

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Estudo de Proteínas Secretadas por Basidiomicetos e sua Aplicação na Hidrólise de Materiais Lignocelulósicos

Fernanda Valadares¹, Thiago A Gonçalves², Dayelle SPO Gonçalves¹, Fernando Segato¹,
Elisson Romanel¹, Adriane MF Milagres¹, Fabio M Squina², André Ferraz¹

¹Escola de Engenharia de Lorena – Departamento de Biotecnologia CEP: 12.602-810 - Lorena-SP - E-mail: fernandavaladares@debiq.eel.usp.br

²Laboratório Nacional de Ciência & Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), 13083- 970 Campinas, SP, Brazil.

RESUMO

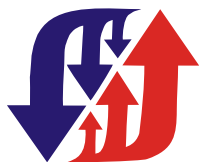
Glicosil hidrolases (GHs) são componentes chaves no processo de hidrólise de polissacarídeos. Essas enzimas são em sua maioria derivadas de fungos Ascomycetos, enquanto que GHs provenientes de Basidiomicetos ainda são pouco exploradas. Proteínas produzidas pelas espécies de decomposição parda e branca, Laetiporus sulphureus e Pleutorus ostreatus, foram usadas na suplementação de enzimas comerciais durante a sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. As taxas iniciais de conversão de glucana foram restauradas quando parte da atividade enzimática da preparação comercial foi substituída por proteínas derivadas dos basidiomicetos em estudo. Os níveis de conversão de glucana foram maiores no ensaio suplementado com proteínas de L.sulphureus do que no ensaio com alta carga de enzimas comerciais. Uma maior conversão de xilana também foi verificada. Estudos proteômicos revelaram endoglucanases (GH5 e GH45), β -glicosidases (GH3) e xilanases (GH10) que poderiam assistir aos atuais coquetéis enzimáticos comerciais.

Palavras-chave: Glicosil Hidrolases, Fungos de decomposição da madeira, Hidrólise Enzimática.

INTRODUÇÃO

Glicosil hidrolases (GHs) e proteínas acessórias são componentes chaves da etapa de hidrólise enzimática de polissacarídeos empregada em biorefinarias modernas. A maioria das enzimas utilizadas no processo de hidrólise são derivadas de Ascomycetos (Payne et al., 2015). A espécie *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*), por exemplo, produz várias GHs descritas agir sinergicamente na hidrólise de celulose, incluindo duas celobiohidrolases (CBH - Cel7A e Cel6A) e quatro endoglucanases caracterizadas (EG - Cel5A, Cel7B, Cel12A e Cel45A). A ação sinérgica destas enzimas depende das proporções ótimas das proteínas individuais (Payne et al., 2015). Várias destas enzimas contêm um módulo de ligação (CBM) de celulose, o qual auxilia na adsorção da enzima ao substrato. As β -glicosidases também são necessárias para assegurar a conversão da glicose em celobiose (Payne et al, 2015).

As proteínas acessórias encontradas em ascomycetos incluem swoleninas que apresentam a capacidade de aumentar o acesso das celulasas às cadeias de celulose (Arantes, Saddler, 2010). Até o momento, as swoleninas foram encontradas somente em um pequeno número de fungos ascomycetos (11 espécies de acordo com UniProt). A swolenina *T. reesei* (swo1) apresenta um CBM1 N-terminal ligado a um domínio homólogo a expansinas de



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

plantas. Entre as proteínas acessórias também estão as LPMOs – AA9 (do inglês “lytic polysaccharide mono-oxygenases”) capazes de oxidar ligações glicosídicas auxiliando assim a desconstrução inicial da celulose (Payne et al, 2015). Celobiose desidrogenases (CDHs) participam no sistema de degradação de celulose através da oxidação celobiose e / ou atuando como uma enzima redox, integrando ação LPMOs. CDHs também são capazes de reduzir os íons Fe^{3+} a Fe^{2+} e de O_2 a H_2O_2 , gerando reagentes de Fenton durante a degradação *in vivo* da lignocelulose (Henriksson et al., 2000).

Em contraste com as enzimas derivadas de Ascomicetos, GHs e proteínas acessórias produzidas por Basidiomicetos foram pouco exploradas para utilização em processos de hidrólise da celulose. Basidiomicetos de decomposição branca e parda são de especial interesse visto que esses fungos são eficientes na degradação de polissacarídeos em ambientes naturais ou controlados, mesmo em tecidos altamente lignificados (Ferraz et al, 2008). Os fungos de decomposição branca apresentam um sistema celulolítico completo, mas geralmente não bem equilibrado para uso *in vitro* durante a hidrólise da celulose. Já as espécies de decomposição parda são em sua maioria deficientes em CBHs, o que limita a degradação enzimática da celulose cristalina por esses organismos (Ryley et al., 2014).

O objetivo do presente trabalho é a busca GHs e proteínas acessórias produzidas pelos fungos de decomposição branca *Pleurotus ostreatus* e de decomposição parda *Laetiporus sulphureus*. Extratos de proteínas extracelulares recuperados a partir destas espécies foram usados em conjunto com enzimas comerciais durante hidrólise de polissacarídeos no bagaço de cana pré-tratado. A diversidade de proteínas nos extratos de fungos foi determinada por LC-MS/MS. Os resultados revelaram potenciais enzimas capazes de melhorar celulose e hidrólise de xilana *in vitro*.

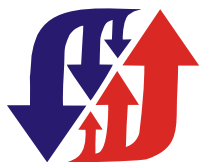
MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos, condições de cultura e determinação das atividades enzimáticas.

Os fungos de decomposição *Pleurotus ostreatus* CCIBT – 2347 e *Laetiporus sulphureus* foram cultivados em meio líquido variando as fontes de carbono (40 g/L bagaço de cana moído ou 20 g/L carboximetilcelulose). Os extratos brutos contendo as enzimas secretadas pelos fungos foram concentrados em membrana de 30kDa com 24 e 42 dias de cultivo, respectivamente. Os concentrados de enzimas foram utilizados para a determinação das atividades de celulasas e xilanases, assim como para os ensaios de hidrólise enzimática.

Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado.

Para hidrólise do bagaço de cana pré-tratado foi utilizado uma mistura de enzimas comerciais derivadas de *Trichoderma reesei* e *Aspegillus niger* (SIGMA C2730 e SIGMA C6105, respectivamente) suplementado com enzimas de *L.sulphureus* e *P.ostreatus*. Os ensaios foram normalizados para uma carga final de 10 FPU/g de substrato que representa 120 UI de endoglucanase/g de substrato no caso da enzima comercial de *T.reesei*. Em todos os experimentos foram adicionado 15 IU/g de substrato de β -glicosidase de *A.niger*. As hidrólises foram realizadas em pequena escala com 2% de consistência em um volume final de 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,01 % de azida sódica, contendo a mistura de enzimas. Os ensaios foram conduzidos sob agitação de 120 rpm e a 45 °C por 72 h. O teor de glicose e xilose foi quantificado por HPLC .



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Análise Proteômica por LC MS/MS.

As proteínas extracelulares produzidas nos cultivos foram primeiramente separadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida. As principais bandas apresentadas no gel foram excisadas, reduzidas, alquiladas e submetidas a digestão com tripsina. Os peptídeos obtidos foram separados por gradiente de hidrofobicidade em coluna C18 em sistema de cromatografia Q-TOF espectrômetro (Ultima Mass Spectrometer, Waters Milford, MA). Os espectros foram gerados usando o software MassLynx v.4.1 e os dados brutos foram convertidos analisados através do software Mascot Distiller v.2.3.02, 2009. O perfil de MS/MS foi pesquisado no banco de dado dos genômicos (Joint Genome Institute - JGI).

Alinhamento de sequências.

Os alinhamentos das sequências de aminoácidos foram criados com o software Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) através do programa Geneious v.4.5.5. Os domínios protéicos foram estabelecidos usando o banco de dados InterPro v.54 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

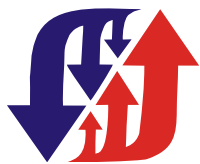
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos concentrados de proteínas obtidos dos cultivos de *P.ostreatus* e *L.sulphureus*, e as preparações de enzimas comerciais utilizadas nos ensaios de hidrólise enzimática foram avaliadas quanto a atividade de algumas celulasas e xilanasas.

A principal fonte de enzimas nos experimentos de hidrólise foi uma mistura comercial de celulasas de *T.reesei* (SIGMA C2730). A sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado por enzimas foi avaliada em três cargas de celulasas de *T.reesei* (10, 5 e 2,5 FPU/g de substrato) e os resultados de conversão de glucana e xilana mostraram que a eficiência de hidrólise é dependente do nível de atividade enzimática presente no meio reacional.

Para avaliar o extrato de proteínas dos basidiomicetos na sacarificação do bagaço, substituiu-se 50% da atividade original de EGs proveniente de *T.reesei* por atividade de EG derivada dos fungos de decomposição. Optou-se por fixar a atividade de EG nos ensaios de hidrólise uma vez que foi a principal atividade celulolítica detectada em extratos de fungos de decomposição da madeira. Quando metade da atividade original de EG foi derivada dos extratos de *L. sulphureus* e *P. ostreatus*, as taxas iniciais de hidrólise foram maiores do que foi observado nos experimentos com metade da carga de enzimas de *T.reesei*, alcançando valores similares aos observados quando a carga total de enzimas de *T.reesei* foi usada. Esse resultado foi obtido mesmo com as proporções de CBH e β -glicosidase variando significativamente nos diferentes ensaios. Os dados de conversão inicial sugere que mesmo com uma baixa atividade de CBH no meio reacional, os ensaios usando fungos de decomposição fornecem uma eficiente conversão inicial de glucana a glicose. No entanto, os valores de máxima de conversão glucana foram aumentados somente quando foi utilizado o extrato de *L. sulphureus*.

A análise de LC MS/MS dos extratos proteicos de *L. sulphureus* e *P. ostreatus* mostrou um total de 45 e 104 diferentes proteínas, respectivamente. O extrato de *L. sulphureus* apresentou uma menor diversidade de proteínas consideradas relevantes para degradação de lignocelulose (4 celulasas, 9 hemicelulasas, 3 esterases e 2 oxido-redutases) se comparadas com o número de proteínas identificadas no extrato de *P.ostreatus* (5 celulasas, 12 hemicelulasas, 8 esterases e 7 oxido-redutases).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Os três principais grupos de enzimas envolvidas na hidrólise de celulose (EG, CBH e β -glucosidases) foram identificados em ambos os extratos de fungos de decomposição. Mesmo com uma baixa atividade de CBH detectada nos ensaios enzimáticos foram identificadas uma CBH (GH7) produzida por *L.sulphureus* e três CBHs para *P.ostreatus* (duas GH7 e uma GH6). EGs-GH5 foram identificadas em ambos os extratos de fungos de decomposição de madeira. Uma única EG-GH45 com altas contagens espectrais foi encontrada apenas no extrato *L.sulphureus*. Ambos EG-GH45 e CBM-swoleninas são associadas a um efeito sinérgico positivo durante a hidrólise da celulose (Igarashi et al, 2008 Andberg et al., 2015). Apenas uma GH3- β -glucosidase foi detectada em cada extrato de fungo de decomposição. *H. jecorina* possui uma GH3-Cel3A com capacidade de processar oligossacarídeos. Essa capacidade foi atribuída à presença do subsítio +2 composto por fenilalanina-F260 e ácido- aspártico D370 (Karkehabadi et al., 2014). O alinhamento dos domínios GH3 das sequencias da Cel3A de *H. jecorina* com as BGLs dos fungos de decomposição mostrou que os aminoácidos do subsítio +2 são conservados, apesar fenilalanina-F260 alterado para leucin-L260 em *L. sulphureus*.

CONCLUSÕES

As proteínas extracelulares produzidas por fungos de decomposição de madeira são úteis para alterar os atuais coquetéis enzimáticos comerciais utilizados na sacarificação de substratos lignocelulósicos pré-tratados com alcalinos. Estas proteínas são classificadas em várias famílias glicosil hidrolases incluindo GH5 e GH45-endoglucanases, GH3- β -glucosidases e GH10-xilanas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. 2010; v. 3:4, p:1-11.
- Ferraz A, Guerra A, Mendonça R, Masarin F, Vicentin MP, Aguiar A, Pavan PC. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. *Enzyme Microb Technol*. 2008;43:178-85.
- Henriksson G, Johansson G, Pettersson G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. *J Biotechnol*. 2000;78:93-113.
- Karkehabadi S, Helmich KE, Kaper T, Hansson H, Mikkelsen NE, Gudmundsson M, Piens K, Fajdala M; Banerjee G, Scott-Craig JS, Walton JD, Phillips GN, Sandgren M. Biochemical characterization and crystal structures of a fungal family 3 β -glucosidase, Cel3A from *Hypocrea jecorina*. *J Biol Chem*. 2014;289(45):31624–37.
- Payne CM, Knott BC, Mayes HB, Hansson H, Himmel ME, Sandgren M, Stahlberg J, Beckham GT. Fungal Cellulases. *Chem Rev*. 2015;115:1308–448.
- Riley R, Salamov AA, Brown DW, Nagy LG, Floudas D, Held BW, Levasseur A, Lombard V, Morin E, Otilar R, Lindquist EA, Sun H, Labutti KM, Schmutz J, Jabbour D, Luo H, Baker SE, Pisabarro AG, Walton JD,
- Blanchette RA, Henrissat B, Martin F, Cullen D, Hibbett DS, Grigorie IV. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(27): 9923–8.