ESTUDO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA LIGNINA PEROXIDASE DE *LENTINUS TIGRINUS* E SUA CLONAGEM EM CÉLULAS DE *E. COLI*

Cleidineia Souza de Santana¹; Raquel Guimarães Benevides²; Dalila de Souza Santos Ferreira³

1. Bolsista PIBIC - Af/CNPq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: s.santanacleide@yahoo.com.br
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelgb@gmail.com
3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: dalilassouza@gmail.com

PALAVRAS CHAVES: fungo; resíduos agroindustriais; enzima

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta vantagens para o desenvolvimento de uma indústria baseada em matérias-primas renováveis devido à vasta biodiversidade existente em seu território, cultivos agrícolas em grande extensão, diversidade de clima, cujo bioprocessamento desperta grande interesse econômico e social (COUTINHO, BONTEMPO, 2010). Atualmente os resíduos agroindustriais vêm aumentando com o processo de industrialização. A utilização desses resíduos em bioprocessos como substrato alternativo pode solucionar problemas ambientais causados por sua disposição incorreta, além de agregar valor a eles. (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Uma grande variedade de fungos e bactérias consegue degradar esse material lignocelulósico usando uma bateria de enzimas hidrolíticas e oxidativas (VITTI, 1988). As enzimas ligninolíticas se destacam entre as oxidorreductases, atuando sobre seus substratos de forma difusa, não-específica, por vezes indireta e orientada basicamente pelas diferenças entre os potenciais de oxidorredução dos substratos e enzimas e agem via mediadores não proteicos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). O sistema ligninolítico básico é formado pelas enzimas denominadas fenoloxidasas, onde estão a lacase e a tirosinase, e as peroxidases. As peroxidases, por sua vez, são constituídas pela peroxidase dependente de manganês (MnP) e pela lignina peroxidase (LiP) (HATAKKA, 1994; HOFRICHTER, 2002).

Desse modo, o presente trabalho propõe avaliar a expressão da enzima Lignina peroxidase (LiP) do fungo *Lentinus tigrinus* e sua clonagem em células de *E. coli* objetivando-se uma futura aplicação na deslignificação no bagaço de cana.

METODOLOGIA

O fungo *Lentinus tigrinus* foi adquirida na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB) da UEFS, preservado em método Castellani. Para a reativação do fungo o micélio de *Lentinus tigrinus* foi transferido para meio de cultura sólido, Agar batata e dextrose (BDA) e posteriormente o micélio foi transferido para o meio de cultura semissólido, bagaço de cana e sulfato de amônia (BCSA), utilizando-se as seguintes concentrações (8g de bagaço de cana e 2g de sulfato de amônio) sendo incubado em B.O.D a 25°C por 7 dias, para induzir a produção da enzima de interesse.

No procedimento de extração de RNA, seguiu-se o protocolo do Reagente Trizol (Invitrogen®). Para o processo de extração fez-se a remoção do fungo da placa de petri, transferindo-o para o cadinho e macerado em nitrogênio líquido, após o fungo ser totalmente macerado foi transferido para um microtubo de 2 mL, em seguida adicionou-se 1 mL do reagente Trizol e foi homogeneizado em vórtex por aproximadamente 5 segundos; após homogeneizado a mistura foi incubada em gelo por 5 minutos. Decorridos os cinco minutos

fez-se o procedimento para a separação das fases, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e em seguida agitou-se manualmente por 15 segundos, depois foi incubado por 3 minutos em gelo, seguindo-se, foi centrifugado a 12.000xg, por 10 minutos a 4°C. Depois de centrifugada houve a formação de 3 fases, sendo estas: clorofórmio-fenol, interfase e a fase aquosa, esta foi transferida para um novo microtubo. Após a separação das fases, fez-se o isolamento do RNA; nesse processo adicionou-se 500 µL de isopropanol 100% à fase aquosa e em seguida foi incubado em gelo por 10 minutos, após isso centrifugou-se a 12.000xg por 10 minutos a 4°C, prosseguindo-se, foi retirado o sobrenadante e o pellet foi lavado com 1 ml de etanol 75%, agitou-se em vórtex, em seguida centrifugou-se novamente a 7500xg por 5 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e deixou-se o pellet secar por até 10 minutos.

Transcorridos esse tempo o RNA foi ressuspensionado em 50 µL de água RNase-free, o RNA obtido foi armazenado em -20°C. O RNA extraído foi analisado quantitativamente pela técnica de espectofotometria, sendo também analisado por visualização em fotografia digital, após 1 hora de corrida eletroforética. Posteriormente foi feita a síntese de DNA complementar utilizando-se a enzima M-MLV Reverse, Transcriptase, seguindo-se as recomendações do fabricante.

Os *primers* para o gene da enzima em estudo Lignina peroxidase foram desenhados com base nas sequências nucleotídicas disponíveis no banco de dados NCBI – (National Center for Biotechnology Information) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. A verificação da estrutura do primer, porcentagem de conteúdo C/G, bem como temperatura de *melting* (Tm), foi feita utilizando o simulador gratuito de construção de *primer* disponível na página <https://www.idtdna.com/calc/analyser>.

A amplificação do cDNA foi feita por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR). Como fita molde foi utilizada a primeira fita de cDNA e como iniciadores, o *primer* para o gene (como senso) e oligo-dT (*Ancor Primer*, anti-senso). A reação foi feita utilizando-se o kit Quiagen® Master Mix: enzima Top taq Master mix, iniciadores para o gene (*primers* senso e anti-senso), DNA como molde e Água Nucleasefree, as condições para a reação de PCR foi feita de acordo com as instruções do fabricante, seguindo-se as etapas da tabela 2.

Tabela 2 – Etapas referentes à reação de polimerase em cadeia

PASSO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	Nº CICLOS
Desnaturação Inicial	94	3'	1
Desnaturação	94	45''	35
Anelamento	59	1'	35
Extensão	72	3'	35
Extensão Final	72	5'	1

O produto obtido a partir da reação de PCR foi purificado utilizando-se o kit PureLink® Quick Gel Extraction – o procedimento foi feito seguindo as recomendações do fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de incubação do fungo em meio semissólido bagaço de cana e sulfato de amônia (BCSA), sob as condições favoráveis para o seu crescimento, o fungo apresentou um menor crescimento de massa micelial, comparado com o crescimento quando reativado em meio BDA, possivelmente em decorrência do meio ser relativamente pobre em nutrientes, mas foi considerado satisfatório para a análise da indução da enzima lignina peroxidase (LiP) quando submetido à extração de RNA total, onde foi possível verificar a integridade do RNA

extraído, uma vez que as bandas referentes aos RNAr 28S e 18S mostram-se detectáveis (Figura 1).

Figura 1: Gel de agarose 1,2% com resultado de RNA, cultivado em BCSA. Da direita para a esquerda: M: Marcador de massa molecular de 1kb, plus DNA Ladder Invitrogen; 1 e 2: RNA de *Lentinus tigrinus*.

Tais características foram inicialmente exploradas pelo fato do meio (BCSA) apresentar uma elevada quantidade de materiais ligninocelulósicos e baixa quantidade de carboidratos livres, onde, de acordo com autores tais como, Menezes (2009) e Silva et al. (2014), resíduos agroindustriais a exemplo do bagaço de cana é um substrato com alta capacidade de induzir a produção de enzimas ligninolíticas pelos fungos basidiomicetos.

O resultado da amplificação relativa ao gene de LiP de *Lentinus tigrinus*, com o uso dos *primers* específicos desenhado (Tabela 2), após a reação de PCR, utilizando-se o cDNA obtido à partir da extração de RNA, foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 2), onde foi possível constatar a amplificação do fragmento esperado de aproximadamente 650 pb. Houve a formação de fragmentos inespecíficos de tamanhos menores, o que levou à decisão de purificação do inserto desejado à partir de extração da banda em gel.

Tabela 2 - Dados referentes ao *primer* desenhado

Denominação	Seqüência (5' 3')	Teor de C/G	Temp. de <i>melting</i> (Tm)
LiP_1	GGB GGM GGT GGM GAC GGY	71,5%	68°C
LiP_2	ACT GCN TGY GAG TGG CAG TCG TT	56.2 %	65.6°C

Figura 2: Gel de agarose 1,2% com resultado do PCR a partir do cDNA de *Lentinus tigrinus* cultivado em meio BCSA. M: Marcador de massa molecular de 1kb, *plus DNA Ladder* Invitrogen - Invitrogen; 1 e 2:Amplificado referente à sequência

O inserto purificado está sendo enviado para sequenciamento, e a partir do resultado obtido será possível desenhar *primers* que flanqueiem a sequência codificante completa de uma LiP de *L. tigrinus*, permitindo sua clonagem e produção recombinante em vetor de expressão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados por meio da extração de RNA, conclui-se que o meio BCSA foi favorável para a expressão da enzima Lignina peroxidase pelo fungo *Lentinus tigrinus*. Conforme o resultado do produto de *Lentinus tigrinus*, após a reação de PCR a partir de cDNA, foi possível verificar o fragmento de aproximadamente 650pb referente à amplificação da região específica de LiP, confirmando que houve a indução da enzima, pretendendo-se como próximos passos cloná-la e expressá-la em células de *E. coli*.

REFERÊNCIAS

- SILVA, M. L. C. et al. (2014). Production of manganese peroxidase by *Trametes villosa* on unexpensive substrate and its application in the removal of lignin from agricultural wastes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v. 5, n. 14, p. 1067.
- COUTINHO, P. L. A.; BOMTEMPO, J. V. (2010) Uso de roadmaps tecnológicos para favorecer o ambiente de inovação: uma proposta em matérias primas renovável. In: SIMPOI.
- MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. (2009). Bagaço de cana: fonte de produção de enzimas lignocelulolíticas. *Estudos tecnológicos* vol. 5, nº1. p. 68-78.
- ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. (2004). (org.) Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, , 510 p.
- HOFRICHTER, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbiol Technology*, v. 30, p. 454 – 466.
- PANDEY, A ; SOCCOL , C. R ; MITCHELL, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. *Process Biochemistry*, London, v. 35, p. 1153-1169.
- HATAKKA, A. (1994). Lignin – modifying enzyme from selected white – rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Review*. .v. 13, p.125 – 135
- VITTI, L. S. S. (1988). Condições de produção e atividade da celulose do fungo *Aspergillus sp* e seus mutantes isolados de bagaço de cana. 1988. 108 p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.