

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO GENE *HXYN2* DO FUNGO *HUMICOLA GRISEA* EM *PICHIA PASTORIS*: PRODUÇÃO DA ENZIMA HXYN2r EM FRASCO E PURIFICAÇÃO INICIAL.

BASTOS, Fernando Medeiros¹; **CARVALHO**, Wagner Rodrigues¹ ; **FARIA**, Fabrícia Paula¹.

1. Laboratório de Biologia Molecular, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, ICB, UFG. bastos.fm@ig.com.br

Palavras-chave: Gene de xilanase, Expressão Heteróloga, *Pichia pastoris*, *Humicola grisea* var. *thermoidea*.

1. INTRODUÇÃO

As endoxilanases formam o principal grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana (Sunna & Antranikian, 1997). Estas enzimas têm vasta aplicação no setor industrial, como na indústria de bebidas, indústria alimentícia, indústria têxtil, na fabricação de rações para animais e na indústria farmacêutica. Uma das principais aplicações das xilanases é no setor de papel e celulose, na etapa de biobranqueamento de polpa de celulose, para esta aplicação as xilanases precisam apresentar-se livre de celulasas e ativas em alta temperatura e pH neutro. A utilização da xilanase no processo de biobranqueamento, na indústria de celulose e papel, pode reduzir aproximadamente 30% dos compostos de cloro usados nos tratamentos convencionais, reduzindo a eliminação de compostos com efeitos tóxicos nos efluentes (Polizeli *et al.*, 2005).

As enzimas xilanolíticas produzidas por fungos filamentosos constituem um "pool" enzimático com atividades distintas, dificultando a sua utilização direta nos processos industriais. Para obter extratos enzimáticos com as características exigidas no processo industrial, uma estratégia utilizada atualmente se baseia na obtenção de microrganismos recombinantes que expressem atividades adequadas aos diferentes processos industriais (Harkki *et al.*, 1991). O fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* tem sido uma boa fonte de enzimas xilanolíticas (Monti *et al.*, 1991). Em trabalho realizado por Faria e cols. (2000, 2002) isolou-se o gene *Hxyn2* do fungo *H. grisea* que codifica uma endoxilanase com massa molecular aproximada de 25 kDA. Com o objetivo de caracterizar a enzima HXYN2 e analisar sua aplicação em testes de biobranqueamento de polpa de celulose, o gene *Hxyn2* foi expresso na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Para a expressão heteróloga, o cDNA correspondente do gene *Hxyn2* (contendo o peptídeo sinal para a via secretória) foi amplificado, clonado no vetor pHILD-2 (pHILD2-xyn2), introduzido em células de *P. Pastoris* GS115 e expresso sob o controle do promotor do gene da enzima álcool desidrogenase (AOX1), que é um promotor forte e induzido por metanol. Os transformantes foram capazes de produzir e secretar a enzima HXYN2r para o meio de cultura na forma ativa (Banhe *et al.*, 2004).

O presente trabalho tem como objetivo a otimização da produção de HXYN2r em frasco pelos diferentes transformantes em diferentes meios de cultura e a purificação inicial de HXYN2 por meio de técnicas de cromatografia, principalmente de filtração em gel.

2. METODOLOGIA

2.1- Otimização da produção de HXYN2 em frasco.

As células de *P. pastoris* GS115 transformadas com o vetor pHILD2-xyn2 (GS115-xyn2) e com o vetor pHILD2 (GS115-controle) foram utilizadas para a produção da enzima HXYN2r. Para a seleção dos melhores transformantes e dos meios de cultura empregou-se o teste de atividade em placa, utilizando os seguintes meios de cultura BMGY-U/BMMY-U (1,34% de uréia, 1% de extrato de levedura, 2% de peptona), BMGY-L/BMMY-L (2,34% de extrato de levedura, 2% de peptona) BMG-U/BMM-U (1,34% de uréia), BMG-L/BMM-L (1,34% de extrato de levedura) acrescidos de 100mM de tampão fosfato de sódio pH 5, 4×10^{-5} % de biotina, 1% de glicerol ou 0,5% metanol e 50 µg/mL de ampicilina para cada meio de cultura. Para a produção de HXYN2r os transformantes foram pré-inoculados no meio contendo glicerol, incubados a 30°C por 3 dias, sob agitação constante de 250 rpm, posteriormente transferidos para o meio contendo metanol para uma densidade celular final equivalente a OD₆₀₀ de 1 e incubados nas mesmas condições por 120 h. Para a determinação da cinética de produção de HXYN2r, a cada 24 hs foram retiradas alíquotas para a determinação da atividade enzimática pelo ensaio de DNS (Miller,1959). Para a otimização da produção de HXYN2r foi realizado um planejamento fatorial 2³ variando as concentrações dos seguintes fatores: fonte de nitrogênio (2,34% e 4,68%), metanol (0,5% e 1%), e OD inicial (1 e 10).

2.2- Purificação inicial de HXYN2

Para a purificação, a produção da enzima foi realizada nas condições otimizadas e o sobrenadante do pico de produção utilizado nas etapas seguintes. O perfil protéico do sobrenadante de cultura foi determinado por SDS-PAGE e Zimograma. Para a concentração, sobrenadante foi precipitado com 60% de saturação com sulfato de amônio, o sobrenadante da precipitação foi dializado contra tampão Tris 10 mM pH 7,0 por 24 h, após a diálise as proteínas foram concentradas por liofilização e re-suspensas em tampão Tris 50mM pH 7,0, obtendo o extrato enzimático. Esse extrato enzimático foi aplicado em uma na coluna de gel filtração ("Sephacryl S-100") equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7 adicionado de NaCl 0,1 M. O tampão foi eluído da coluna a uma vazão de 24 mL/h utilizando-se como eluente, o tampão Tris adicionado de NaCl 0,1 M.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Otimização da produção de HXYN2 em frasco

Os transformantes que obtiveram a melhor atividade em placa foram 12.3, 43.1 e 43.4. E os meios que obtiveram a melhor atividade em placa foram o meio BMM-U, seguido do meio BMM-L e do meio BMMY-U. Na cinética de produção em frasco verificamos uma contradição com os resultados da atividade em placa. O cultivo no meio BMM-U apresentou atividade enzimática insignificante quando comparado com o cultivo nos outros meios. Os transformantes sob cultivo no meio BMMY-U apresentaram maior atividade que os transformantes sob cultivo no meio BMM-L. O transformante 12.3 apresentou a melhor atividade (409 U/mL) após 120 h de cultivo, sendo muito superior a produção no meio de cultura definido na literatura o meio YNB, que apresentou uma produção de 40 U/mL (Banhe *et. al.*, 2004). O melhor resultado obtido na otimização em meio BMMY-U foi de 478,2 U/mL utilizando as concentrações de 2,34% de fonte de nitrogênio, OD de 10, e 1 % de metanol. Os experimentos com fonte de nitrogênio 4,68% tiveram os resultados mais baixos de atividade enzimática, concluindo que altas concentrações de fonte de nitrogênio reprimem a produção enzimática.

3.2- Purificação inicial de HXYN2

A produção nas condições otimizadas apresentou um pico de atividade de 464 U/mL após 96 h de cultivo. Os experimentos de SDS-PAGE e gel de atividade (Zimograma) demonstraram que enzima HXYN2r foi secretada em grande quantidade para o sobrenadante como uma proteína ativa de aproximadamente 25 kDa com atividade em temperatura superior a 50°C. A etapa de concentração de proteínas do sobrenadante apresentou uma recuperação de 44% da atividade enzimática, embora baixo, foi o melhor resultado obtido. Na cromatografia de peso molecular a enzima HXYN2r foi corretamente eluída da coluna em um único pico de atividade.

4- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que as melhores condições para a produção de HXYN2r incluem o cultivo do transformante 12.3 no meio BMMY-U nas seguintes condições: OD de 10, 2,34% de fonte de nitrogênio e 1% de metanol. Pode-se determinar a presença da enzima HXYN2r como a proteína predominante no sobrenadante de cultura, na forma ativa. Entre os métodos de concentração testados a precipitação diferencial com 60% de sulfato de amônio, seguida da diálise por 24h em pH 7 e liofilização apresentaram o melhor protocolo para a concentração das proteínas do sobrenadante. A enzima HXYN2r foi corretamente eluída da coluna Sephacryl S-100™ em um único pico de atividade.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANHE, A.A., Moraes, L.P. e Faria, F.P. Expressão do Gene HXYN2 em *Pichia Pastoris*: Análise da estabilidade genética dos transformantes. Trabalho apresentado na XXIV Reunião de Genética de Microrganismos, Gramado RS 2004.
- FARIA, F. P.; Téó, V.S.J.; Azevedo, M.O. & Nevalainen, H. Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.119-23, 2002.
- FARIA, F.P. Clonagem, Caracterização e Expressão do gene de xilanase *Hxyn2* do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Tese de doutorado em Biologia Molecular, UnB, 2000.
- HARKKI, A.; Mantyla, A.; Pentilla, M.; Muttillainem, S.; Bahler, R.; Suominen, P.; Knowles, J. & Nevalainen, H. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* to produce strains with novel cellulase profiles. **Enzyme Microb. Technol.**, v.13 , p.227-33, 1991
- MILLER, G. L.. Use of dinitrossalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Analytical Chem.* **31**: 426-428. 1959
- MONTI, R., Terenzi, H.F. & Jorge, J.A. Purification of an extracellular xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Can. J. Microbiol.**, v.37, p.675-81, 1991.
- POLIZELI, ML; Rizzatti, AC ; Monti, R; Terenzi. H.F, Jorge J. A, Amorim D.S. Xylanases from fungi : properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.67,p.577-91.2005
- SUNNA, A. & Antranikian, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.17, p.39-67, 1997.

BASTOS, F.M.; CARVALHO, W.R, FARIA, F.P. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO GENE *HXYN2* DO FUNGO *HUMICOLA GRISEA* EM *PICHA PASTORIS*: PRODUÇÃO DA ENZIMA HXYN2r EM FRASCO E PURIFICAÇÃO INICIAL.

In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 2., 2005, Goiânia. **Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005. n.p.

.