

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Purificação e Caracterização de Xilanases Mutantes Derivadas da XynA de *Orpinomyces* Obtidas por Mutagênese Sítio-Dirigida

Rafaela Zandonade Ventorim<sup>1</sup>, Ana Maria dos Santos Camargos<sup>1</sup>, Guilherme Fraga Loureiro<sup>1</sup> e Valéria Monteze Guimarães<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa – Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO  
36570-000 Viçosa – MG - E-mail: rafabqi@gmail.com

#### RESUMO

*As xilanases apresentam várias aplicações biotecnológicas, entretanto suas propriedades nem sempre são adequadas às condições dos processos industriais. Visando obter xilanases mutantes, derivadas da XynA de Orpinomyces mais estáveis, mutagênese sítio-dirigida foi empregada para deleção dos resíduos G10, T30, N53, Q109 e G110 em duas xilanases, SWT e SM2. Confirmadas as deleções, E. coli BL21(DE3) foi transformada e a melhor produção das xilanases solúveis e ativas foi com 0,25mM de IPTG. As enzimas purificadas foram caracterizadas, apresentando maior atividade em 40-60°C e pH 5,0-8,0. Os ensaios de termoestabilidade a 50 °C indicaram que as deleções T30 e Q109G110 em SWT contribuíram para maior termoestabilidade e meia-vida das enzimas. SM2 T30 manteve atividade superior a 90% após 4 h a 50 °C, indicando que as deleções indicadas foram eficientes na obtenção de xilanases mutantes possivelmente mais adequadas às condições industriais.*

Palavras-chave: xilanase, *Orpinomyces*, mutagênese sítio-dirigida, termoestabilidade

Apoio: FAPEMIG e Capes

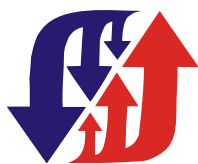
#### INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte de recurso orgânico renovável do mundo e é obtida a partir de resíduos agrícolas e florestais, culturas energéticas, grãos, resíduos municipais e industriais, e outros. A hidrólise biológica da xilana, principal componente da hemicelulose, requer um complexo de enzimas, que inclui endoxilanases, glucuronidasas, xilosidasas, acetilesterases e arabinofuranosidasas (Chen *et al.*, 2012).

As xilanases (endo-1,4-β-xilanase; E.C. 3.2.1.8) são as principais enzimas necessárias para a hidrólise da hemicelulose, uma vez que hidrolisam ligações β-1,4 aleatórias internas da cadeia principal da xilana. A utilização de xilanases em processos industriais inclui a preparação de ração animal; clarificação de sucos de frutas e vegetais, panificação; além de sua aplicação nas indústrias têxteis e de papel; e biocombustíveis (Paës *et al.*, 2012).

A xilanase A de *Orpinomyces* sp. PC-2 destaca-se devido à sua elevada atividade específica quando comparada a xilanases de outras fontes, e foi mais eficiente em pH 5,0-5,5 e 50-55 °C (Trevizano *et al.*, 2012). Entretanto, os processos industriais, geralmente são realizados em temperaturas mais elevadas e valores de pH mais extremos.

Nossa equipe, trabalhando no propósito de obter xilanases mais termoestáveis e adequadas aos processos industriais, desenvolveu uma biblioteca de genes mutantes a partir do domínio catalítico da XynA de *Orpinomyces* PC-2 (WT). Esta biblioteca, construída pela técnica de *error-prone* PCR, permitiu a obtenção de quatro xilanases mutantes (M1-M4) com maior estabilidade térmica (Trevizano *et al.*, 2012). Estudos de modelagem comparativa e dinâmica molecular dessas xilanases permitiram a identificação de uma alça desestabilizadora, correspondente a 27 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal. Após remoção desses resíduos, foram geradas as “*small xylanases*” (SWT, SM1-SM4). Este



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

procedimento promoveu aumento da estabilidade térmica a 60 °C em SM2 (V108A; A199T) sem comprometer a atividade. Os estudos de dinâmica molecular também permitiram a identificação de resíduos de aminoácidos localizados em regiões de *loops* da superfície da molécula, que poderiam ser deletados para alterar a flexibilidade da enzima, possivelmente aumentando a estabilidade. Estes resíduos foram: Gly10, Thr30, Asn53, Gln109 e Gly110. Assim, as xilanases SWT e SM2 (V108A; A199T) foram submetidas à mutagênese sítio-dirigida, e os efeitos das deleções na estabilidade da xilanase não mutada (SWT) e da xilanase que já continha mutações inseridas por *error-prone* PCR (SM2), foram avaliados e comparados.

### MATERIAL E MÉTODOS

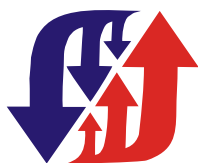
A mutagênese foi realizada utilizando o kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Os DNAs moldes para a mutagênese foram os DNA plasmidiais (pET24b) contendo os genes que codificam para as xilanases SWT e SM2. Após a confirmação das deleções por sequenciamento, os DNA plasmidiais contendo as mutações foram transferidos para *E. coli* BL21(DE3) para a expressão apropriada das proteínas. A indução da expressão das xilanases foi testada nas concentrações de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo) de 0-2 mM. A preparação dos extratos enzimáticos foi obtida após o rompimento das células a partir da cultura induzida por IPTG. Os extratos enzimáticos intracelulares foram purificados por cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap™ Q HP (GE Healthcare). O perfil de expressão nas diferentes concentrações de IPTG e o grau de pureza foram verificados por SDS-PAGE. As enzimas purificadas foram avaliadas quanto à atividade, efeito da temperatura, efeito do pH, termoestabilidade a 50 °C,  $k_M$  e  $k_{cat}/k_M$ . A atividade de xilanase foi determinada com xilana *beechwood* como substrato, a 40 °C por 30 minutos, e quantificada a formação de açúcar redutor de acordo com Miller (1959). A concentração de proteína dos extratos enzimáticos foi determinada pelo método ligante de Coomassie utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão (Bradford, 1976).

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

O alinhamento das sequências gênicas de SWT, SM2 e das xilanases obtidas pela mutagênese sítio-dirigida permitiu a confirmação das deleções de interesse, comprovando a eficiência do protocolo utilizado na obtenção das mutantes a partir de SWT e SM2 (Tabela 1).

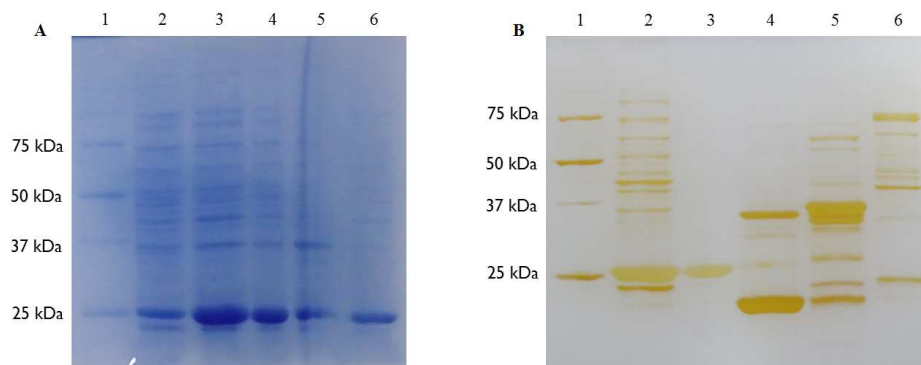
**Tabela 1** – Xilanases e suas respectivas mutações.

Xilanases	Mutações	
	Substituições (Error-prone PCR)	Deleções (Mutagênese sítio-dirigida)
SWT	--	--
SWT G10	--	Gly10
SWT T30	--	Thr30
SWT N53	--	Asn53
SWT Q109G110	--	Gln109 e Gly110
SM2	V108A, A199T	--
SM2 G10	V108A, A199T	Gly10
SM2 T30	V108A, A199T	Thr30
SM2 N53	V108A, A199T	Asn53
SM2 Q109G110	V108A, A199T	Gln109 e Gly110



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A produção das xilanases em *E. coli* BL21 (DE3) foi otimizada a partir de testes de indução com IPTG em concentrações entre 0-2 mM. Os perfis de expressão protéica demonstram que a menor concentração de IPTG testada (0,25 mM) foi capaz de induzir uma alta expressão das xilanases ativas e solúveis (Figura 2A).



**Figura 2** – SDS-PAGE 12,5 %. **A** - Teste de indução com IPTG para a xilanase SWT, corado com azul de Coomassie. 1 – Padrão de Massa Molecular; 2 – Perfil de expressão proteica na ausência de IPTG; 3 – Extrato induzido com 0,25 mM de IPTG; 4 - 0,5 mM de IPTG; 5 - 1 mM de IPTG; 6 - 2 mM de IPTG. **B** - Purificação SWT em coluna Q (GE Healthcare), corado com nitrato de prata. 1 – Marcador de Massa Molecular; 2 – Extrato bruto intracelular; 3 – Pool 1 (1-27,5 mL); 4 – Pool 2 (57,5-60 mL); 5 – Pool 3 (62,5-72,5 mL); 6 – Pool 4 (85-87,5 mL). 10 µg de proteína por canaleta.

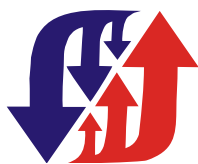
Os extratos enzimáticos foram submetidos à purificação por cromatografia de troca iônica. Todas as xilanases apresentaram o mesmo perfil de eluição. As frações ativas com xilana *beechwood* foram reunidas em quatro *pools*, sendo que o primeiro *pool* apresentou apenas uma banda proteica em torno de 25 kDa, correspondendo à xilanase purificada. Os valores de atividade específica dos extratos purificados são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Propriedades das xilanases purificadas contra xilana beechwood.

<i>Xilanase</i>	<i>Atividade específica</i> ( $U \cdot mg^{-1}$ )	$t_{1/2}$ a 50 °C (h)	$k_M$ ( $mg \cdot mL^{-1}$ )	$k_{cat}/k_M$ ( $mL \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ )
SWT	4224,1 ± 86,9	2,3	0,7	3,3 x 10 <sup>9</sup>
SWT G10	2271,2 ± 133,3	0,3	ND*	ND*
SWT T30	1836,3 ± 125,2	10,9	0,9	1,8 x 10 <sup>10</sup>
SWT N53	940,7 ± 17,8	0,8	2,5	1,7 x 10 <sup>9</sup>
SWT Q109G110	2565,4 ± 43,9	6,7	1,1	5,9 x 10 <sup>9</sup>
SM2	4170,8 ± 134,5	29,5	0,6	2,9 x 10 <sup>10</sup>
SM2 G10	1392,8 ± 20,5	0,7	0,9	4,2 x 10 <sup>9</sup>
SM2 T30	1979,0 ± 50,0	20,8	0,6	1,2 x 10 <sup>10</sup>
SM2 N53	1855,3 ± 53,8	3,3	1,2	8,2 x 10 <sup>9</sup>
SM2 Q109G110	722,7 ± 32,7	0,7	1,1	1,0 x 10 <sup>10</sup>

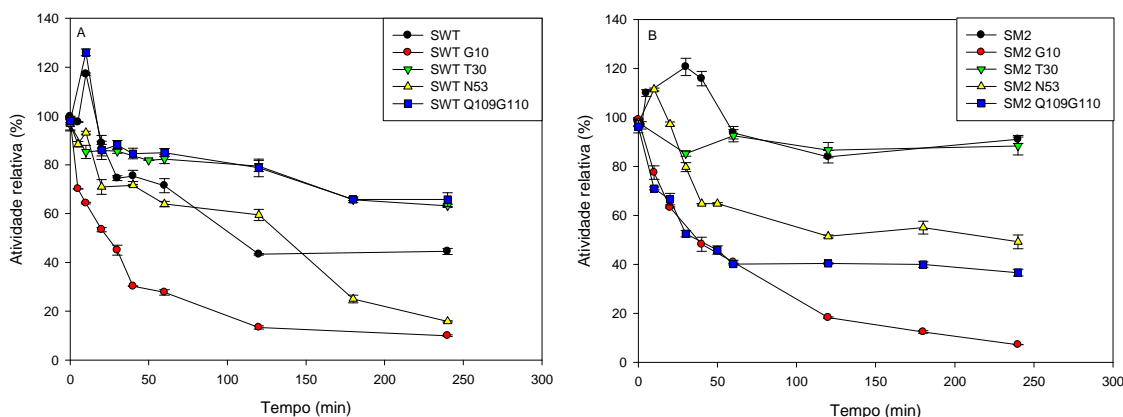
ND\*- Os ensaios enzimáticos não permitiram determinação precisa dos parâmetros avaliados.

Os ensaios demonstraram que as xilanases foram mais ativas na faixa de temperatura de 40-60 °C e em pH 5,0-8,0. Estes resultados mostram que a faixa de temperatura de maior atividade dessas xilanases é superior a muitas xilanases fúngicas que apresentam maior atividade abaixo de 45 °C, enquanto a faixa de pH de maior atividade é semelhante à maioria das xilanases de outras fontes, que atuam em valores de pH ácidos ou neutros (Paës *et al.*, 2012).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Os ensaios de termoestabilidade realizados a 50 °C indicaram que as deleções de T30 e Q109G110 na xilanase SWT contribuíram para aumentar a estabilidade térmica e os valores de meia-vida das enzimas, que foram de 10,9 e 6,7 h, respectivamente (Tabela 2 e Figura 3A). Por outro lado, a deleção de T30 em SM2 promoveu redução na meia-vida da enzima para 20,8 h (Tabela 2 e Figura 3B), entretanto, SM2 T30 manteve mais de 90 % de atividade após 4 h de incubação a 50 °C (Figura 3B).



**Figura 3** – Termoestabilidade das xilanases purificadas a 50 °C. A – SWT e mutantes derivadas de SWT. B – SM2 e mutantes derivadas de SM2.

Os valores de  $k_M$  das xilanases variaram de 0,6-2,5 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 2). As xilanases SWT T30 e SM2 T30, que se destacaram ao longo da caracterização enzimática, foram também as xilanases que apresentaram valores de  $k_M$  similares às xilanases controle, indicando que a deleção não afetou a afinidade das enzimas pelo substrato. Além disso, os valores de  $k_{cat}/k_M$  evidenciaram que a deleção de T30 em SWT aumentou a eficiência catalítica da enzima, enquanto a mesma deleção em SM2 não exerceu o mesmo efeito.

### CONCLUSÕES

A mutagênese sítio-dirigida foi eficiente para deleção de resíduos de aminoácidos específicos e obtenção de novas xilanases mutantes. SWT T30 e SM2 T30 destacaram-se, principalmente quanto à estabilidade térmica, refletido pelos valores de meia-vida, sem comprometer a atividade, indicando que essas enzimas são mais adequadas aos processos industriais.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Chen, Y.-C., Chiang, Y.-C., Hsu, F.-Y., Tsai, L.-C., Cheng, H.-L. 2012. Structural modeling and further improvement in pH stability and activity of a highly-active xylanase from an uncultured rumen fungus. *Bioresour. Technol.* 123: 125–134.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 3: 426–428.
- Paës, G., Berrin, J.G., Beaugrand, J. 2012. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnol. Adv.* 30: 564–592.
- Trevizano, L.M., Ventorim, R.Z., de Rezende, S.T., Junior, F.P.S., Guimarães, V.M. 2012. Thermostability improvement of *Orpinomyces* sp. xylanase by directed evolution. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 81: 12–18.