sua purificação e caracterização bioquímica. Neste trabalho, uma das  $\beta$ -glicosidases estudadas apresenta alta atividade sobre o substrato sintético pNPG (*p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo*), podendo ser eficiente no processo de degradação de celulose. Após as etapas de expressão e purificação, a enzima estudada foi submetida a teste de atividade em substratos naturais, como celobiose, e não apresentou resultados significativos. Uma hipótese, para estes resultados é a baixa concentração proteica obtida na expressão, sendo insuficiente para atuação da enzima sobre os substratos. Ou, é possível que tenha se passado muito tempo desde o final da expressão, até a etapa dos testes de atividade, levando a degradação da P\_B12 ou a perda de atividade da enzima.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -glicosidase, expressão, celulose, aplicação industrial.

## Introdução

No mercado industrial, existem reações químicas que levam um determinado tempo a serem realizadas, porém, com a adição de enzimas específicas, o tempo da reação pode ser reduzido. Além de diminuir o tempo de reação, as enzimas criam a possibilidade de operar as reações em condições mais amenas, com uma excepcional seletividade do produto e produzindo menor toxicidade ambiental e fisiológica (Chapman et al., 2018). De acordo com a empresa *Business Communication Company Research* (BCC), o mercado de enzimas pode crescer de US\$5.5 bilhões em 2018 para US\$7.0 bilhões em 2023, com uma taxa de crescimento anual composta de 4.9% para o mesmo período.

<sup>1</sup> Graduando em Biologia, Universidade Católica de Brasília, marinsekodigo@gmail.com

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

<sup>3</sup> Biotecnologista, mestre 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  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) ocupam um espaço importante no mercado de enzimas, devido à possibilidade de usá-las em muitas áreas do mercado. Uma delas é a produção de biocombustíveis de segunda geração a partir da degradação da celulose. Então, para que haja a conversão da celulose em glicose, existe um processo de degradação que envolve diferentes classes de enzima: as endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases (Singhania et al., 2017). As  $\beta$ -glicosidases atuam na etapa final da conversão da biomassa lignocelulósica, hidrolisando resíduos terminais  $\beta$ -D-glicosil não redutores de dissacarídeos como celobiose, convertendo-os em  $\beta$ -D-glicose (Hendriks, Zeeman, 2009).

Em projetos anteriores da Embrapa Agroenergia, foram construídas bibliotecas metagenômicas e genomas de microrganismos da biodiversidade brasileira foram sequenciados. A partir dessas bibliotecas foi possível fazer triagens funcionais na busca de atividade  $\beta$ -glicosidase. Alguns dos genes encontrados foram expressos em *Escherichia coli*, entretanto, ainda é necessário realizar as etapas de seleção das  $\beta$ -glicosidases com mais atividade e posteriormente sua purificação e caracterização bioquímica.

A determinação dos diversos parâmetros bioquímicos é o primeiro passo para se identificar possíveis aplicações industriais, uma vez que cada processo tem características distintas. Dessa forma, neste trabalho foram realizadas as expressões de  $\beta$ -glicosidases, para futuramente purificá-las e caracterizá-las bioquimicamente visando determinar seu potencial para aplicação industrial.

## Material e Métodos

### Expressão heteróloga

A metodologia escolhida para a expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* foi o protocolo de autoindução. Esta metodologia foi desenvolvida por Studier et al. (1990). Foi utilizada a linhagem TunerDE3 e o vetor pET21a(+) para expressão de proteínas heterólogas. Foi produzido 70 mL do meio MDAG-135 descrito por Studier et al (2014) para o pré-inóculo dividido em 7 tubos de 50 mL (um tubo para cada clone e controle) com ampicilina na concentração final de 200  $\mu$ g/mL. O pré-inóculo foi incubado em *shaker overnight* à 37 °C e 300 rpm.

Depois, foi produzido 70 mL de meio ZYM-5052 descrito por Studier et al (2005) para um inóculo nas mesmas condições e foram incubado em *shaker overnight* à 37 °C e 300 rpm. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 3000 xg e 4 °C, para separar o pellet do sobrenadante. Os sobrenadantes foram submetidos a um teste de atividade com o substrato pNPG (p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo) para aferir qual dos clones tinha mais atividade neste substrato e purificar a primeira  $\beta$ -glicosidase.

## Atividade enzimática

O teste de atividade enzimática foi realizado montando uma reação com 10  $\mu\text{L}$  de tampão MES 50 mM pH 6.0, 5  $\mu\text{L}$  de pNPG (*p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo) e 85  $\mu\text{L}$  de sobrenadante (produto da expressão). Montada a reação, o material foi incubado a 50 °C por 20 minutos em termociclador. Depois, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCO}_3$  1mM, para interromper a reação. O produto das reações foi transferido para uma microplaca de fundo chato e lido em espectrofotômetro à 405 nm. Como controle positivo foi usado a  $\beta$ -glicosidase BGL11, que já foi caracterizada em projetos anteriores da Embrapa Agroenergia, e como controle negativo foi usado um clone com o vetor pET21a(+) vazio.

## Expressão em larga escala

Em uma produção em maior escala da P\_B12, o pré-inóculo e o inóculo foram feitos conforme já descrito no item 2.1, porém o volume final de cultivo foi de 200 mL para obtenção de maior quantidade proteica no sobrenadante. Os inóculos foram incubados em *shaker* por 24 horas à 300 RPM e 37 °C e depois por 48 horas à 300 RPM e 20 °C. Após a produção, as amostras foram passadas para tubos de 250 mL e foram centrifugados por 20 minutos à 3000 xg e 4 °C para a coleta do sobrenadante.

## Purificação e quantificação

A purificação foi feita usando coluna GE His-trap HP 5 mL (GEHealthcare) e com tampões LEW e LEW com Imidazol 300 mM (Seguindo o manual da Protino Ni-TED/IDA). O tampão LEW usado foi composto por: (1)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (fosfato de potássio), concentração final de 50 mM; (2) NaCl (cloreto de sódio), concentração final de 300 mM; e (3) água *milliQ*. O processo foi realizado no equipamento Akta Pure (GEHealthcare).

Após purificação da  $\beta$ -glicosidase de interesse, o grau de pureza da enzima foi analisado em gel SDS PAGE 12%. A concentração da enzima purificada foi calculada utilizando o nanodrop (Thermo Fisher Scientific) em Protein A280 ou utilizando o kit de quantificação BCATM *Protein Assay Kit* conforme indicações do fabricante.

## Resultados

### Confirmação da atividade dos clones de *E. coli* em pNPG

Algumas potenciais  $\beta$ -glicosidases clonadas em *E. coli* foram selecionadas para serem expressas pelo método de autoindução descrito por Studier et al. (1990). Cinco clones foram selecionados para a expressão, mais um controle negativo e um controle positivo. Após a produção e mensuração da atividade enzimática em pNPG foi possível observar que o clone referente à potencial  $\beta$ -glicosidase P\_B12 apresentou a maior absorvância ao avaliar o sobrenadante, indicando que a proteína estava sendo expressa e liberada para o meio extracelular, conforme mostrado na Tabela 1.

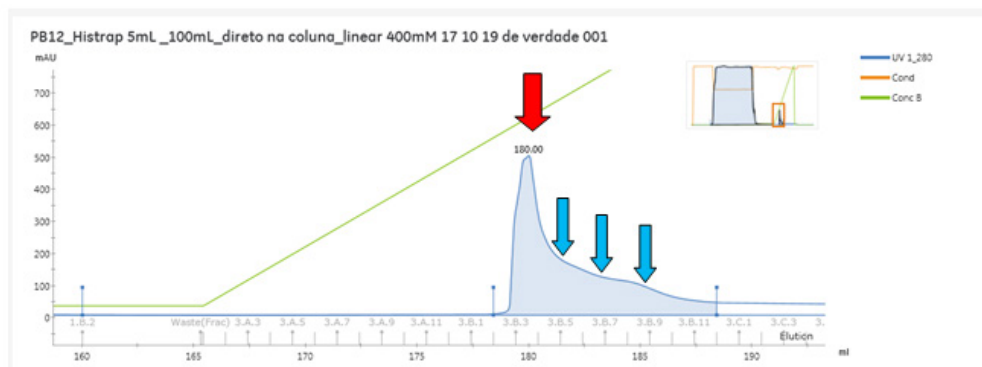
O clone escolhido para prosseguir com a produção em maior escala foi o clone *E. coli* pET21a P\_B12, devida a alta absorvância que essa enzima apresentou diante das outras enzimas no teste de atividade.

**Tabela 1.** Avaliação da presença de atividade enzimática após autoindução em meio de cultura descrito por Studier, F.W. et al. (1990), por 24 horas à 37 °C e 48 horas a 20 °C. O ensaio foi feito com o substrato pNPG (*p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo). No controle negativo foi usado um clone com o vetor pET21a(+) vazio. No controle positivo foi usado uma  $\beta$ -glicosidase já caracterizada, denominada BGL11.

Enzimas	Absorbância 405 nm
Controle Negativo	0,131
Controle Positivo	1,970
A_B2	0,234
C_B8	0,140
G11-33	0,132
P_B12	3,422
E_08-24 <sup>GR</sup>	2,881

## Purificação por afinidade e SDS-PAGE 12%

Após a produção da potencial  $\beta$ -glicosidase P\_B12, o sobrenadante foi submetido ao AKTA Pure para ser purificado, fazendo uso da coluna GE His-trap HP de 5 mL. Na Figura 1, é mostrado o cromatograma da purificação. Acredita-se que o pico indicado com a seta vermelha sejam outras proteínas indesejáveis e a proteína de interesse esteja entre os pontos marcados com as setas azuis.

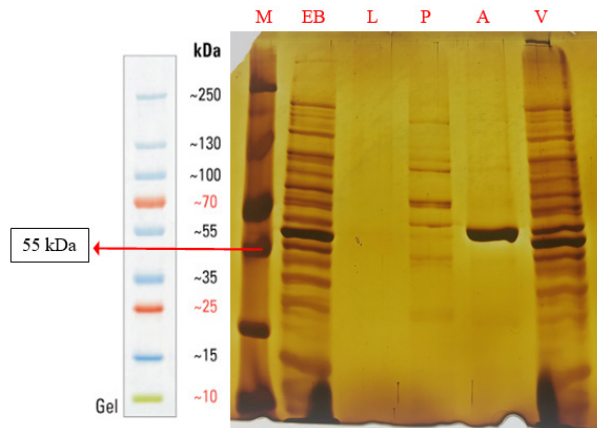


**Figura 1.** Perfil cromatográfico de purificação por afinidade em AKTA Pure da enzima P\_B12 após produção de 200 mL de sobrenadante. A linha azul (UV1\_280) indica a absorbância medida a 280 nm. A linha laranja (Cond) indica a condutividade dos tampões. A linha verde (Conc B) indica a concentração do tampão Lew com Imidazol.

A P\_B12 possui um tamanho aproximado de 51,43 kDa e, após a sua purificação, foi feito um gel de SDS PAGE 12% para confirmar sua presença, como mostrado na Figura 2. Por meio da análise eletroforética é possível perceber que no pico indicado com a seta vermelha (poço V) houve eluição de muitas proteínas que não são a proteína de interesse, por outro lado, nos picos indicados com as setas azuis (poço A), é possível observar uma banda na altura de 55 kDa que indica ser a P\_B12 pura.

O gel de SDS PAGE 12% produzido mostra indícios de que a P\_B12 está presente e purificada, porém, foi feita uma quantificação com BCATM Protein Assay Kit e, ao final do experimento não havia quantidade suficiente de proteína pura.

Também foram feitos ensaios enzimáticos com substratos sintéticos (pNPG, pNPGal, pNPC, pNPαG e pNPX) e naturais (celobiose, maltose, lactose, 1,4 β-D-xilobiose) para aferir a atividade da P\_B12, contudo, ela não apresentou atividade nesses substratos.



**Figura 2.** Gel de SDS PAGE 12% referente a purificação da potencial β-glicosidase P\_B12. No gel, a letra “M” indica o marcador PageRuler Prestained Protein, as letras “EB” indicam o extrato bruto, a letra “L” indica o lavado, a letra “P” indica o passado, a letra “A” indica as setas azuis da Figura 1 e a letra “V” indica o pico com a seta vermelha da Figura 1.

Uma das hipóteses levantadas para estes resultados, é que talvez tenha passado muito tempo desde o final da expressão, até a etapa dos testes de atividade, levando a degradação da P\_B12 ou a perda de atividade da enzima. Outra hipótese, é a baixa concentração proteica obtida na expressão, sendo insuficiente para atuação da enzima sobre os substratos.

## Conclusão

Cinco clones foram escolhidos para terem sua atividade enzimática testada. Após o teste, as reações foram lidas em espectrofotômetro e a P\_B12 apresentou a maior absorbância, sendo assim, o clone com maior atividade enzimática para o substrato pNPG (*p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo*). A enzima possivelmente foi purificada, porém, a quantidade de proteína obtida na expressão não foi suficiente para montar um ensaio enzimático que fosse capaz de degradar os substratos sintéticos e naturais. Assim, não foi possível fazer uma caracterização bioquímica da P\_B12. A maior meta do projeto é obter uma enzima com alto valor biotecnológico e caracterizada bioquimicamente. Para isso, é necessário realizar mais testes e otimizar as expressões, para que seja possível obter uma maior concentração de proteínas e o ensaio enzimático seja mais eficiente.

## Referências

BBC RESEARCH. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. Sep, 2018. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>>.

CHAPMAN, J., ISMAIL, A.E., DINU, C.Z. 2018. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**. Vol. 8, 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 100 (1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>

SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., PANDEY, A.; GANANSOUNOU, E. (2017). Genetic modification: A tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. **Bioresource Technology**, 245, 1352–1361. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.126>

STUDIER, F.W. 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**. Vol. 41, Issue 1. Pag. 207-234. ISSN 1046-5928. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.

STUDIER, F.W., ROSENBERG, A.H., DUNN, J.J., DUBENDORFF, J.W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol**. 185:60–89.