

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Expressão e caracterização parcial da β -glicosidase 4 (BGL4) de *Humicola grisea* var. *thermoidea* em *Pichia pastoris*

Amanda Gregorim Fernandes^{1,2,3}; Lorena Cardoso Cintra^{1,2}; Ilítia Ganaê de Oliveira Costa²; Saulo José Linhares Siqueira²; Rosália Santos Amorim Jesuino²; Fabrícia Paula de Faria²; Márcio José Poças Fonseca^{1,3}

¹ – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil ² – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. ³ – Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil. * e-mail: amandagregorim@aluno.unb.br

RESUMO

O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* é conhecido por produzir celulases e xilanases termoestáveis quando cultivado em diferentes substratos lignocelulósicos. Esse fungo produz uma β -glicosidase (HgBGL4) que é tolerante a altas concentrações de glicose, o que a torna interessante para aplicação em diversos processos biotecnológicos. Com o objetivo de produzir a HgBGL4 em *Pichia pastoris*, foi realizada a extração de RNA total utilizando o micélio do fungo cultivado nas condições de indução e, posteriormente, a síntese do cDNA por RT-PCR. A linhagem hospedeira de *P. pastoris* SMD1168 foi transformada com o cassete de expressão pPIC9-HgBGL4. Após a transformação, os produtores de HgBGL4 foram analisados quanto à atividade enzimática e perfil protéico. Foi realizado o zimograma, onde observamos uma banda de aproximadamente 70 kDa. Na caracterização parcial, foi determinada temperatura ótima de 50°C e pH ótimo de 7.

Palavras-chave: *Humicola grisea* var. *thermoidea*; celulases, β -glicosidase, *Pichia pastoris*.

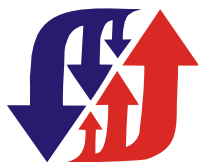
INTRODUÇÃO

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 β -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 celulases 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 β -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). 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, possuindo atividade de β -glicosidase (De Paula, 1999; Takashima et al., 1996).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Takashima e colaboradores (1996) purificaram e caracterizaram seis β -glicosidases de *H. grisea* e onde 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*, além de ser tolerante a altas concentrações de glicose, também apresenta 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). A linhagem utilizada nesse trabalho foi isolada de compostagem na Universidade Federal de Viçosa (MG) por Chaves (1982).

MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *H. grisea* foi cultivado em Meio Ágar Aveia (AA) por 4 dias a 42°C e posteriormente mantido à temperatura ambiente por mais 3 dias para completa esporulação. Para a extração de RNA total e síntese do cDNA por RT-PCR, o micélio do fungo foi cultivado em meio mínimo contendo 2% farelo de trigo (FT) e coletados para extração do RNA total com TRI Reagent (Sigma-Aldrich®) seguindo instruções do fabricante. A síntese do cDNA foi realizada conforme kit (ThermoScientific) e amplificação foi realizada com *primers* específicos.

Para expressão em *P. pastoris* foi utilizada 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 pelo crescimento em meio seletivo MD. A integração do cassete de expressão no genoma da levedura foi confirmada pela amplificação do locus *AOX1* por PCR e por análise da produção da enzima em placa do tipo *deep well*.

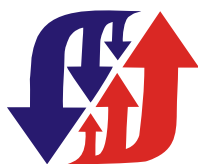
A produção em frasco foi realizada em erlenmayer de 250 mL contendo 25 mL de meio de crescimento BMGY-U em seguida, as células foram transferidas para o meio de indução BMMY-U contendo metanol a 2%. A produção foi analisada por 120 h e a cada 24 h foi adicionado metanol para concentração final de 2%. O sobrenadante de cultura foi analisado quanto à atividade enzimática e perfil protéico por SDS/PAGE (Laemmli, 1970).

Para a determinação da atividade de β -glicosidase utilizou-se o substrato p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo a 10 mmol/L (pNPG; Sigma, St. Louis, USA). A reação foi realizada em 100 μ L de tampão McIlvaine pH 6,5, 10 μ L de enzima e 40 μ L de pPNG (10mM). A reação foi parada pela adição de 100 μ L de carbonato de sódio (0,5M).

O zimograma foi realizado para monitorar a atividade de β -glicosidase. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE e ao fim da corrida o gel foi incubado a 50°C por 30 minutos com 40 μ M de 4-metilumbeliferil β -D-glicopyranosídeo (4MUG) diluídos em tampão McIlvaine (pH 6,5). O substrato hidrolisado foi visualizado em luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a obtenção do cDNA, foi realizada a análise da sequência onde foi possível verificar que o cDNA possui 1431 pb sendo que 81 pb formam a sequência do peptídeo sinal. A proteína madura apresenta 476 aminoácidos. Após a obtenção do cDNA da *HgBGL4* (Figura 1 A), foi realizada a clonagem no vetor pGEM-T-Easy e posteriormente a



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

subclonagem em vetor de expressão pPIC9. A confirmação da clonagem foi realizada por PCR (Fig. 1B).

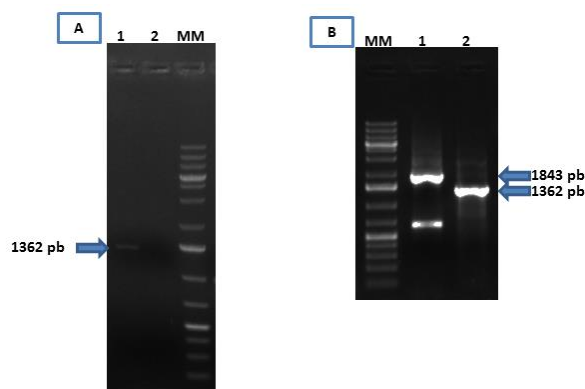


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio A- (1) PCR com primers específicos para *HgBGL4* usando como molde a fita de cDNA. B - (1) Confirmação da subclonagem do gene *bgl4* em pPIC9 utilizando primers AOX (2) Confirmação da subclonagem do gene *bgl4* com primers específicos.

O vetor pPIC9-*HgBGL4* foi linearizado com a enzima *PmeI* e posteriormente utilizado para integração na levedura *P. pastoris*. Os transformantes obtidos foram selecionados por PCR de colônia de leveduras e pela capacidade de produzir a enzima recombinante em placa do tipo *deep well*. Após a escolha do melhor clone foi realizada a cinética do crescimento e produção de β -glicosidases por 120 horas. O perfil de proteínas secretadas por *P. pastoris* está apresentado na figura 2A. Após a análise do perfil proteico e do zimograma (Fig. 2B), foi possível identificar a presença de uma banda de aproximadamente 70 kDa que apresentou atividade de β -glicosidases. Não foi identificada a presença dessa banda no controle (transformado apenas com o vetor pPIC9 e na levedura selvagem (SMD1168).

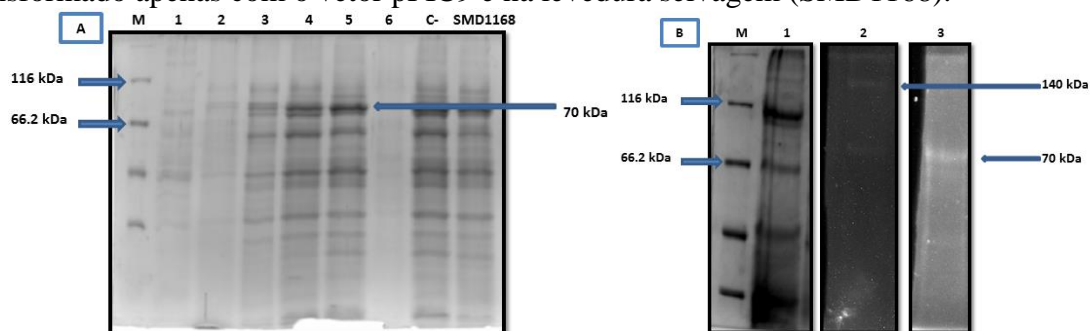
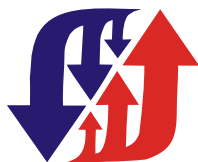


Fig. 2 – Análise eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE corado com comassie blue. A – (M) Marcador molecular; (1) Ponto de 0 hora de indução em metanol 2%; (2) 24 horas; (3) 48 horas; (4) 72 horas; (5) 96 horas; (6) 120 horas; C- controle pPIC9 vazio; SMD1168 selvagem. B – (1) extrato bruto *P. pastoris* (2 e 3) Zimograma para β -glicosidase.

Segundo a análise da sequência da proteína *HgBGL4*, a massa molecular predita é de 54 kDa, o que não foi corroborado por Takashima et al. (1999) e Benoliel et al. (2010) que obtiveram expressas em *Sacharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* uma banda de 57 kDa. A enzima expressa por *P. pastoris* provavelmente foi glicosilada, por apresentar uma massa molecular maior que a predita. Foi utilizado o sobrenadante de cultura da indução de *P. pastoris* para a caracterização parcial da atividade de β -glicosidase recombinante. A temperatura ótima foi de 50 °C (Fig. 3A) e o pH ótimo 7 (Fig. 3B). Esses dados corroboram com o descrito por Takashima et al. (1996) na caracterização da enzima nativa purificada.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Apesar de *P. pastoris* secretar uma recombinante com um perfil de glicosilação diferente da nativa, não foram alteradas as características bioquímicas da enzima.

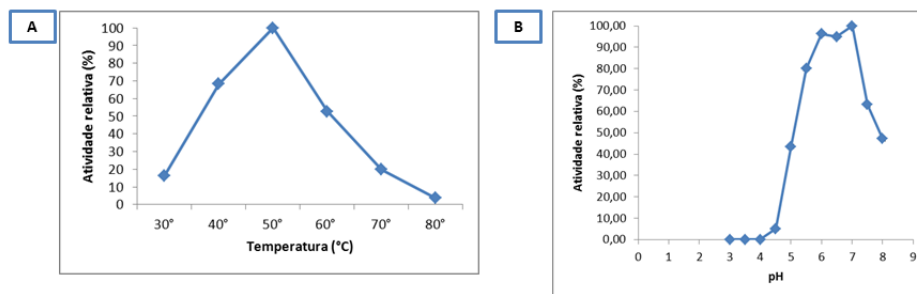


Fig. 3 – Atividade relativa de β -glucosidases em extrato bruto de *P. pastoris* transformada com pPIC9-*HgBGL4*. A – Temperatura ótima. B – pH ótimo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Utilizou-se também 0,185 μ g/ μ L de enzima para esses ensaios.

CONCLUSÕES

Podemos concluir que isolamos o cDNA do gene da *HgBGL4* e que foi expresso com sucesso na levedura metilotrófica *P. pastoris* apresentando os mesmos padrões bioquímicos da enzima nativa. Tudo isso faz com que essa enzima seja um interessante alvo de pesquisa para contribuir em uma eficiente degradação da celulose a glicose, pois, além das características bioquímicas está sendo secretada. Em estudos posteriores poderá compor um 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 celulolítico 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). 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.