

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Clonagem, expressão e caracterização da $\beta$ -glicosidase 4 de *Humicola grisea* var. *thermoidea* em *Pichia pastoris*

Amanda Gregorim Fernandes<sup>1,2,3</sup>; Lorena Cardoso Cintra<sup>1,2</sup>; Rosália Santos Amorim Jesuino<sup>2</sup>; Fabrícia Paula de Faria<sup>2</sup>; Márcio José Poças Fonseca<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil

<sup>2</sup> – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>3</sup> – Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

\* e-mail: amandagregorim@aluno.unb.br

#### RESUMO

Lignocelulose é composta por três principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina. As celulasas constituem um complexo de enzimas envolvidas na conversão da celulose a glicose. O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* é conhecido por produzir celulasas termoestáveis e também possui uma alta atividade de  $\beta$ -glicosidase. HgBGL4 não é inibida por seu produto tornando-a interessante para o processo de sacarificação de materiais lignocelulósicos. A extração de RNA total e síntese do cDNA por RT-PCR foram realizadas com o micélio do fungo cultivado nas condições de indução. A linhagem hospedeira de *Pichia pastoris* SMD1168 foi transformada com a construção pPIC9-HgBGL4. Os sobrenadantes de cultura foram analisados quanto à atividade enzimática e perfil protéico. O zimograma foi realizado para monitorar a atividade de  $\beta$ -glucosidase após incubação do gel com 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glicopyranosídeo, onde visualizamos uma banda de 70 kDa. Na caracterização parcial do extrato bruto obtivemos temperatura ótima a 50°C e pH ótimo a 7.

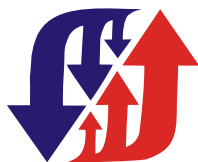
Palavras-chave: *Humicola grisea* var. *thermoidea*;  $\beta$ -glicosidase, *Pichia pastoris*, bioetanol, celulasas.

#### INTRODUÇÃO

Lignocelulose é o principal componente estrutural da parede celular de plantas composta por três principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina (Daushtban et al., 2009). A celulose é um homopolímero de unidades de glicose conectadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, as cadeias de celulose se conectam por ligações de hidrogênio formando fibras de celulose com regiões altamente ordenadas (região cristalina) e regiões onde as fibras estão separadas (região amorfa).

As celulasas constituem um complexo de enzimas envolvidas na conversão da celulose a glicose (Bhat&Bhat, 1997). As enzimas do sistema celulolítico foram classificadas com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose, em fungos há três classes de enzimas hidrolíticas: as endoglicanases (EGLs - EC 3.2.1.4) as exoglicanases ou celobiohidrolases (CBHs - EC 3.2.1.91) e as  $\beta$ -glicosidases (BGLs - EC 3.2.1.21) atuam nos celooligossacarídeos e celobiose liberados e os hidrolisam a glicose (Lynd et al., 2002).

Recentemente, estas enzimas têm sido empregadas na produção de bioetanol de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica, aumentando sua demanda na indústria do etanol (Phitsuwan et al., 2012). O bioetanol é o mais comum dentre os biocombustíveis e pode ser produzido a partir de uma variedade de substratos baratos. A produção e utilização de biocombustíveis têm aumentado dramaticamente nos últimos anos. Em 2011 sua produção



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

foi de 85 bilhões de litros (Coyle, 2007; Singh e Bishnoi, 2012). Os estudos sobre a caracterização e produção em larga escala de celulases é um passo fundamental para a produção de bioetanol de segunda geração (Kumar et al., 2008).

O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* é conhecido por produzir celulases termoestáveis, por ser considerado um fungo termofílico, e também possui uma alta atividade de  $\beta$ -glicosidase (De Paula, 1999; Takashima et al., 1996). Takashima et al. (1996) purificaram e caracterizaram seis  $\beta$ -glicosidasas e foi determinado que o pH ótimo dessas enzimas encontra-se entre 5.0 e 7.0, e a temperatura ótima entre 50°C e 70°C.

A enzima HgBGL4 é uma forte candidata para análises futuras, pois apresenta uma alta atividade para celobiose. O gene da BGL4 foi caracterizado (Takashima et al., 1996) e expresso em *Aspergillus oryzae* (Takashima et al. 1999) e na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a enzima recombinante apresentou características bioquímicas diferentes da enzima selvagem e ainda, foi demonstrado que a HgBGL4 não é inibida por seu produto, a glicose, tornando-se interessante para o processo de sacarificação de materiais lignocelulósicos (Benoliel et al., 2010).

### MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem do fungo *H. grisea* var. *thermoidea* foi isolada de compostagem na Universidade Federal de Viçosa (MG) por Chaves (1982). O fungo foi cultivado em Meio Ágar Aveia (AA) por 4 dias a 42°C e posteriormente mantido à temperatura ambiente por mais 3 dias. Para a extração de RNA total e síntese do cDNA por RT-PCR, o micélio do fungo foi cultivado nas condições de indução e coletados para extração do RNA total do micélio como descrito no protocolo do fabricante do TRI Reagent (Sigma-Aldrich®). A síntese do cDNA foi realizada conforme kit (ThermoScientific) e amplificação por primers específicos.

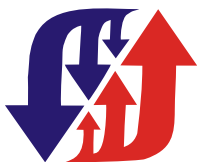
Para a determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase utilizou-se a hidrólise do p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo a 10 mmol/L (pNPG; Sigma, St. Louis, USA). Para isso, foram adicionados 10  $\mu$ L da solução enzimática em microplaca juntamente com uma solução tampão McIlvaine. Após 5 minutos, adiciona-se carbonato de sódio.

Na expressão em *Pichia pastoris* utilizamos a linhagem hospedeiras de *P. pastoris* SMD1168 (his4 pep4 prb1) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e o vetor de expressão pPIC9 (Invitrogen), contendo o gene de interesse. Após a transformação, as células foram selecionadas em meio MD. A integração do cassete de expressão no genoma da levedura foi confirmada pela amplificação do locus AOX1 por PCR.

Com objetivo de selecionar os melhores transformantes e produzir em larga escala as  $\beta$ -glicosidasas recombinantes realizamos o protocolo de produção da enzima recombinante em frascos. Os transformantes foram inoculados em meio BMGY-U em seguida, as células foram transferidas para o meio BMMY-U com metanol a 2% a 28°C. O sobrenadante de cultura analisado quanto à atividade enzimática e perfil protéico por SDS/PAGE (Laemmli, 1970).

O zimograma foi realizado para monitorar a atividade de  $\beta$ -glucosidase após incubação do gel SDS-PAGE a 50°C por 30 minutos com 40 $\mu$ M de 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glicopyranosídeo diluídos em tampão McIlvaine (pH6.5). O substrato hidrolisado foi visualizado em luz ultravioleta.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Após análises de bioinformática foi possível verificar que esse gene possui 1431 pares de bases que ao serem traduzidos irão gerar uma proteína com 476 aminoácidos, sendo que desses 1431 pares de bases 81 formam o peptídeo sinal da proteína que será secretada.

Para o isolamento do gene *HgBGL4* foi realizado uma indução da produção e atividade de  $\beta$ -glicosidases. Após a indução e coleta dos micélios realizou-se a extração de RNA sintetizando a fita complementar logo em seguida, e depois, com os primers específicos foi reamplificado o gene de interesse como mostra na Figura 1A. O cDNA foi clonado no vetor pGEM-T-Easy e subclonado em pPIC9. Na figura 1B vemos as PCR's confirmando a inserção do gene no plasmídeo.

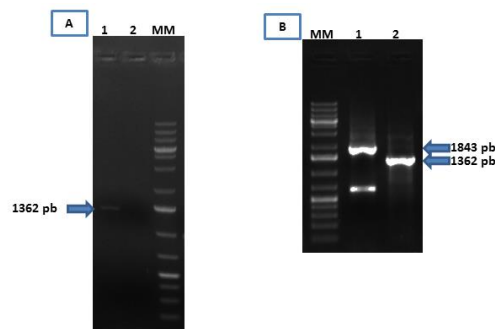


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio A- (1) PCR com primers específicos para *HgBGL4* usando como molde a fita de cDNA. B - (1) Confirmação da subclonagem do gene *bgl4* em pPIC9 utilizando primers AOX (2) Confirmação da subclonagem do gene *bgl4* com primers específicos.

Em seguida, transformamos a linhagem SMD1168 de *Pichia pastoris* com o cassete linearizado com *PmeI* para gerar transformantes  $Mut^+$ . Esses clones foram analisados quanto ao melhor produtor em um screening inicial. Após a escolha do melhor clone foram produzidas cinéticas de crescimento e produção de  $\beta$ -glicosidases. Na figura 2A é possível verificar a cinética de produção da enzima *HgBGL4* em relação ao controle e a SMD1168 selvagem.

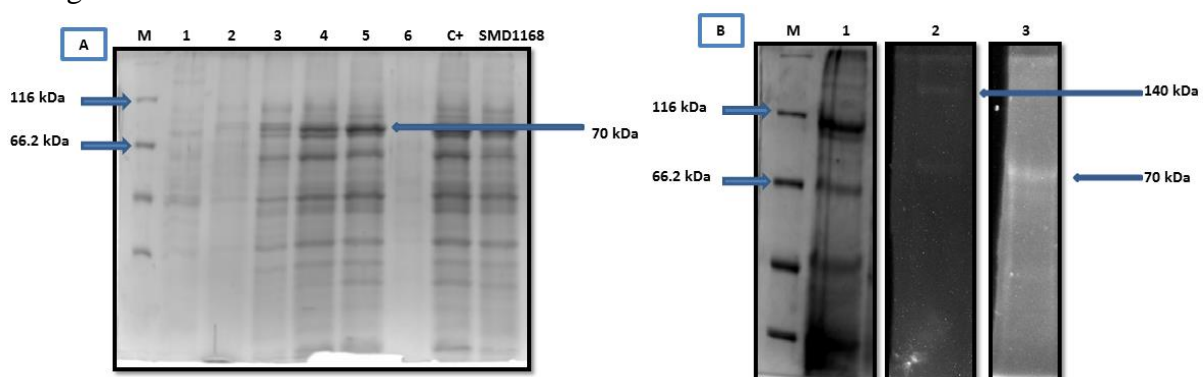
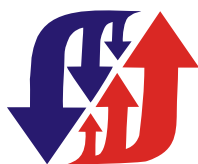


Figura 2 – Análise eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE corado com comassie blue. A – Marcador molecular; 1 – Ponto de 0 horas de indução em metanol 2%; 2 – 24 horas; 3 – 48 horas; 4 – 72 horas; 5 – 96 horas; 6 – 120 horas; C+ controle pPIC9 vazio; SMD1168 selvagem. B – (1) extrato bruto *P. pastoris* concentrado com *HgBGL4* (2 e 3) zimograma utilizando a mesma amostra da *HgBGL4* concentrada.

Ao analisarmos a figura 2B podemos prever que a enzima recombinante produzida por *P. pastoris* é glicosilada, por apresentar uma massa molecular maior que a predita por ferramentas computacionais e também, pelas que foram expressas em *Sacharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* (Takashima et al. 1999; Benoliel et al. 2010).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Usamos o sobrenadante de cultura da indução de *Pichia pastoris* para a caracterização parcial da atividade de  $\beta$ -glicosidase recombinante. A temperatura ótima ficou em 50°C como visto na Figura 3A e o pH ótimo ficou em 7, mas com atividade relativa de mais de 95% em torno dos pHs 6 e 6,5. Esses dados corroboram com o descrito por Takashima et al. 1996 na caracterização da enzima nativa purificada. Ou seja, apesar de a *Pichia Pastoris* secretar uma recombinante mais glicosilada, em torno de 70 kDa, como mostrado na Figura 2B, ela repete os padrões bioquímicos da enzima selvagem.

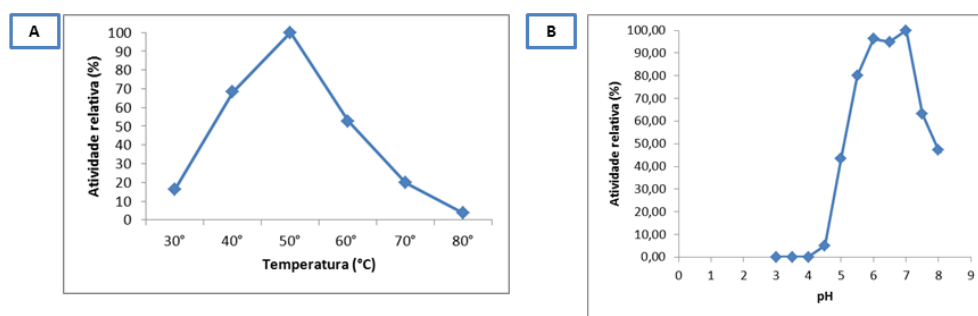


Figura 3 – Atividade relativa de  $\beta$ -glicosidases em extrato bruto de *Pichia pastoris* transformada com pPIC9-*HgBGL4*. A – Temperatura ótima. B – pH ótimo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Utilizou-se também 0,185 $\mu$ g/ $\mu$ L de enzima para esses ensaios.

### CONCLUSÕES

Até o presente momento podemos concluir que a enzima *HgBGL4* é um interessante alvo de pesquisa, podendo contribuir para uma eficiente degradação da celulose a glicose. Podendo assim, tornar-se componente do coquetel de enzimas celulolíticas utilizadas para a produção de bioetanol de segunda geração, a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benoiel, B.; Poças-Fonseca, M.J.; Torres, F.A.; de Moraes, L.M. Expression of a glucose-tolerant beta-glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol.* Apr;160(7):2036-44, 2010.
- Bhat, M.K. & Bhat, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol Adv.* 15:583–620, 1997.
- CHAVES, V.M.G. Algumas características fisiológicas e propriedades do complexo celulase de um fungo termófilo isolado de compostagem. DISSERTAÇÃO (MESTRADO), UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA-MG. 1982.
- Dashtban, M.; Schraft, H.; Qin, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences.* 5(6):578-595, 2009.
- De Paula, E.H.; Ramos, L.P. & Azevedo, M.O. The potencial of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. *Bioresour Technol.* 68:35–41, 1999.
- Kumar, R.; Singh, S. & Singh, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35(5):377-91, 2008.
- Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; van Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66:506–577, 2002.
- Phitsuwan, P.; Laohakunjit, N.; Kerdchoechuen, O.; Kyu, K.L.; Ratanakhanokchai, K. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiol (Praha).* [Epubaheadofprint], 2012.
- Takashima, S.; Nakamura, A.; Hidaka, M.; Masaki, H.; Uozumi, T. Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J. Biochem.* 125, 728-736, 1999.
- Takashima, S.; Nakamura, A.; Masaki, H. & Takeshi, U. Purification and Characterization of Cellulases from *Humicola grisea*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 77-82. 1996.