

PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE DUAS VARIANTES MUTANTES DA CELULASE 5A DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS*

MISAEI GOMES DIAS¹; BERNARDO FRIEDRICH SANTOS²; CHRYSTIAN NUNES GONÇALVES³; ISABELA BOLDRINI RASCH DUTRA⁴; WOLOSKI, RAFAEL DOS SANTOS; LUCIANO DA SILVA PINTO⁵

¹*Universidade Federal de Pelotas – misaelgomesdias7@gmail.com*

¹*Universidade Federal de Pelotas – bfriedrichsantos@gmail.com*

¹*Universidade Federal de Pelotas – chrystianng@gmail.com*

¹*Universidade Federal de Pelotas – boldrinirasch@gmail.com*

¹*Universidade Federal de Pelotas – luciano.pinto@ufpel.edu.br (Orientador)*

²*Universidade de São Paulo (USP) – rafaelwoloski@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A obtenção de bioetanol a partir de biomassa celulósica envolve inúmeras etapas, entre as quais a conversão enzimática do polímero em unidades individuais de açúcar tem sido o foco principal da indústria de biotecnologia (Yennamalli et al. 2013).

A celulose, um homopolímero de monômeros de glicose ligados a β -1,4, é o principal constituinte das paredes celulares vegetais e um dos polissacarídeos primários da biomassa (Mansouri, et al. 2016). A celulose pode ser hidrolisada pelo complexo multienzimático da celulase em açúcares fermentáveis (ou seja, glicose) e, portanto, fermentada em bioetanol como uma fonte de energia sustentável prontamente disponível. As endoglucanases, uma das enzimas necessárias ao processo, degradam as ligações β -1,4-glicosídicas da celulose cristalina em celooligossacarídeos insolúveis ou solúveis na interface sólido-líquido (Seidel e Ted, 2023).

Um dos principais problemas do processo de transformação da celulose em glicose é o alto custo das enzimas de sacarificação devido à necessidade de altas concentrações enzimáticas combinadas com ligação irreversível enzima-substrato e lento processo de hidrólise enzimática de celulose. A atividade catalítica das enzimas celulase diminui rapidamente como resultado dessa ligação não produtiva das enzimas ao substrato cristalino e à inibição do produto final. As enzimas ligadas à superfície do substrato não podem ser recuperadas e, portanto, são necessárias altas concentrações de enzimas (ZHANG e ZHANG, 2013). Outro problema é a instabilidade térmica de muitas das enzimas disponíveis, o que as torna menos eficientes em elevadas temperaturas e novamente, há necessidade de adição de mais enzimas ao processo.

Neste estudo, duas variantes da celulase 5A de *Xanthomonas axonopodis* (PDB ID: 4W7V) modificadas visando a termoestabilidade, com potencial aplicação econômica, foram expressas em bactéria. Cada variante apresenta uma mutação pontual específica (G69Q ou S74A), em comparação com a enzima nativa e servirão para testes futuros de termoestabilidade e atividade específica.

2. METODOLOGIA

Os plasmídeos contendo os genes sintéticos para a expressão heteróloga das enzimas foram previamente construídos por Woloski (2022). Os vetores foram transferidos por choque térmico em *Escherichia coli*, cepa *plysS*. Os clones expressando as proteínas de interesse foram cultivados em larga escala (500 mL) e a expressão induzida com IPTG (Isopropil β -D-1- tiogalatopiranosideo) por 3 h. As proteínas recombinantes foram solubilizadas em 8 M de uréia e purificadas por cromatografia de afinidade no equipamento automático AKTA purifier utilizando coluna HiTrep chellant ion (Cytiva). As proteínas foram dialisadas, liofilisadas e analisadas em SDS-PAGE 15%. As enzimas mutadas foram nomeadas de RW1 (G69Q) e RW2 (S74A). O vetor contendo o gene da proteína original foi utilizado nas etapas de transformação e expressão como controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste projeto duas enzimas engenheiradas para melhorar a estabilidade térmica foram produzidas. A expressão das proteínas recombinantes RW1 e RW2 foi confirmada por cromatografia de afinidade em sistema automático AKTA (Fig. 1A e 1B). Em ambos os casos, foi observado pico de eluição após aplicação do gradiente, indicando a presença das proteínas de interesse ligadas à coluna. A análise em gel SDS-PAGE (Fig. 1C) revelou que RW1 e RW2 foram expressas predominantemente na fração insolúvel, com bandas intensas compatíveis com o peso molecular esperado. Os controles, RW2 não induzido e *E. coli* não transformada não apresentaram bandas adicionais, confirmando que as proteínas detectadas correspondem às recombinantes. Esses resultados demonstram a expressão de RW1 e RW2, embora majoritariamente em corpos de inclusão, já que parte das proteínas foram também purificadas da fração solúvel (Dados não mostrados). Por outro lado, não foi possível recuperar a proteína original nos testes de expressão realizados, até o momento.

Para as etapas seguintes, serão realizados ensaios de atividade específicas e de estabilidade térmica das enzimas e comparação com a proteína original. Para isto, pretende-se produzir efetivamente a proteína nativa usando as mesmas estratégias usadas para as enzimas modificadas. Nos testes de atividade, as proteínas serão avaliadas *in vitro*, confirmado se as alterações melhoram de fato a termoestabilidade da enzima. Para isso, será utilizado o método de análise por ensaio de DNSA (Ácido dinitrosalicílico). O ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) é um reagente amplamente utilizado em bioquímica para a quantificação de açúcares redutores, como glicose, maltose e celobiose, liberados durante reações enzimáticas (ex.: atividade de celulases, amilases e outras glicosidases).

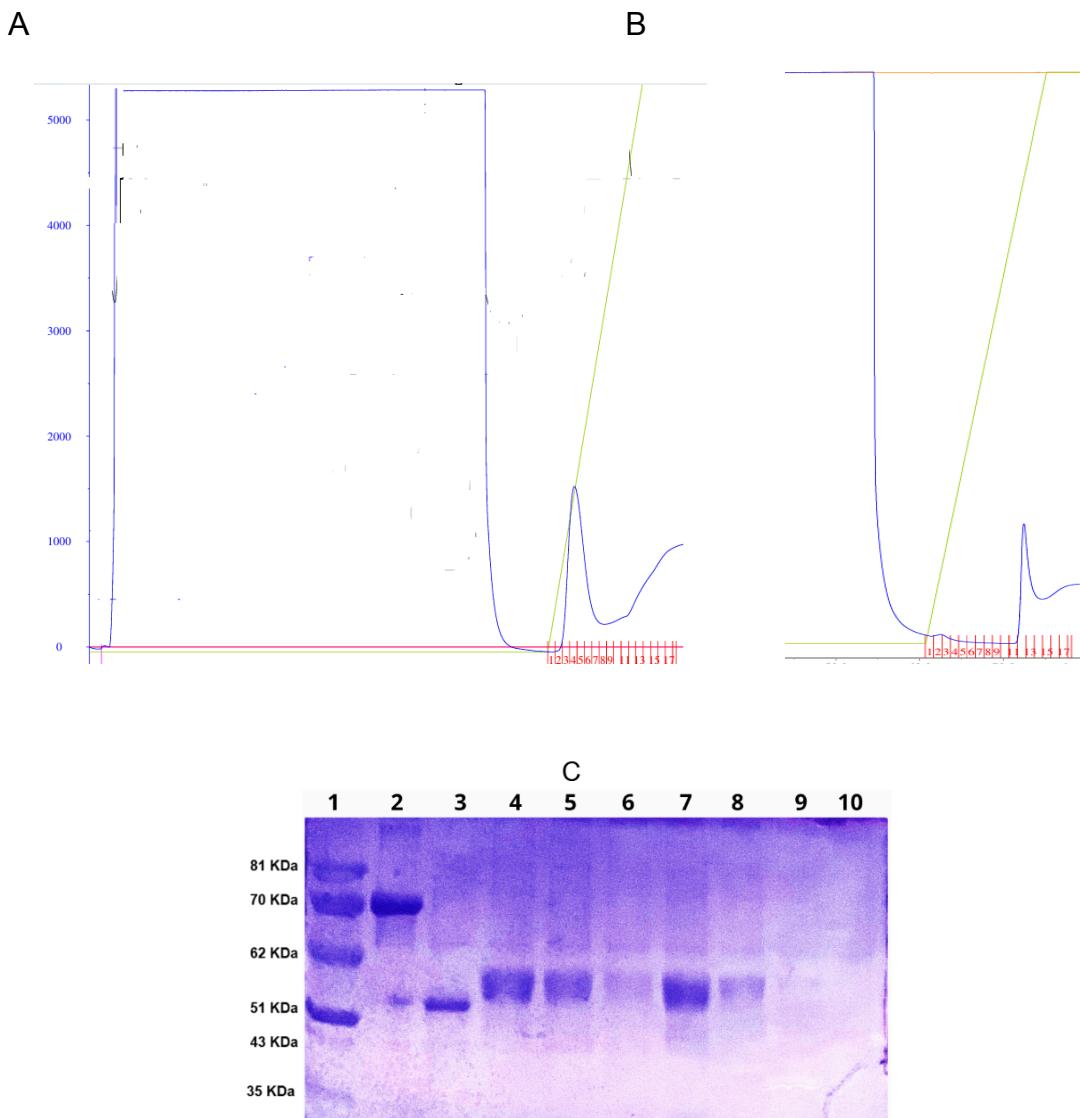


Figura 1- (A) Resultado da cromatografia em coluna de afinidade usando sistema automático AKTA purifier da proteína RW1. (B) Resultado para RW2. (C) Análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE após purificação. 1- Marcador de Massa Molecular, 2- Soro Albumina Bovina (BSA), 3- RW2 não induzida, 4- RW1 fração insolúvel (Pico 4), 5- RW1 fração insolúvel (5), 6- RW1 fração insolúvel (6), 7- RW2 fração insolúvel (12), 8- RW2 fração insolúvel (13), 9- RW2 fração insolúvel (14), 10- PlyS não transformada.

4. CONCLUSÕES

As variantes recombinantes RW1 e RW2 da celulase 5A de *Xanthomonas axonopodis* foram expressas com sucesso, confirmando a eficiência da estratégia de engenharia de proteínas. Apesar de ocorrerem majoritariamente em corpos de inclusão, a recuperação parcial em frações solúveis possibilita a continuidade dos estudos funcionais. A ausência de expressão da proteína nativa indica a necessidade de ajustes no processo, mas não compromete o potencial das variantes obtidas. Ensaios futuros de atividade e estabilidade térmica serão decisivos para verificar se as mutações foram efetivas em melhorar a estabilidade térmica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

YENNAMALLI, R.M., RADER, A.J., KENNY, A.J. *et al.* Endoglucanases: insights into thermostability for biofuel applications. *Biotechnol Biofuels*. 6: 136-145, 2013.

SEIDEL, Z.P.C, LEE JR., T. Improved Activity and Kinetics of Endoglucanase Biofuel Enzyme with Addition of an AzoTAB Surfactant. *bioRxiv* .2023. doi:<https://doi.org/10.1101/2023.08.20.554048>

MANSOURI, ASSIA; RIHANI, RACHIDA; LAOUFI, AICHA N. *et al.* Production of bioethanol from a mixture of agricultural feedstocks: Biofuels characterization, *Fuel*, 185: 612-621, 2016.

ZHANG, XIAO-ZHOU; ZHANG, YI-HENG PERCIVAL. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*, 1: 131-146, 2013.

WOLOSKI, R. S. Criação de uma metodologia para termoestabilização de proteínas via mutagenese *in silico* e aplicação em uma enzima da classe das endoglucanases. 2022. 96F. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS