

BORGES, R.A., BASTOS, F.M.; CARVALHO, W.R, FARIA, F.P. Expressão heteróloga do gene *Hxyn2* do fungo *Humicola grisea* em *Pichia pastoris*: purificação e caracterização bioquímica da enzima HXYN2r. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do XIV Seminário de Iniciação Científica** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006. n.p.

## **EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO GENE *Hxyn2* DO FUNGO *Humicola grisea* EM *Pichia pastoris*: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA HXYN2r**

**BORGES**, Rafael de Araújo<sup>1</sup>, **BASTOS**, Fernando Medeiros<sup>1</sup>; **CARVALHO**, Wagner Rodrigues<sup>2</sup>; **FARIA**; Fabrícia Paula<sup>1</sup>

1. Laboratório de Enzimologia, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, ICB, UFG. Rafael@farmacia.grad.ufg.br
2. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - UFG

Palavras-chave: Expressão heteróloga, *Pichia pastoris*, Purificação, Xilanase.

### 1. INTRODUÇÃO

A xilana é um dos principais constituintes da fração hemicelulósica presente na parede de células vegetais e compreende aproximadamente 39% do peso seco das plantas terrestres, representando, após a celulose, o polissacarídeo mais abundante na natureza. As endo-xilanases formam o principal grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana (Sunna & Antranikian, 1997) e podem ser aplicadas na indústria de papel e polpa, desde que atuam no processo de biobranqueamento da polpa, o que reduz o emprego de cloro nesta etapa e a concentração de organoclorados nos efluentes (Shoham *et al.*, 1992). As xilanases também possuem emprego biotecnológico na bioconversão de materiais lignocelulósicos em produtos fermentativos, clarificação de sucos, melhoramento na consistência de cervejas, e na digestibilidade de ração animal (Wong *et al.*, 1988). Christakopoulos e cols. (2002) mostraram que a hidrólise da xilana "birchwood" por xilanases levou a liberação de xilo-oligossacarídeos ácidos com atividade antimicrobiana e Katapodis e cols. (2003) demonstraram que a hidrólise da arabinoxilana por xilanases do fungo *Thermoascus aurantiacus* levou a liberação de xilo-oligosacarídeos contendo resíduos de ácido ferúlico com atividade antioxidante.

O gene *Hxyn2* de *H. grisea* que codifica uma endoxilanase da família 11 foi isolado por Faria e cols. (2000, 2002) e descreve uma proteína com 227 resíduos de aminoácidos, massa molecular estimada de 23 kDa e um possível sítio de N-glicosilação. O gene *Hxyn2* foi expresso na levedura *Pichia pastoris* sob o controle do promotor do gene da enzima álcool oxidase (AOX1). Os transformantes apresentaram estabilidade genética e foram capazes de produzir e secretar a enzima HXYN2r para o meio de cultura na forma ativa (Banhe *et al.*, 2004). Carvalho e cols. (2005) otimizaram a produção da enzima em frasco variando a fonte de nitrogênio, a densidade celular inicial da cultura e a concentração de metanol.

O presente trabalho tem como objetivo a produção de HXYN2r em frasco nas condições otimizadas, a purificação e a caracterização enzimática da enzima.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1- Produção de HXYN2r em frasco.

Para a produção de HXYN2r em frasco, o transformante 12.3 foi inoculado em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio BMGY-U (1.34%

BORGES, R.A., BASTOS, F.M.; CARVALHO, W.R, FARIA, F.P. Expressão heteróloga do gene *Hxyn2* do fungo *Humicola grisea* em *Pichia pastoris*: purificação e caracterização bioquímica da enzima HXYN2r. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do XIV Seminário de Iniciação Científica** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006. n.p.

de Uréia; 1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 100mM de tampão fosfato de potássio pH 5,0;  $4 \times 10^{-5}$ % de biotina; 1% de glicerol; 50 µg/mL de ampicilina), incubado a 30°C / 150 rpm até atingir DO<sub>600</sub> de 9 -10. Após esse período as células foram precipitadas por centrifugação (3000g, 15min, 4°C), lavadas e ressuspensas com água destilada estéril. As células foram inoculadas em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade e inoculadas para um volume final de 50 mL de meio BMMY-U (1,0% de metanol) para a DO<sub>600</sub> final de 9-10. Após atingir a máxima atividade xilanolítica, o meio de cultura foi centrifugado e o sobrenadante foi congelado. A cada 24 h foram retiradas alíquotas para determinação da atividade enzimática, concentração de proteínas totais e DO<sub>600</sub>. A atividade xilanolítica foi determinada pelo método de DNS (Miller, 1959), onde foram quantificados os açúcares redutores liberados a partir de xilana "oat spelt" e o perfil de proteínas foi analisado por eletroforese em gel desnaturante (13%) (Laemmli, 1970) corado com solução de azul de Coomassie ou nitrato de prata (Blum, 1987).

### 2.2-Purificação de HXYN2r

Para a purificação da HXYN2r, o sobrenadante de cultura foi dialisado contra tampão Tris-HCl 10mM pH 7,0 por 24 h e concentrado por liofilização. O extrato enzimático foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,0 e aplicado em coluna de cromatografia de peso molecular (Sephacryl S-100™, 87x1,5 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM pH 7,0 adicionado de 0,1 M de NaCl. Frações de 2 mL foram coletadas e analisadas quanto a atividade enzimática por DNS e quanto ao perfil de proteínas por SDS-PAGE.

### 2.3-Characterização enzimática da HXYN2r

O efeito do pH na atividade da HXYN2r foi determinado realizando o ensaio de DNS em diferentes valores de pH (3,0 a 11,0). A temperatura ideal foi determinada realizando o ensaio de DNS incubando a enzima em diferentes temperaturas (20 a 100°C).

## 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1- Produção de HXYN2r em frasco

A produção de HXYN2r atingiu uma atividade máxima de 675,9 U/mL após 96 h de cultivo. A presença da HXYN2r no sobrenadante de cultura foi confirmada por SDS-PAGE e apresentou uma massa molecular de 23 kDa, sendo a proteína predominante no sobrenadante de cultura.

### 3.2 - Purificação de HXYN2

O extrato enzimático foi aplicado em coluna de gel filtração e observou-se um único pico de atividade xilanolítica. As frações correspondentes a este pico de atividade foram analisadas por SDS-PAGE e observou-se a presença de uma única banda de proteína com aproximadamente 23 kDa, indicando que a cromatografia foi eficiente para purificação da HXYN2r.

### 3.3 - Caracterização enzimática

Observou-se atividade xilanolítica em toda a faixa de pH estudada, sendo os melhores resultados obtidos nos pH de 5,5 a 8,5 e o pH ideal de 6,5. A HXYN2r

BORGES, R.A., BASTOS, F.M.; CARVALHO, W.R, FARIA, F.P. Expressão heteróloga do gene *Hxyn2* do fungo *Humicola grisea* em *Pichia pastoris*: purificação e caracterização bioquímica da enzima HXYN2r. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do XIV Seminário de Iniciação Científica** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006. n.p.

apresentou uma atividade alta na faixa de temperatura entre 50 e 70°C sendo que a atividade xilanolítica ideal foi obtida na temperatura de 60°C.

#### 4- CONCLUSÃO

Nas condições otimizadas, após 96h de cultivo, foi obtida a atividade xilanolítica máxima no valor de 675,9 U/mL. Após o processamento do sobrenadante de cultura, o extrato enzimático foi aplicado em coluna de cromatografia de peso molecular e obteve-se a purificação da HXYN2r, confirmada por SDS-PAGE. A enzima pura apresentou pH e temperatura ideal de 6,5 e 60°C, respectivamente.

#### 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANHE, A.A., Moraes, L.P. & 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.

BLUM, H., Bier, H. & Gross, H. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99, 1987.

CARVALHO, W.R., Bastos, F.M. & Faria, F.P. Heterologous expression of Hxyn2r gene from the fungus *Humicola Grisea* in *Pichia pastoris*: Optimization of HXYN2r production in flasks. Trabalho apresentado no VIII symposium on enzymatic hydrolysis of biomass. Maringá 2005.

CHRISTAKOPOULOS, P., Katapodis, P., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B.J., Stamatis, H. & Skaltsa, H. Antimicrobial activity of acid xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. *International Journal of Biological macromolecules*, v.31, p.171-175, 2003.

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.

KATAPODIS, P., Vardakou, M., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B.J. & Christakopoulos, P. Enzymic production of a feruloylated oligosaccharide with antioxidant activity from wheat flour arabinoxylan. *Eur. J. Nutr.*, v.42, p.55-60, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.

MILLER, G. L.. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Analytical Chem.* 31: 426-428. 1959

SHOHAM, Y., Schwartz, Z., Khasin, A., Gat, O., Zosim, Z., and Rosenberg, E. Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* strain T-6. *Biodegradation*. 3, 207-218, 1992.

SUNNA, A. & Antranikian, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.17, p.39-67, 1997.

WONG, K. K. Y., Tan, L.U.L. & Saddler, J.N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganism: Functions and Application. *Microbiol. Rev.*, v.52, p.305, 1988

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC