

Especificidade de Substrato e Estudos Estruturais de uma β -glicosidase Engenheirada que Demonstra Alta Eficiência Enzimática

Pesquisador responsável: Dr. Clelton A Santos

clelton.santos@lnbr.cnpem.br

LNBR-CNPem

As β -glicosidases (EC3.2.1.21) são enzimas chaves no processo de conversão da biomassa vegetal em derivados químicos de alto valor agregado. Assim, a busca por novas e mais eficientes enzimas que possam aumentar a eficiência da sacarificação de substratos celulósicos permanece uma importante e prioritária área de estudo. Em um trabalho inicial, utilizando uma abordagem racional, confrontando dados de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) e genômica estrutural, nosso grupo foi apto a identificar a principal β -glicosidase expressa por *Trichoderma harzianum* (ThBgl) em condições de degradação de biomassa. Contudo, após a caracterização estrutural e funcional, os resultados revelaram que embora tal enzima fosse produzida com alto rendimento e pureza, ela não apresentava duas das principais propriedades desejadas para sua efetiva utilização para a suplementação de coquetéis enzimáticos destinados a degradação de biomassa – termoestabilidade e alta tolerância a glicose. Usando mutagênese sítio-dirigida, esta β -glicosidase foi engenheirada permitindo a obtenção de uma enzima mais eficiente para a degradação de biomassa que apresentou maior tolerância a inibição pelo produto e atividade ótima em uma temperatura 10°C acima da apresentada pela proteína selvagem. Contudo, as bases mecânicas que conduziram a tais mudanças não foram completamente determinadas. Assim, esse projeto visa elucidar a especificidade de substrato e diferenças funcionais e estruturais que fazem com que a proteína engenheirada apresente maior eficiência enzimática.

1. INTRODUÇÃO

Em um estudo recente, nosso grupo utilizando dados de RNA-Seq identificou e caracterizou uma β -glicosidase, uma hidrolase de glicosídeos da família 1 (GH1) que foi superexpressa pelo fungo *Trichoderma harzianum* em condições de degradação de biomassa [1-2]. β -glicosidase (EC 3.2.1.21) catalisam a conversão de celobiose a monômeros de glicose, que podem, por sua vez, serem fermentados para produzir etanol [3-4]. Além disso, a atividade destas enzimas diminui o efeito inibitório da celobiose sobre as celobiohidrolases e endo- β -glucanases [3]. Assim, a ação destas enzimas se dá de maneira sinérgica, e cada enzima desempenha um papel preponderante para a contínua e completa hidrólise de substratos celulósicos [5]. A resolução da estrutura cristalográfica desta importante β -glicosidase de *Trichoderma* ThBgl, PDB ID 5BWF [1]) abriu novas perspectivas para se explorar o potencial biotecnológico desta enzima, com estudos adicionais visando melhorar suas propriedades bioquímica para sua efetiva utilização na indústria de biocombustíveis.

Tendo em vista a utilização de β -glicosidases em processos industriais, visando a degradação enzimática de biomassa, um dos principais limitantes para sua efetiva utilização em processo biotecnológicos, se baseia no fato de que a maioria das β -glicosidases conhecidas, incluindo ThBgl, são sensíveis ao produto final da reação que catalisam (a glicose), ou muitas das vezes, inibidas pelos seus substratos celo-oligossacarídeos [4,6]. A termoestabilidade é uma

outra propriedade bioquímica muito desejada para a efetiva utilização de uma enzima para a degradação de biomassa e suplementação de coquetéis desenvolvidos para a hidrólise enzimática de compostos celulósicos. Contudo, com exceção de microrganismos extremófilos, a atividade ótima de muitas das celulases, incluindo β -glicosidases (ThBgl) é observada ao redor de 40°C.

Em um estudo adicional, análises estruturais combinadas com mutagênese sítio-dirigida melhoraram eficientemente as propriedades funcionais desta GH1 β -glicosidase [2]. A enzima adaptada apresentou altos níveis de tolerância à glicose e atividade ótima em uma temperatura 10°C acima da apresentada pela proteína selvagem. Além disso, a eficiência aprimorada da enzima engenheirada em termos da quantidade de glicose liberada e rendimento na produção de etanol foi confirmada experimentalmente usando diferentes biomassas vegetais. Contudo, as bases mecânicas que conduziram a tais mudanças não foram completamente determinadas. Assim, esse projeto visa elucidar a especificidade de substrato e diferenças funcionais e estruturais que fazem com que a proteína engenheirada apresente maior eficiência enzimática.

ESTADO DA ARTE

A conversão de açúcar, derivada da degradação de biomassa vegetal via hidrólise enzimática, para a produção de biocombustíveis é um desafio. Assim, a busca por novas enzimas que possam aumentar a eficiência da sacarificação de substratos celulósicos permanece uma importante e prioritária área de estudo [1].

De forma contundente, estudos funcionais e estruturas de enzimas envolvidas na degradação de substratos celulósicos, constituem-se o primeiro passo para a melhor compreensão dos mecanismos enzimáticos inerentes à tais processos [1,2,6]. Contudo, muitas das vezes, após a caracterização bioquímica/estrutural inicial da proteína identificada, esta última pode não apresentar algumas características enzimáticas desejadas para a sua efetiva aplicação industrial, incluindo, temperatura ótima para catálise, condizente com aquelas nas quais a hidrólise enzimática da biomassa vegetal é favorecida, alta tolerância a inibição ao produto final da reação enzimática, dentre outras [5]. Assim, o desenvolvimento racional de proteínas mais adaptadas para aplicação em bioprocessos com o uso de ferramentas de engenharia de proteínas pode ser um caminho para o desenvolvimento de biocatalistas mais eficientes.

OBJETIVOS

Esse projeto de iniciação científica tem como objetivo principal avaliar a especificidade de substrato e as bases moleculares que conduziram a uma melhor eficiência catalítica para a ThBgl engenheirada quando comparada a enzima selvagem.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar as duas enzimas recombinantes (engenheirada e selvagem);
- Dissecar a especificidade de substratos apresentada pelas enzimas;
- Determinar os parâmetros de atividade ótima (pH e temperatura) e curvas de saturação para os possíveis substratos identificados;
- Realizar ensaios de cristalização das proteínas na presença de substratos;
- Determinar da estrutura tridimensional desses complexos enzima-substrato;
- Analisar as estruturas obtidas, correlacionando com os resultados funcionais obtidos.

METODOLOGIA

Testes de expressão serão realizados usando as metodologias já padronizadas descritas anteriormente [1,2]. As proteínas recombinantes serão expressas em vetores de expressão do tipo pET-28a(+) que adicionam uma cauda de poli-histidina (6xHis) no N-terminal da proteína recombinante, permitindo que a purificação dos alvos sejam realizadas por cromatografia de afinidade. As amostras serão submetidas à cromatografia de exclusão molecular (SEC), para retirada de agregados e separação de diferentes formas oligoméricas da proteína, caso estejam presentes na solução. As amostras obtidas em cada etapa de purificação serão analisadas por SDS-PAGE. A concentração da proteína purificada será estimada pela medida da absorção da amostra em 280 nm utilizando o coeficiente extinção molar de cada proteína.

Os ensaios funcionais para determinar a especificidade de substrato apresentada pelas enzimas será realizado usando uma ampla gama de substratos poliméricos naturais, além de substratos sintéticos, totalizando mais de 100 substratos, disponíveis no laboratório. O método de detecção de atividade poderá ser direto, no caso dos substratos sintéticos derivados do 4-nitrofenol que absorvem a 400 nm ou indireto, no caso dos substratos naturais, nas quais se utiliza o método de DNS para quantificar o açúcar redutor gerado pela hidrólise enzimática. Uma vez identificada atividade, a temperatura ótima e a dependência do pH para a reação serão investigados, por fim a curva de saturação será usada para descobrir os parâmetros cinéticos apresentados frente a cada substrato identificado.

Os ensaios de cristalização serão realizados pelo método de difusão de vapor em gota sentada em condições de temperatura e umidade controladas. Nesta técnica, a solução da proteína é submetida a um estado de supersaturação, por meio de difusão de vapor, que pode favorecer o aparecimento de cristais. Os testes iniciais se basearão em kits comerciais e serão realizados no LNBio/CNPEM que conta com três robôs, para o preparo de soluções, preparo das placas de cristalização e captura de imagens, acessadas remotamente através da internet. A otimização dos cristais obtidos poderá ser feita variando-se concentração da proteína, concentração dos agentes precipitantes, pH dos tampões, temperatura, utilizando-se o método de semeadura e kit de aditivos (Additive Screen – Hampton Research, 96 soluções). Os dados de difração de raios X serão coletados nas instalações do SIRIUS (CNPEM).

REFERENCIAS

- [1] Santos, Clelton A et al. An engineered GH1 β -glucosidase displays enhanced glucose tolerance and increased sugar release from lignocellulosic materials. *Sci Rep.* v. 9, p. 4903, 2019.
- [2] Santos, Clelton A et al. Crystal structure and biochemical characterization of the recombinant ThBgl, a GH1 β -glucosidase overexpressed in *Trichoderma harzianum* under biomass degradation conditions. *Biotechnol Biofuels.*, v. 9, p. 71, 2016
- [3] Cairns KJ, Esen A. β -Glucosidases. *Cell Mol Life Sci.* v. 67(20), p. 3389–405, 2010.
- [4] Teugjas H, Våljamäe P. Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. *Biotechnol Biofuels.* v. 24;6(1), p. 105, 2013.
- [5] Zhang M, Su R, Qi W, He Z. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes. *Appl Biochem Biotechnol.* v160(5), p. 1407–14, 2010.
- [6] Merino ST, Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* v. 108, p. 95–120, 2007.