



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76

Redeclamação pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2023

PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE UMA NOVA ENDOGLUCANASE DE MONILIOPTHORA PERNICIOSA PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

**Alice Carmo Oliveira¹; Raquel Guimarães Benevides²;
Cleidineia Souza de Santana³ e Paloma Tavares Macedo⁴**

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: alicemelg14@gmail.com
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: ssantanacléide@gmail.com
4. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: palomattavaresbio@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: produção recombinante; cDNA; hidrólise

INTRODUÇÃO

A saturação dos métodos comuns de obtenção de combustível, além de representar um problema político quanto às disputas no mercado internacional, compõem um desafio ecológico, visto que, a escassez de sustentabilidade da produção porta consigo a potencialização do fenômeno de efeito estufa, gerada pela queima de matéria fóssil não renovável (Guney, 2021). A busca por tecnologias inovadoras capazes de otimizar a produção e reduzir os efeitos causados pela grande emissão de gás carbônico gerada em indústrias sucroenergéticas estimulou o surgimento de pesquisas envolvendo microrganismos capazes de degradar matéria orgânica lignocelulósica. Como exemplo disto, estudos envolvendo o fungo *Moniliophthora perniciosa* mostraram que seu potencial degradativo enzimático o coloca em frente aos impasses causados pelo descarte inadequado do bagaço da cana-de-açúcar na produção de etanol e poluição causada pelas fontes energéticas não-renováveis, no que concerne o uso do organismo na produção de etanol de segunda geração (Ferraz *et al.* 2021).

Portanto, atrelado às análises *in silico* da proteína, este trabalho tem como objetivo a obtenção de DNA amplificável, contendo a sequência codificante de uma endoglucanase, a fim de recombiná-lo em células de *Escherichia coli* para posterior produção heteróloga da proteína em estudo, objetivando-se desenvolver alternativas para a produção de bioetanol.

METODOLOGIA

O fungo *M. pernicioso* CCMB561, foi condicionado e preservado em meio de cultura Ágar Batata e Dextrose (BDA), em um período de 7 dias, em incubadora B.O.D a 27 °C. Prontamente, uma cisão do micélio do fungo foi transferida para placas de Petri vertida com meio líquido CMC (substrato sintético) com composição de Carboximetilcelulose - 5 g; Além de placas contendo meio semissólido (WY), composto por 40 g de farelo de trigo. O micélio disposto nas placas contendo os meios citados foi incubado em B.O.D, a 27 °C, no período de 7 a 15 dias. Para extração de RNA foi utilizado protocolo conhecido, com TRIZOL Reagent (Invitrogen®). Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a técnica de transcriptase reversa, utilizando-se a enzima Reverse Transcriptase (M-MLV RT; Promega®), a partir das instruções do fabricante. Para amplificação do material, foi realizada a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando-se o kit Qiagen® Master Mix. O desenho dos *primers*, para uso posterior, de acordo com a sequência 10670, uma Glicosil hidrolase da família GH45, foi realizado utilizando-se a ferramenta online OligoAalyzer 3.1 - DNA Technologies® disponível em (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>). A análise de similaridade da sequência proteica foi feita utilizando-se o programa Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o alinhamento entre as sequências de similaridades significativas foi feito no programa SIM - Alignment Tool for Protein Sequences (<https://web.expasy.org/sim/>). A modelagem comparativa e análise estrutural foram seguidas utilizando-se o programa Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>), a fim de adquirir modelos com grau de identidade considerável e o software PyMol, responsável pela sobreposição e alinhamento dos modelos.

RESULTADOS

Quando incubado em meio BDA (Figura 1A), o fungo *M. pernicioso* apresentou grande densidade micelial, entretanto, por não representar um substrato indutor de Glicosil hidrolases, a extração de RNA total resume-se na utilização dos meios: WY e CMC. Apesar de conter a carboximetilcelulose como fonte de carbono, o micélio cultivado no substrato sintético apresentou pouca densidade, como observa-se na Figura 1C, e menor crescimento radial, comparado ao meio semissólido WY (Figura 1B), que não obstante, constituiu-se de materiais lignocelulósicos, principais indutores das hidrolases.



Figura 1: Crescimento do fungo *M. pernicioso* CCMB561 cultivado em meio A. BDA; B. WY; C. CMC, a 27 °C por 7 dias.

Na extração de RNA total, o material cultivado em meio WY apresentou vantagem quanto à retirada do micélio da placa de Petri nas primeiras etapas do experimento. Ademais, as mesmas amostras apresentaram resultados em corrida eletroforética em gel de Agarose 1% satisfatórios na visualização de bandas que indicam presença de RNA ribossômico 28S e 18S, conforme mostra a Figura 2.

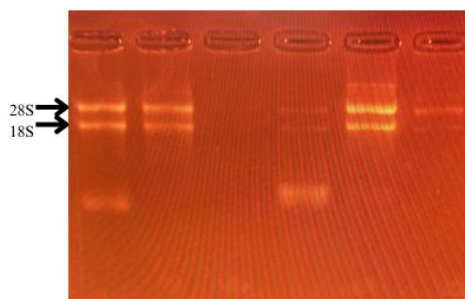


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1% com resultado para subunidades de RNA ribossomal 28S e 18S em seis amostras cultivadas em meio WY, coradas por GelRed Nucleic Acid Stain.

A seleção das amostras para a síntese de cDNA priorizou concentrações de absorbâncias em 260/280 favoráveis - duas amostras de concentrações 553,1 ng/ μ L e 730,7 ng/ μ L, e A260/280 de 1,94 e 2,05, respectivamente. Após sucessivos testes por PCR, em temperatura de anelamento de 61°C, utilizando-se *primers* anteriormente desenhados para a sequência Seq_10670, não foram observadas bandas para DNA em peso molecular correspondente à sequência do estudo (705pb). Como indica a Figura 3, o material da PCR não foi amplificado.

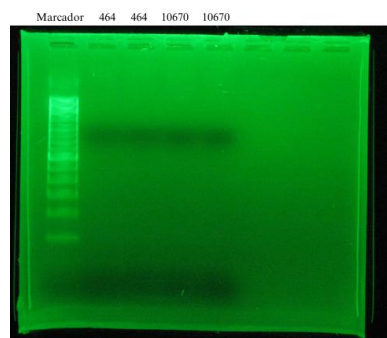


Figura 3: Gel de agarose 1% com resultado para produto de PCR não amplificado, contendo *primers* correspondentes às sequências Seq_464 (controle) e Seq_10670.

Um dos motivos plausíveis para a não amplificação do produto da PCR é a validade dos iniciadores terem excedido o prazo recomendado pelo fabricante. Portanto, novos *primers* foram modelados na plataforma OligoAnalyzer Tool, respeitando-se os parâmetros para temperaturas de Melting, Hairpin e Self-dimer.

Nas análises *in silico* da sequência proteica, para pesquisa em similaridade, utilizando-se o programa Blast, verificou-se uma proteína sintetizada pelo fungo *Moniliophthora roreri*, com grau de semelhança de 71.2% e 4% de

frequência de *gaps*. A proteína em questão é a ESK91621, uma beta-endoglucanase. Ao alinhá-las, foi possível visualizar pontos de similaridades (*match*), aberturas, diferenças e extensões de *gaps*, como destaca o Figura 4. A soma para os pontos de alinhamento para as análogas é de 338.

```

ESK91621  --MKSLSSLFFFAAAVCAQSAGVWYCCKPSCAWTGKASVTPVVRTCDRNGNTLGPD   58
10670     MEMKILSFLLFFAAAALAQLAGVWYCCKPSCAWPGKASVTAPVRTCDRDGKTLDPN   60
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

ESK91621  VKSGCDGGTAFTCTNNAPVAVD--NNTAYGFAAVRLSGQTESRWCCACYELTFTNGPASG   116
10670     TKSGCDSGNAFTCTDNIPWISKHSNDTAYGFAAVKLAGQSEANWCCACYELTFTSEPVIG   120
          . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 4: Porção inicial de alinhamento global entre os resíduos de aminoácidos das sequências ESK91621 e Seq_10670. Destaca-se, em vermelho, os sítios ativos das duas proteínas e em verde, os aminoácidos que indicam abertura não similar. Pontos idênticos (*); aberturas não similares (); gaps (-); pontos de baixa similaridade (:).

Após verificação da assinatura do sítio, utilizando-se o programa ExPasy Prosite, observou-se uma divergência na sequência de aminoácidos no sítio ativo da Seq_10670, cuja presença de uma cisteína (C) ao invés de um triptofano (W) destoa das demais endoglucanases da família GH45. Pela falta de sequenciamento de material amplificado dos experimentos *in vitro* do presente trabalho, para verificação da sequência expressa pelo fungo, considera-se um possível erro de sequenciamento de Seq_10670, cedido pelo professor Gonçalo (UNICAMP), tendo em vista forte semelhança dos códons que traduzem os aminoácidos.

Ademais, a modelagem comparativa das duas proteínas foi realizada no propósito de fomentar as semelhanças estruturais tridimensionais entre os modelos com melhores índices de qualidade (QMEAN). Portanto, observou-se que a sobreposição dos modelos construídos apresenta padrões de enovelamento estáveis, como folha β torcida e conexões comuns em motivo de fita β .

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que o meio rico em materiais lignocelulósicos, WY, beneficiou o crescimento radial do fungo e possibilitou o uso do micélio desenvolvido para técnicas de extração de RNA total de maneira adequada. Resultados convenientes da extração viabilizaram as etapas de síntese de cDNA e PCR, entretanto, esta última não apresentou resultados de amplificação, impossibilitando o sequenciamento da proteína expressa pelo organismo. Outrossim, as análises *in silico* serviram de apoio teórico, ao que tange o conhecimento da sequência estudada, a fim de direcionar a pesquisa ao estudo comparativo de proteínas, em particular, as endoglucanases, objetivando posterior produção recombinante da enzima em células de *E. coli*.

PRINCIPAIS REFERÊNCIAS

FERRAZ, P.; BRANDÃO, R. L.; CÁSSIO, F.; LUCAS, C. 2021. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of cacao witches' broom disease is killed in vitro by *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* yeasts. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 706675, 2021.

GUNEY, T. 2019 Renewable energy, non-renewable energy and sustainable development. *International Journal of Sustainable Development & World Ecology*, 26:5, 389-397.

MENEZES, C. R. DE; BARRETO, A. R. 2015. Biodegradation of lignocellulosic wastes by basidiomycetes fungi: Characterization of waste and study of fungal enzyme complex. *Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas*, v. 19, n. 2, p. 1365-1391.