



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

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

Detecção e Clonagem da enzima lacase de espécies do gênero *Ganoderma* em células de *E. coli*

Rafaela dos Anjos Rocha¹; Hélio Mitoshi Kamida ²; Raquel Guimarães Benevides³; Alison Borges Vitor ⁴ e Edjane Basto Ferreira⁵

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Lic. Ciência Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: anjos2670@gmail.com
2. Hélio Mitoshi Kamida, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hmkamida@uefs.br
3. Participante do projeto Produção recombinante de enzimas celulolíticas e ligninolíticas de fungos e sua aplicação no processamento de resíduos agroindustriais, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: Raquelgb@gmail.com
4. Participante do projeto Produção recombinante de enzimas celulolíticas e ligninolíticas de fungos e sua aplicação no processamento de resíduos agroindustriais, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: alisonborgesvictor@gmail.com
5. Participante do projeto Produção recombinante de enzimas celulolíticas e ligninolíticas de fungos e sua aplicação no processamento de resíduos agroindustriais, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: edjanebferreira@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Fungo; lacase; *Ganoderma*

INTRODUÇÃO

A lignina é uma macromolécula presente na parede celular de plantas, que as confere rigidez. Sua degradação complexa dificulta o acesso aos polímeros de carboidrato lignocelulolíticos. Nesse sentido o fungo da espécie *Ganoderma australe* produz lignases, sendo capazes de realizar a síntese da lignina. O seu estudo pode contribuir na aplicação direta dessas enzimas na produção de etanol 2G, otimizando processos e reduzindo custos (Hatakka, 2001; Lourençon & Magalhães, 2020; Pires, 2015; Ryvardeen, 2004). O trabalho presente propõe a clonagem e expressão da enzima ligninolítica Lacase (Lac), produzida por espécies de fungo da espécie *Ganoderma australe* a partir de células de *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

Utilizou-se fungos da espécie *Ganoderma australe*, obtidos na CCMB-UEFS (Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia), onde foram reativados em placas de Petri com meio Agar batata dextrose (BDA) e posteriormente transferido para o meio WY (Meio indutor semissólido a base de farelo de trigo). Para análise qualitativa das enzimas

ligninolíticas o meio preparado foi o RBBR -0,5g Extrato de malte; 2g Agar; 0,2g RBBR (Azul Brillante de Remazol); 1000ml de água destilada, testando a espécie de *Ganoderma Australe* quanto à sua habilidade de produção da enzimas ligninolíticas

O RNA foi extraído dos micélios do fungo a partir do protocolo Reagente Trizol e submetido a análise por eletroforese em gel de agarose, utilizando o meio BDA como controle ao meio indutor (WY). Foram desenhados dois primers, onde projetados com base em uma sequência específica disposta no artigo produzido por Pei-Yin Ho. Em seguida analisou-os quanto à temperatura de anelamento e estruturas secundárias utilizando a ferramenta OligoAnalyzer. Além disso, foram adicionados sítios de restrição para futura clonagem em um vetor específico, usando o programa NEB cutter 2.0 para identificar os sítios específicos e enzimas de restrição compatíveis com a sequência.

Foi realizada a síntese de cDNA a partir do RNA total extraído usando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase em duas etapas. A primeira etapa consistiu na preparação de uma mistura com RNA, Oligo-dT e água, seguida de incubação a 70°C por 5 minutos e resfriamento em gelo. Na segunda etapa, a mistura foi complementada com tampão, dNTPs, enzima M-MLV e água, resultando em uma reação que foi incubada a 37°C por 1 hora e armazenada a -20°C. Posteriormente, o cDNA foi amplificado por PCR, usando a primeira fita de cDNA como molde e iniciadores específicos. Foi utilizado o kit Quiagen® Master Mix e seguidas as instruções do fabricante para a reação de amplificação do cDNA.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

O fungo *Ganoderma australe* exibiu fenótipos distintos em diferentes meios de cultivo. O meio BDA promoveu crescimento robusto e coloração estável, enquanto o meio WY apresentou crescimento com maior vigor, mas incompleto, com sutis mudanças na coloração. Confirmou-se a expressão de um sistema enzimático ligninolítico, onde o fungo degradou o corante RBBR formando um halo de descoloração em volta do meio de cultura e deixando apenas um fundo claro com vestígios do mesmo (Figura 1).

Segundo Silva et al., (2004), isso ocorre devido à esse corante ser estruturalmente semelhante a certos compostos aromáticos policíclicos que são substratos para as peroxidases ligninolítica. Dessa forma ele é utilizado como substrato para o sistema degradador da lignina e também podem determinar o começo do metabolismo secundário nos fungos ligninolítico.

O cultivo do fungo em meio BDA e WY e nas condições favoráveis apresentou resultados satisfatórios no processo de extração de RNA total para análise da indução da enzima lacase. Na figura 02 é possível observar os números 1 a 2 mostrando as bandas 28S, 18S do RNA respectivamente, indicando a integridade e qualidade das amostras extraídas; a integridade do RNA total foi demonstrada pela presença de bandas íntegras de RNAr de 28s e 18s (SILVA, 2018).

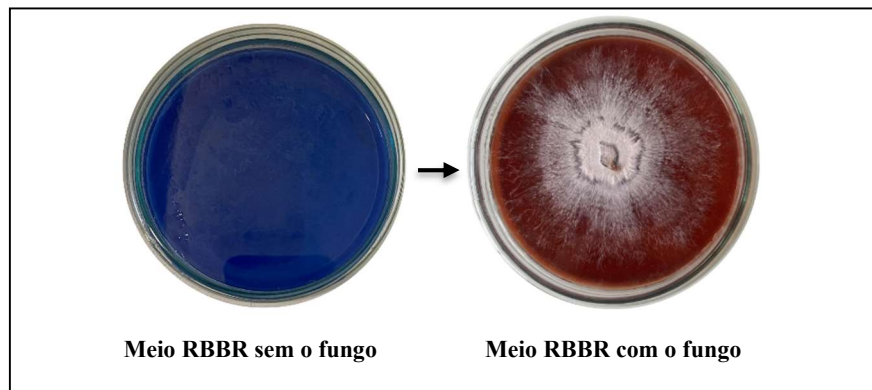


Figura 01- Teste Enzimático

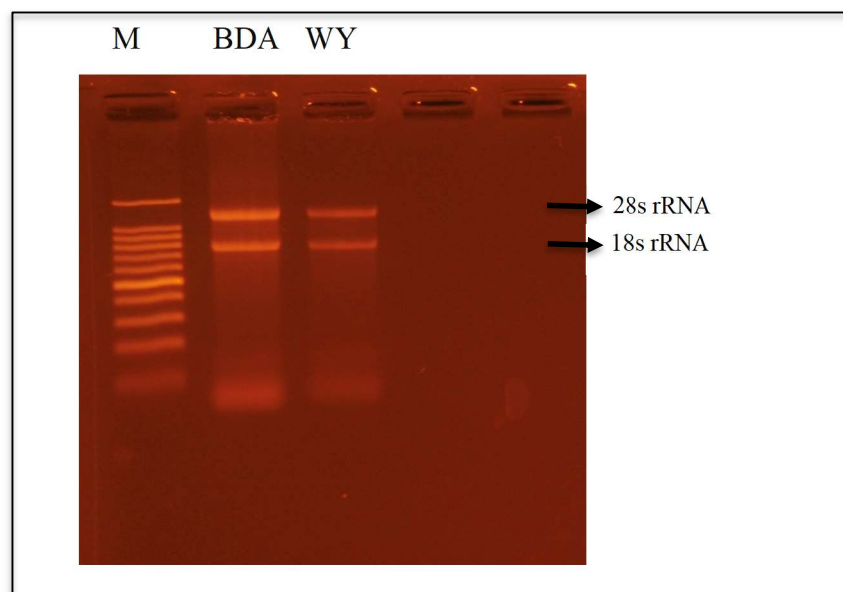


Figura 02: Gel referente a extração de RNA com o *Ganoderma australe* cultivado em meio BDA e WY.

Segundo Munizet *al.*, (2004) as sequências alvo devem apresentar de 75 a 200 pares de base (pb) de comprimento com um conteúdo de GC entre 50% e 60%, e não deve conter estruturas secundárias, bem como uma temperatura de fusão de 55-65.

Tabela 1: Sequências da *Primer 1e 2 da lacase*

| Primer 2 | Sequência (5'-3') | T.M |
|-----------------|---------------------------------------|------------|
| Lac1-Ga-NdeI-F | TAT CAT ATG CTG GTG ATC TCG AAC G | 53,3 |
| Lac1-Ga-NdeI-R | GCT GAA TTC TTA GTG GTC CTC GAC | 57,2 |
| Primer 1 | Sequência (5'-3') | T.M |
| Lac1-Ga-NdeI-F | ATG CAT ATG CTG GTG ATC TCG AAC G | 59,1 |
| Lac1-Ga-NdeI-R | GAA GAA TTC TTA GTG GTC CTC GAC CG | 58,6 |

Não foi possível analisar o produto da PCR, entretanto segue-se com a tentativa de amplificação para que haja a purificação do mesmo, onde será levado para sequenciamento e posteriormente será utilizado para desenhar os *primeres*, que vão flanquear a sequência do gene de interesse permitindo a sua clonagem e expressão

CONCLUSÕES

A espécie de fungo *Ganoderma australe* possui um sistema enzimático ligninolítico e pode contribuir para a reciclagem de resíduos, promovendo o desenvolvimento de uma indústria baseada em matérias-primas renováveis. Esse fungo pode apresentar fenótipos distintos, dependendo do meio de cultivo e mostrou-se eficiente para o processo de extração de RNA em ambos os meios (BDA e WY) tornando-os atrativos para estudos posteriores afim de aumentar o arcabouço a respeito de seu sistema ligninolítico e então, otimizá-los como ferramentas biotecnológicas.

O projeto de pesquisa ao qual o plano de trabalho está vinculado foi contemplado com recursos da UEFS, então com a dificuldade apresentada nas etapas de otimização da PCR, como perspectiva o próximo passo do trabalho será expressar a enzima de forma recombinante a partir da sua clonagem em cepas de *E. coli* utilizando gene sintético.

REFERÊNCIAS

HATAKKA, A. Biodegradation of lignin. In: HOFRICHTER, M.; STEINBUCHER, A. (Org.). Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications, Lignin, humic substances and coal. Weinheim: Wiley, 2001.

LOURENÇON, Tainise V. Lignina frente a fungos apodrecedores de madeira. Embrapa. P. 2-6, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/216660/1/CT-455-1872-final-2.pdf>.

Muniz, H. V. L., Silva Neto, A. F. da, Sales, L. A. T., Soares, T. R., & Alves, M. S. (2020). DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS IN SILICO DE *Mycobacterium tuberculosis* DA REGIÃO 16S PARA O DIAGNÓSTICO DA

TUBERCULOSE. *Interfaces Científicas - Saúde E Ambiente*, 8(2), 77–86.
<https://doi.org/10.17564/2316-3798.2020v8n2p77-86>

RYVARDEN, L. 2004 Neotropical Polypores. Part 1. Introduction, Ganodermataceae & Hymenochaetaceae. *Synopsis Fungorum*, v. 19, p. 1- 227.

SILVA, C. M. M. de S.; MELO, I. S. de; OLIVEIRA, P. R. Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado. *Empraba*. P.8-18, 2004.