



Expressão de LPMO do fungo *Chrysosporthe cubensis* em *Pichia pastoris*, caracterização e aplicação na sacarificação de biomassa lignocelulósica

Rafaella Carvalho Breder^{1*}; Kimberly Luciana Beira-mar dos Santos^{2**}; Valéria Monteze Guimarães^{2***}

¹ Departamento de Química, ² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular –
Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 36570-900

*rafaella.breder@ufv.br; **k.beiramar@hotmail.com; ***vmonteze@ufv.br

Área: Expressão heteróloga - Categoria: Pesquisa – Palavras-chaves: Expressão heteróloga, LPMO, sacarificação, biomassa

Introdução

A busca por uma economia sustentável e limpa, é o principal objetivo da indústria de biocombustíveis. Pensando nisso, o uso da biomassa lignocelulósica, bagaço da cana de açúcar, para a produção do etanol de segunda geração (2G) ganha destaque pela sua abundância no Brasil. Em contra partida, a etapa de sacarificação da biomassa tem um alto custo devido a utilização de coquetéis enzimáticos comerciais. O fungo fitopatogênico *Chrysosporthe cubensis* por sua vez, é capaz de secretar além das enzimas celulasas e hemicelulasas, usadas nos coquetéis, as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO). Essas enzimas de atividades auxiliares (AA) são capazes de otimizar a clivagem oxidativa de ligações glicosídicas na parede celular vegetal, utilizam H₂O₂ como co-substrato e precisam do metal Cobre bivalente para estarem ativas (cofator). Essa combinação entre LPMO e glicosil hidrolases (GH) é uma opção para produção de coquetéis enzimáticos mais eficientes para sacarificação da biomassa vegetal. Visto que o fungo *C. cubensis* produz uma mistura enzimática eficiente para degradação da biomassa, a expressão da LPMO desse fungo em *Pichia pastoris*, permitiria estudar e avaliar os possíveis efeitos positivos dessa enzima na hidrólise da biomassa. Essa pesquisa está inserida no cenário nacional e internacional de sustentabilidade e possui potencial de desenvolvimento tecnológico para a produção de etanol celulósico.

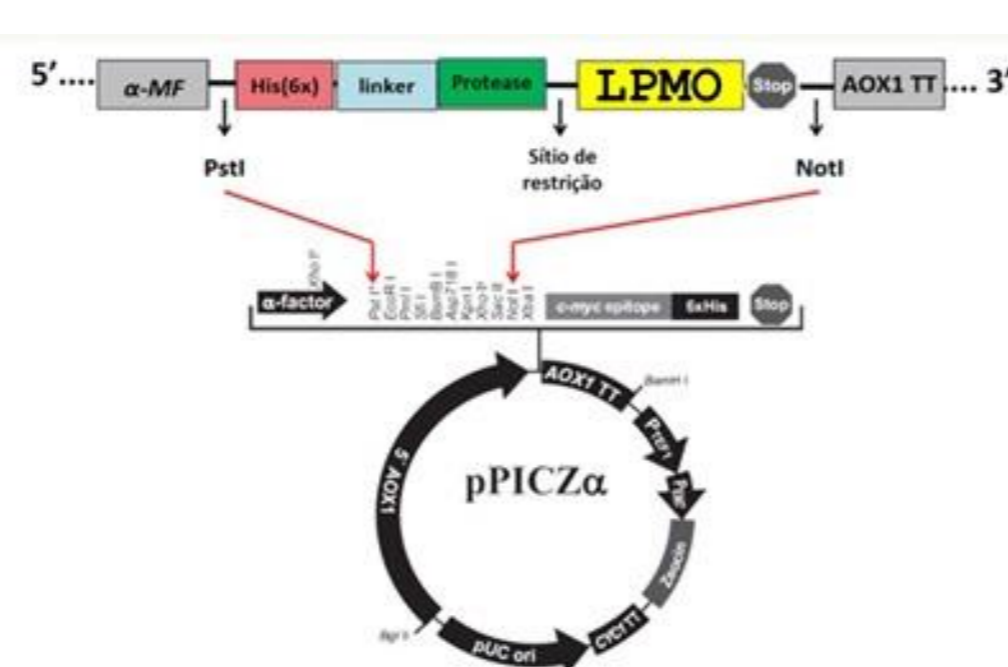
Objetivos

Expressar a enzima LPMO presente no secretoma do fungo *Chrysosporthe cubensis* em *Pichia pastoris*, desenvolver um ensaio de atividade enzimática e estudar o potencial da LPMO na sacarificação de biomassa lignocelulósica.

Material e Métodos

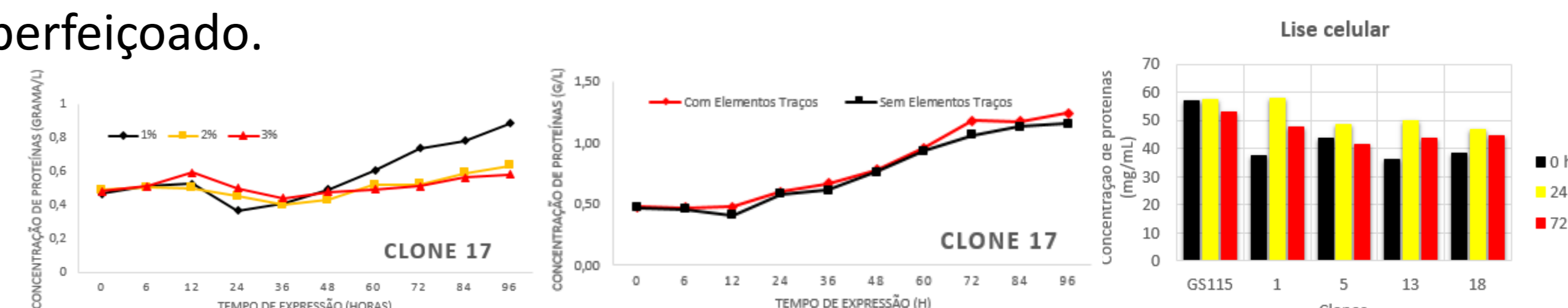
Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados clones de *P. pastoris*, com vetor pPICZαB (EasySelection™ *Pichia* expression Kit - invitrogen™/Life Technologies™), construídos pelo nosso grupo, sendo a cepa não transformada (GS115) utilizada como controle em todos os experimentos.

A reativação e manutenção dos clones transformados de *P. pastoris* foram feitas em meio de YPD ágar com zeocina. A expressão da LPMO foi realizada de acordo com o Manual da Invitrogen, com modificações como: variação da concentração de metanol (1%, 2% e 3%) e presença/ausência de elementos traços, seguidos de lise celular. Alíquotas foram coletadas durante todo o experimento para visualização das proteínas por eletroforese em SDS-PAGE, quantificação espectrofotométrica de proteínas em 280 nm e ensaio de atividade enzimática.



Resultados e Discussão

Os dados revelaram baixa produção de proteínas totais e/ou ausência de secreção de LPMO. A revelação do gel com nitrato de prata não foi conclusiva, e não foi detectada atividade enzimática de LPMO, indicando que a enzima, se presente, está inativa. Para indução com 1% de metanol a concentração de proteínas secretadas foi maior, diferentemente de 2% e 3%. As concentrações de proteínas secretadas foram semelhantes tanto na ausência quanto na presença de elementos traços utilizados no meio de cultura. A presença ou ausência do Cobre não alterou os resultados de atividade enzimática, indicando que a LPMO de *C. cubensis* não foi expressa e secretada com sucesso em *P. pastoris*. A partir do ensaio de lise das células, no controle negativo (sem o gene de interesse) foi detectada 60 mg proteínas/mL e menor valor nos clones de *P. pastoris* contendo o gene de interesse. Dessa forma, para que seja possível a detecção da LPMO ativa secretada na cultura de *P. pastoris*, novos clones deverão ser avaliados e o protocolo de atividade de LPMO deverá ser aperfeiçoado.



Conclusões

Para Eijsink *et al.*, (2019) “a caracterização das LPMOs sofre de múltiplas complicações”, se iniciam na produção das enzimas ativas e terminam na especificidade e cinética de seu substrato. Os resultados obtidos indicam que nos clones analisados, a LPMO de *C. cubensis* não foi expressa com sucesso em *P. pastoris*. Isso pode ter sido decorrente de fatores relacionados à clonagem, integração de forma incorreta do vetor, ou um possível efeito negativo da concentração de zeocina na manutenção dos clones. Vale reafirmar a continuidade e a importância dessa pesquisa para entender melhor como as LPMOs se comportam junto às hidrolases no processo de sacarificação de biomassa lignocelulósica na indústria de produção de etanol 2G.

Bibliografia

VISSER, E. M. *et al.* Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 587–594, 2013.

Eijsink, V.G.H., Petrovic, D., Forsberg, Z. *et al.* On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Biotechnol Biofuels* **12**, 58 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1392-0>

Apoio Financeiro



Agradecimentos

