

Expressão Heteróloga e Caracterização Bioquímica de Enzimas Lignocelulolíticas e Proteínas Acessórias do fungo *Thermomyces lanuginosus* em *Komagataella phaffii*

Luana Assis Serra¹, Janice Lisboa De Marco², João Ricardo M. Almeida³

Resumo

Os combustíveis fósseis apresentam uma parcela significativa na matriz energética e têm sido extensivamente utilizados ao longo do tempo. Estes recursos são finitos e devido ao aumento de demanda de energia estão cada vez mais caros, gerando um aumento de preços em setores essenciais em todo o mundo. Considerando os fatores econômicos e ambientais, processos biotecnológicos para produção de energia e produtos químicos renováveis estão em desenvolvimento como fonte de energia alternativa. A biomassa lignocelulósica apresenta grande potencial para geração de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração, e outros produtos bioderivados. As enzimas lignocelulolíticas atuam na desconstrução da biomassa e a identificação e caracterização de novas enzimas é de grande interesse. As celulasas, hemicelulasas e proteínas com atividade acessória auxiliam no processo de conversão da biomassa em produtos de valor agregado. Além disto, estas enzimas possuem importante aplicação em vários setores da indústria: como farmacêutica, alimentos, detergentes e têxtil. Para a produção de alto rendimento destas proteínas e redução de custos, a otimização de sistemas de expressão recombinantes em microrganismos é altamente desejada. Neste trabalho, sequências gênicas provenientes do fungo *Thermomyces lanuginosus* que possivelmente codificam para as proteínas poligalacturonase (TLPG), mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (TLPMO), expansinas-like (TLEX2) e feruloil esterases (TLFE1 e TLFE2) foram obtidas para a expressão heteróloga em *Komagataella phaffii* X33. Estas sequências gênicas foram otimizadas e clonadas em vetor de expressão pGAPZB ou pPICZαA. Após a transformação genética de *K. phaffii*, os clones positivos foram selecionados e cultivados. A produção das proteínas TLPG, TLPMO, TLEX2 e TLFE1 foi avaliada por SDS-PAGE e *Western-blot* para detecção da proteína heteróloga. A atividade enzimática foi verificada e ensaios de caracterização bioquímica iniciais foram realizados.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica, biocombustíveis, expressão heteróloga, proteínas lignocelulolíticas.

¹ Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, doutoranda em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, luaserra@globo.com

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, professora-adjunta da Universidade de Brasília, janicedemarco@unb.br

³ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

Introdução

Como uma alternativa aos combustíveis fósseis, diversos estudos estão investigando soluções baseadas em processos biotecnológicos renováveis e sustentáveis. A biomassa lignocelulósica tem sido apontada como uma possível fonte para produção de energia e bioprodutos. Neste contexto, a utilização da biomassa para produção de etanol lignocelulósico e outros compostos químicos de interesse tem sido amplamente avaliado, e assim, apontado como forma de viabilizar economicamente a cadeia produtiva de biocombustíveis, valorizar resíduos e coprodutos e reduzir a eliminação de resíduos industriais (Paes; Almeida, 2014).

Para tal, a biomassa deve ser pré-tratada para que ocorra o afrouxamento das porções de celulose, hemicelulose e lignina. Em sequência, ocorre o processo de hidrólise responsável pela degradação dos carboidratos complexos da biomassa em açúcares monoméricos, que pode ser hidrolisada mediante ação enzimática. Um consórcio de enzimas contendo diferentes classes de proteínas pode ser desenvolvido para aumentar a eficiência da degradação do substrato. Entre estas, estão as proteínas acessórias como, as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) e expansinas-like, que exercem um papel essencial na desconstrução da celulose pois possuem uma ação sinérgica com enzimas celulolíticas. Para a degradação da hemicelulose, proteínas como a feruloil esterase (FE) facilitam o acesso de enzimas hemicelulolíticas ao substrato aumentando a liberação dos açúcares ali presentes. Adicionalmente, proteínas como a poligalacturonase (PG) são capazes de degradar a pectina que é um constituinte da biomassa. Estas enzimas possuem diversas aplicações na indústria, como na de alimentos, sendo utilizada na clarificação de sucos (Mellitzer et al, 2012; Maitan-Alfenas et al., 2015).

Neste sentido, pesquisas em enzimas lignocelulolíticas (celulases, hemicelulases, e proteínas acessórias) provenientes de fungos tem recebido grande atenção, pois estes microrganismos têm se demonstrado altamente eficientes e eficazes na hidrólise da biomassa, tanto pela capacidade de produção de um coquetel enzimático quanto pela possibilidade de isolamento de enzimas específicas para suplementação de coquetéis. Apesar dos grandes avanços técnico-científicos na área, a descoberta de novas enzimas lignocelulolíticas é de grande interesse para as biorrefinarias que estão se desenvolvendo, inclusive para a indústria de bioetanol. Para reduzir o custo e alcançar altas produções destas enzimas, um sistema de expressão heterólogo é altamente favorecido (Silva; Vaz; Filho, 2017).

A levedura *K. phaffii* é um excelente sistema para expressão heteróloga de enzimas lignocelulolíticas. A sua capacidade de realizar modificações pós traducionais, fácil manipulação genética, altos níveis de secreção da proteína heteróloga e o status GRAS (*Generally recognized as safe*) tornam esta levedura um importante sistema de expressão (Gomes et al., 2016). Este trabalho visa a expressão heteróloga das proteínas feruloil esterase (TLFE1), poligalacturonase (TLPG), LPMO (TLPMO1) e expansina-like (TLEX2) provenientes do genoma de *Thermomyces lanuginosus* na levedura *K. phaffii*. Em etapas seguintes, as proteínas recombinantes serão purificadas e caracterizadas bioquimicamente. Por fim, estas serão adicionadas a coquetéis enzimáticos para avaliação da ação sinérgica na desconstrução de substratos sintéticos e da biomassa de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Obtenção das sequências das proteínas de interesse e transformação genética de bactéria e levedura

As sequências referentes às enzimas de interesse foram pesquisadas no genoma do fungo *T. lanuginosus* a partir das informações de bancos de dados online. Desta forma, as sequências selecionadas foram sintetizadas no vetor de expressão escolhido, pGAPZB (TLEX2) e pPICZαA (TLPMO1, TLFE1 e TLPG). A transformação em bactéria (*Escherichia coli* DH 10BT1) por eletroporação é essencial para a manutenção e multiplicação dos plasmídeos. Confirmados os clones recombinantes de bactérias (marca de seleção por antibiótico e análise de restrição), altas concentrações de DNA plasmidial foram obtidos através de midi-preparações (ThermoScientific). Para a transformação de levedura, 10 µg de DNA plasmidial foram obtidos e inseridos em células de *K. phaffii* X33 utilizando o protocolo de eletroporação, conforme o manual da Invitrogen (Catalog nos. V200–20).

Confirmação de colônias positivas por PCR e cultivo das leveduras recombinantes

Após o crescimento das colônias de *K. phaffii* transformadas por eletroporação, estas foram analisadas por PCR. Para a PCR, o DNA genômico foi utilizado como molde e oligonucleotídeos específicos para amplificação do fragmento do gene de interesse foram utilizados. As colônias confirmadas foram cultivadas a 28 °C em agitador orbital a 200 rpm, em Erlenmeyer de 1 litro contendo 100 mL de meio de cultura BMMY (para clones contendo pPICZαA) e BMGY (para clones contendo pGAPZB) [extrato de levedura 10 g/L; Peptona 20 g/L; 100 mM tampão fosfato de potássio, pH 6,0; YNB 1,34% (p/v); biotina 4 x 10⁻⁵ % (p/v); 2 glicerol % (v/v) ou 1% metanol (v/v)]. O cultivo foi realizado durante 96 horas. O extrato enzimático obtido através do cultivo foi analisado por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e Western-blot (*Sigma Aldrich protocol*).

Purificação das proteínas recombinantes e verificação de atividade enzimática

A purificação da proteína recombinante TLPG, TLPMO1 e TLEX2 foram feitas no equipamento AKTA pure (GE healthcare), com a coluna HisTrap, HP histidine-tagged protein purification columns de 5 mL (GE healthcare). As proteínas de interesse foram expressas com cauda de histidina, a qual pode ser utilizada para purificação em colunas de afinidade por níquel. As proteínas foram quantificadas (mg/mL) pelo método colorimétrico BCA (Kit Invitrogen). Para determinação da atividade de TLPG foi feito um ensaio com o extrato bruto de TLPG e a proteína purificada. O substrato utilizado foi o ácido poligalacturônico a 0,5% (p/v) com a curva padrão de ácido galacturônico variando de 0,2 a 2 mg/mL, e o ensaio foi realizado com tampão acetato de sódio/ácido acético 0,2 M pH 4,5 e temperatura de 40 °C. A quantificação do açúcar redutor foi feita pelo método de DNS (Miller, 1959) e baseado no trabalho de Anand et al. (2016). Os ensaios de atividade para a LPMO serão feitos com o kit comercial da *Thermo Scientific, Amplex red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase Activity Assay* (Kittl et al, 2012). Devido a ausência de atividade enzimática da proteína expansina-like, um ensaio de sinergismo foi realizado

com celulases (celluclast e enzimas de *Aspergillus* sp.) tendo como substrato papel filtro (FPase), de acordo com o trabalho de Xiao et al. (2004).

Resultados e Discussão

As quatro proteínas recombinantes, TLEX2, TLFE1, TLPMO1 e TLPG foram expressas pela levedura *K. phaffii* X33. A proteína TLEX2C2 se apresentou próximo ao marcador molecular de 25 kDa, sendo uma proteína de baixo peso molecular assim como outras expansinas-like. O seu tamanho predito era de 15,78 kDa, porém, estas proteínas possuem diferentes padrões de glicosilação. Isto pode causar o aumento do peso molecular e também a forma como se apresentam no gel em múltiplas bandas (Figura 1 A). Trabalhos anteriores demonstram os diferentes padrões de migração das expansinas no gel, devido a sua múltipla forma molecular resultante de glicosilações (Wang et al, 2014).

Os resultados do ensaio de sinergismo com celulases (celluclast e enzimas de *Aspergillus* sp.) e a proteína TLEX2 purificada (17 mg/L) não mostraram um efeito sinérgico entre a proteína TLEX2 e as celulases. O resultado do ensaio não foi surpreendente, pois até então não foram reportadas expansinas-like da classe de TLEX2 (cerato-plataninas) que possuam atividade sinérgica com celulases. Porém, estas proteínas devem ser analisadas quanto a sua capacidade sinérgica, já que estas são capazes de afrouxar as fibras de celulose (o mecanismo de ação destas proteínas não foi completamente elucidado) (Cosgrove, 2017). Desta forma, ensaios para a verificação da capacidade do afrouxamento de fibras de celulose posteriores devem ser realizados com TLEX2, como ensaios de sinergismo com maior concentração de TLEX2 purificada e ensaios mecânicos de afrouxamento de celulose.

A TLFE1 foi a única proteína não purificada, e apresentou expressão por diferentes colônias (2, 4, 6 e 12) apresentando tamanho pouco acima de 35 kDa (conforme pode ser observado pela Figura 1B). O seu tamanho predito era de 31,98 kDa e o aumento em seu peso molecular possivelmente ocorreu devido a glicosilações: O (3 sítios preditos) ou N (5 sítios preditos).

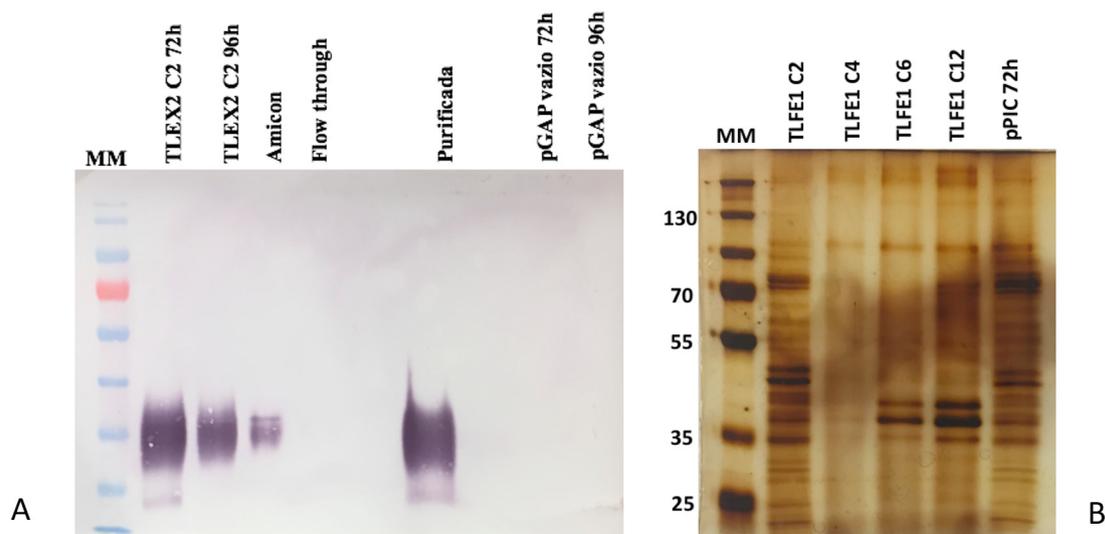


Figura 1. A) Western-blot de TLEX2C2 purificada; B) Análise da expressão de TLFE1 por SDS-page corado com nitrato de prata

A proteína TLPMO1 apresentou tamanho próximo ao marcador molecular de 55 kDa (Figura 2A), com a possibilidade de ter sofrido glicosilações pois o seu tamanho predito era de 29,16 kDa. Após a purificação de TLPMO1C8, esta foi quantificada por BCA e apresentou concentração de 4,4 mg/mL. No trabalho de Kittl et al. (2012), uma LPMO de *Neurospora crassa* foi expressa na mesma linhagem de *K. phaffii* utilizando o vetor pPICZαA, alcançando expressão de 2,76 mg/mL. Desta forma, um bom nível de expressão foi alcançado por TLPMO1 quando comparadas com outras LPMOs descritas na literatura. Com a proteína purificada, o ensaio de atividade amplex-RED foi realizado no qual houve detecção de produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de aproximadamente 4 μ M (Figura 2B). Este valor indica que a proteína está ativa, porém testes futuros precisam ser realizados para a sua caracterização bioquímica.

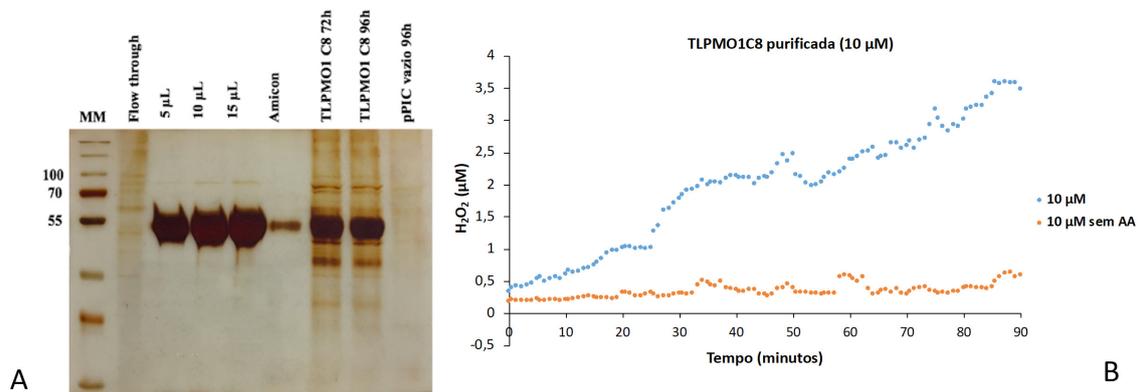


Figura 2. A) Análise da proteína TLPMOC8 purificada por SDS-PAGE corado com nitrato de prata; B) Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima TLPMO1C8.

A purificação de TLPGC15 alcançou uma concentração de 9 mg/mL de proteína recombinante pura. O tamanho predito para TLPGC15 era de 39,14 kDa, mas a banda observada ficou pouco acima do marcador de 55 kDa (Figura 3A). Conforme mencionado anteriormente, é possível que tenham ocorrido glicosilações, bastante comuns em proteínas expressas por *K. phaffii*. O ensaio por DNS confirmou a atividade de TLPGC15 purificada e apresentou liberação de açúcar redutor de mais de 7 mg/mL de açúcar redutor (Figura 3B). O ensaio foi realizado novamente após 15 dias para avaliar a estabilidade da enzima e uma redução na atividade foi observada (Figura 3A). Porém, a enzima se manteve ativa mesmo após 15 dias de armazenamento a 4 °C. Experimentos futuros serão realizados para a caracterização bioquímica e avaliação de parâmetros como pH, temperatura e fatores cinéticos (K_{cat} e K_m).

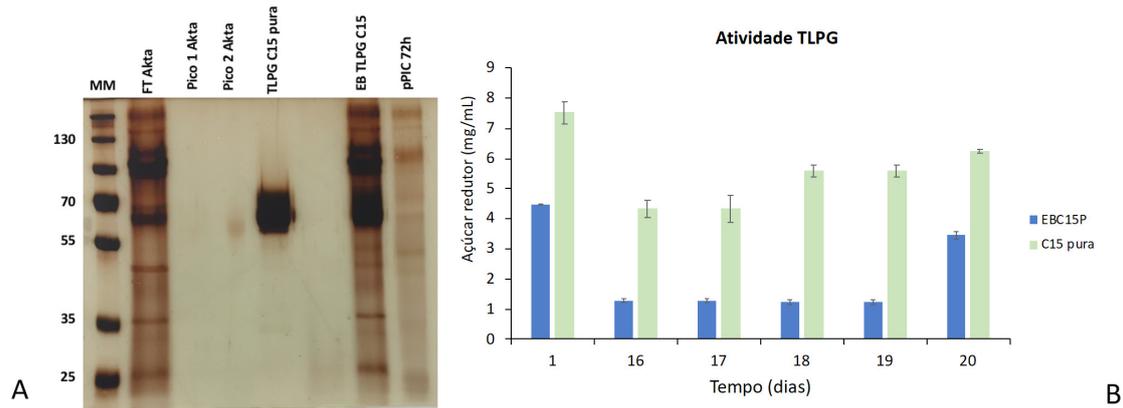


Figura 3. A) Análise da proteína TLPGC15 purificada por SDS-PAGE corado com nitrato de prata; B) Produção de açúcar redutor pela enzima TLP1C15 ao longo do tempo (dias).

Conclusões

As proteínas TLFE1, TLEX2, TLP1C15 e TLP2C15 foram expressas heterologicamente na levedura *K. phaffii*. Assim, as proteínas TLEX2, TLP1C15 e TLP2C15 foram purificadas e as suas atividades foram verificadas em ensaio preliminares. TLP1C15 apresentou a produção de H_2O_2 pelo ensaio amplex-RED e TLP2C15 confirmou sua atividade a partir da liberação de açúcar redutor por DNS. Um ensaio de atividade sinérgica entre celulasas e TLEX2 foi realizada, mas nenhum aumento de atividade foi observado sendo necessário a realização de novos experimentos. Ensaios futuros serão realizados para a caracterização bioquímica de TLP2C15, TLP1C15 e TLFE1. Todas as proteínas provenientes de *T. lanuginosus* descritas neste trabalho foram expressas pela primeira vez sob o controle do promotor GAP ou AOX. Por fim, estas proteínas serão avaliadas em experimentos posteriores quanto ao seu potencial de aplicação em coquetéis contendo diferentes classes de enzimas para a degradação sinérgica dos componentes da biomassa lignocelulósica.

Referências

- AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.
- ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus fumigatus* MTCC 2584 and elucidating its application in retting of *Crotalaria juncea* fiber. **3 Biotech**, v.6, n. 2, p. 1–7, 2016.
- COSGROVE, D. J. Microbial Expansins. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 479–497, 2017.
- INVITROGEN CORPORATION. Instruction Manual. *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant protein. Catalog n. V200–20, 2010.
- KITTL et al. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 79, p. 1–13, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 44–49, 2015.

- MELLITZER, A. et al. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n.1, p. 1–11, 2012.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- PAES, B. G.; ALMEIDA, J. R. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2014.
- SIGMA ALDRICH, 2020. *Western Blotting* Protocol (Immunoblotting Protocol). Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/western-blotting.html> (Acesso: 29 de setembro de 2020).
- SILVA, C. O. G.; VAZ, R. P.; FILHO, E. X. F. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, p. 1–13, 2017.
- WANG, W. et al. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 84, p. 16– 27, 2014.
- XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, ADRIAN. Microplate-Based Filter Paper Assay to Measure Total Cellulase Activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004.