

Prospecção e produção de uma nova xilanase visando aplicação biotecnológica

Andrêssa de Rezende Bastos Araujo¹, Valquíria Alice Lacerda Michalczechen², Betulia de Moraes Souto³, Dasciana de Sousa Rodrigues⁴, Betania Ferraz Quirino⁵

Resumo

O Brasil é um importador de enzimas. Visando aumentar sua participação neste mercado e desenvolver a sua bioeconomia, novos estudos de prospecção e caracterização de enzimas são necessários. Neste trabalho, o transcriptoma de um fungo brasileiro foi analisado e uma sequência codificante de uma possível xilanase, denominada Xnd01 foi avaliada por bioinformática para identificação de similaridade com outras proteínas e presença de domínios conservados e em seguida, selecionada para expressão heteróloga. A sequência codificante para Xnd01 foi inserida no vetor pGAPZαA para expressão em *Komagataella phaffi*. Após a síntese, o vetor foi transformado em seu respectivo hospedeiro e foi possível obter clones com atividade enzimática em xilana de faia. A enzima Xnd01 foi purificada e submetida a teste de atividade enzimática em CMC, Avicel, xilana de faia, celobiose, xilobiose, maltose e salicina e em seis substratos sintéticos (pNPC, pNPX, pNPαG, pNPG, pNPαAra e pNPGal). Em relação aos substratos naturais, Xnd01 somente apresentou atividade em xilana de faia. Já em relação aos substratos sintéticos testados, Xnd01 apresentou atividade em *p*-nitrofenil-β-D-celobiosídeo (pNPC), indicando que ela pode atuar como uma celobio-hidrolase. Novos ensaios de caracterização e determinação da especificidade desta enzima estão em processos de conclusão.

Palavras-chave: indústria biotecnológica, enzimas. celobio-hidrolase, xilanase.

Introdução

Enzimas são catalisadores biológicos que aceleram reações químicas na conversão de substrato em produto. Elas podem ser encontradas em microrganismos e usadas para acelerar uma gama de processos industriais. A palavra enzima foi utilizada pela primeira vez por Wilhelm Kühne em 1878 e é derivada das palavras gregas 'em' que significa 'dentro' e 'zume' que significa 'fermento' (Robinson, 2015).

A busca por novas enzimas é necessária para as mais diversas indústrias que as utilizam em seus processos, tais como a indústria alimentícia, a indústria têxtil e a indústria de biocombustíveis. Na indústria alimentícia as enzimas são fundamentais pois atuam em diversos processos. Um exemplo, é o processo de clarificação de sucos,

¹ Biotecnologista, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, bolsista da Embrapa Agroenergia, andressa.b.arj@gmail.com

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, colaboradora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, valquiria.michalczechen@gmail.com

³ Bióloga, mestre em Biologia Molecular, analista da Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

⁴ Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

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

deixando-os mais visualmente atraentes e melhorando o rendimento da sua extração da fruta. Para isso podem ser utilizadas pectinases, xilanases e outras enzimas (Singh et al., 2019).

Já na indústria de biocombustíveis é possível utilizar enzimas durante a produção do etanol de segunda geração, onde se faz necessário o uso de coquetéis enzimáticos para a desconstrução da biomassa lignocelulósica, que é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A atuação de celulases, xilanases, peroxidases, lacases e outras enzimas acessórias permitem a desconstrução da biomassa e o açúcar gerado em virtude desse processo pode ser utilizado para produção de biocombustíveis (BINOD et al., 2019). Dentro da família de celulases, pode-se encontrar as celobio-hidrolases que atuam nas extremidades redutoras ou não redutoras da cadeia de celulose liberando resíduos de celobiose que serão clivados por β -glicosidases em monômeros de glicose (Woon et al., 2016). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi prospectar uma enzima de um fungo da biodiversidade brasileira (*Cladosporium cladosporioides*) e caracterizar a mesma após identificar sua atividade enzimática.

Material e Métodos

Análise in silico de endoxilanase Xnd01

A sequência de aminoácidos de Xnd01 foi analisada no servidor web do NCBI usando Blastp (Altschul et al., 1997) e cinco sequências com maior similaridade foram usadas para comparar domínios conservados, usando o software Geneous (Kearse et al., 2012). As bases de dados Gene3D (<https://www.uniprot.org/database/DB-0029>), Pfam (<https://pfam.xfam.org/>), Panther (<http://www.pantherdb.org/>), PROSITE_PROFILES, PROSITE_PATTERNS (<https://prosite.expasy.org/>), ProDom (<http://130.88.97.239/bioactivity/prodomsrchjj.html>), PHOBIUS (<http://phobius.sbc.su.se/>), SIGNALP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), SMART e Superfamily foram utilizadas nesta análise. A análise filogenética molecular usando o método de máxima verossimilhança foi conduzida usando MEGA versão 6 (Tamura et al., 2013) com base no modelo baseado em matriz JTT. A confiabilidade da reconstrução filogenética foi estimada usando 1.000 repetições. A árvore filogenética foi construída com 15 sequências de xilanases fúngicas semelhantes a Xnd01 conforme o BLASTPe 5 celobio-hidrolases já caracterizadas estruturalmente de acordo com o banco de dados PDB (<https://www.rcsb.org/>).

Propagação do vetor pGAPZ α A Xnd01 em *Escherichia coli* e expressão em *Komagataella phaffi*

O vetor pGAPZ α A Xnd01 foi sintetizado pela empresa GeneOne e usado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* EPI300 (Sambrook; Russell 2001). As células bacterianas transformadas foram estriadas em meio ágar LB Low salt suplementado com zeocina (25 μ g / mL) e incubadas a 37° C durante a noite. Três

colônias foram selecionadas e submetidas à extração do DNA plasmidial, seguida de digestão com a enzima de restrição XhoI e eletroforese em gel de agarose 1% para verificar se o vetor foi sintetizado corretamente. O pGAPZαA Xnd01 foi linearizado com BspHI para integração no genoma de *K. phaffi* e eletroporado em cepas de *K. phaffi* X-33. Em seguida, doze colônias positivas foram cultivadas em 7 mL de meio YPD em falcons de 50 mL e incubadas a 30 ° C por 3 dias para indução da expressão e avaliação da atividade enzimática em xilana de faia. A colônia com maior atividade enzimática foi selecionada para indução em maior volume. Para a expressão constitutiva (pGAP), o transformante de *K. phaffi* foi cultivado em meio YPD por 3 dias e a produção da enzima foi realizada em um frasco aletado de 2 L a 30° C com agitação constante a 200 rpm. O sobrenadante da cultura foi coletado após 3 dias para purificação por afinidade em Akta Pure e análise da atividade de Xnd01 em diferentes substratos. A concentração da proteína pura foi mensurada no Nanodrop utilizando a massa molecular da proteína e o coeficiente de extinção.

Atividade enzimática

A atividade enzimática de Xnd01 foi avaliada em triplicata em substratos naturais e sintéticos. Os substratos inicialmente testados foram celobiose, xilobiose, CMC, avicel, maltose, salicina e xilana. Para a atividade com xilana de faia, a reação foi incubada a 50° C por 15 min e os açúcares liberados foram quantificados pelo método DNS (Miller, 1959). A curva padrão foi feita com xilose. Além disso, a atividade também foi avaliada em substratos sintéticos (pNPG, pNPX, pNPGal, pNPαG, pNPαAra e pNPC) a 45 °C por 15 minutos. Após interromper a reação pela adição de 100 μL de carbonato de sódio 1 mol/L, a quantidade de 4-nitrofenol liberada dos substratos foi medida pela leitura da absorbância a 405 nm (SpectraMax M3). Os dados foram comparados a uma curva padrão de 4-nitrofenol (pNP). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que liberou substrato a uma taxa de 1 μmol por minuto sob condições padrão.

Resultados e Discussão

Análise in silico de Xnd01

Xnd01 possui alta similaridade com endo xilanases da família GH 10 de origem fúngica. A família GH10 é composta, segundo o Cazy, por endo-1,4-β-xilanase, endo-1,3-β-xilanase, tomatinase, xilana endotransglicosilase e endo-β-1,4-glucanase. Em seguida, os domínios conservados foram analisados. A Figura 1 mostra o alinhamento de sequências e os domínios identificados em Xnd01 e nas cinco xilanases mais próximas de acordo com BlastP, onde é possível identificar a presença do domínio GH10 em todas as sequências.

Atividade enzimática de Xnd01

O teste de atividade foi realizado com diferentes substratos para determinar a especificidade do substrato da enzima Xnd01 purificada. Ela apresentou atividade enzimática em xilana ($2,57 \pm 0,13$ U/mg) e em *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo ($6320,28 \pm 0,044$ U/mg). Lee e colaboradores descreveram uma *exo*- β -1,4-celobio-hidrolase de *Streptomyces coelicolor A(3)* da família GH48 que apresentou atividade em xilana de faia, assim como Xnd01 (Lee et al., 2018). Segundo Lee e colaboradores, a celobio-hidrolase descrita por eles apresentou atividade alta em avicel e CMC, sendo que a caracterização foi feita com avicel. Além disso, eles relataram que a enzima apresentou baixa atividade em papel filtro e em xilana de faia. Além disso, Woon e colaboradores (2016) descreveram em seu trabalho a celobio-hidrolase CBH7B que apresentou atividade insignificante em avicel e outros substratos de celulose microcristalina. Segundo eles, essa baixa atividade em substrato natural pode estar relacionada a glicosilações que afetaram sua atividade (Woon et al., 2016).

Os ensaios aqui descritos são iniciais e serão necessários mais ensaios com a Xnd01 utilizando substratos diferentes tais como celotetrase, celotriose, celopentaose a fim de verificar sua ação como celobio-hidrolase.

Conclusão

Neste trabalho foi possível prospectar uma enzima de potencial aplicação biotecnológica e iniciar sua caracterização. Xnd01 foi triada a partir do transcriptoma do fungo *C. cladosporioides* e possui 34,52 kDa, pl de 7,76 e coeficiente de extinção de 71765. Xnd01 apresentou atividade enzimática em xilana de faia ($2,57 \pm 0,13$ U/mg) e em pNPC ($6320,28 \pm 0,044$ U/mg). Novos testes estão em andamento a fim de confirmar a atividade desta enzima como celobio-hidrolase e realizar sua caracterização bioquímica detalhada.

Referências

- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, Sep 1 1997.
- BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Web Server issue, p. W252-8, Jul 2014.
- KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28(12), p. 1647-1649, 2012.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959/03/01 1959.
- NIELSEN, H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. **Methods in Molecular Biology**, v. 1611, p. 59-73, 2017.
- ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.
- SINGH, J. et al. Chapter 24 - Enzymatic Processing of Juice From Fruits/Vegetables: An Emerging Trend and Cutting Edge Research in Food Biotechnology. In: KUDDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**: Academic Press, 2019. p.419-432. ISBN 978-0-12-813280-7.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. V. 30, p. 2725-2729, 2013.
- WOON, J. S. et al. Expression and characterization of a cellobiohydrolase (CBH7B) from the thermophilic fungus *Thielavia terrestris* in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 5, p. 690-698, Sep 2016.