UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto n°17.228 de 25/11/2016
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS
SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2021

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA EXOGLUCANASE DE *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Paloma Tavares Macedo[1]; Hélio Mitoshi Kamida[2]; Raquel Guimarães Benevides[3] e Alison Borges Vitor[4]

1. Bolsista PROBIC, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: palomatmacedo@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hmkamida72@gmail.com
3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelgb@gmail.com
4. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: alisonborgesvictor@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: cDNA; Hidrólise enzimática; Aplicação biotecnológica.

INTRODUÇÃO

O modelo econômico de desenvolvimento, baseado na utilização de combustíveis fósseis derivados do petróleo, além de agravar os problemas ambientais é pouco sustentável, pois é inviável assegurar a crescente demanda energética mundial com base na utilização de recursos não renováveis (Akram *et al*., 2018). No entanto, a busca por inovações tecnológicas que visam reduzir tais impactos com base na manipulação dos recursos genéticos associando-se às análises de proteomas *in silico* de fungos relacionados filogeneticamente, constitui uma alternativa potencial no que concerne ao fortalecimento do sistema energético econômico ambiental.

Conforme descrito por Almeida (2012); Chen *et al*. (2018) o *Moniliophthora perniciosa* é uma espécie potencial quanto à produção de celulases que atuam na conversão do material lignocelulósico em etanol. Desta maneira, o objetivo deste trabalho consiste na extração de um RNA íntegro que viabilize a amplificação da sequência codificante de uma exoglucanase de *M. perniciosa*, além da execução de análises *in silico* que permitam a caracterização bioquímica das sequências em estudo e seleção de sequências bioativas de fungos filogeneticamente relacionados para a otimização de trabalhos futuros.

METODOLOGIA

O fungo *Moniliophthora perniciosa* foi reativado em meio de cultura Ágar Batata e Dextrose, durante 10 dias a 27 ºC e o micélio foi transferido para o meio líquido contendo NH_4H2PO_4 – 7 g; K_2HPO_4 – 1,5 g – $MgSO_4$ – 0,5 g; $CaCl_2$ – 0,3 g; $FeSO_4$. $7H_2O$ – 0,184g; $ZnSO_4$. $7H_2O$ – 0,178 g; $MnCl_2.4H_2O$ – 0,158 g; Carboximetilcelulose (CMC, como única fonte de carbono) – 5 g; H2O – 1L; ou o meio semissólido (WY) contendo 40 g de farelo de trigo; 6 g de extrato de levedura; 1 g de K_2HPO_4; 0,2 de $MgSO_4$; 0,2 g de KCl e água destilada q.s.p. 1 L, sendo as frações de micélio incubadas a 25 ºC, entre 7 a 15 dias.

Para a extração de RNA utilizou-se o *Kit TRIZOL* (*Invitrogen*®), de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* foram desenhados de acordo com uma sequência de uma Glicosil Hidrolase 6 (GH6) selecionada a partir do sequenciamento completo do genoma *de M. perniciosa* e analisados utilizando-se a ferramenta *on-line OligoAnalyzer* 3.1*Integrated DNA Technologies*® (https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index). Para a síntese do DNA complementar (cDNA) realizou-se a técnica de transcriptase reversa, utilizando-se a enzima M-MLV *Reverse Transcriptase*, conforme as instruções do fabricante. Para amplificação, foi realizada a Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), utilizando-se o *kit Qiagen® Master Mix*, de acordo com o fabricante. A etapa de purificação foi realizada utilizando-se o *Kit PureLink® PCR Purification Kit* da *Invitrogen*, seguindo-se as recomendações do fabricante e os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 % e registrados pelo transiluminador.

Em virtude da pandemia, as análises moleculares foram interrompidas e, por essa razão, as sequências selecionadas foram analisadas *in silico*. A identificação das sequências correspondentes à proteína em estudo foi realizada através da busca por similaridade com base em sequências depositadas no site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). A classificação das sequências quanto à família e a análise de outros parâmetros bioquímicos foi realizada com base no banco de dados *CAZY* (http://www.cazy.org/). Para o alinhamento, utilizou-se a ferramenta *BLASTp* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e o nível de identidade foi analisado através da ferramenta *Clustal* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Esta ferramenta também foi utilizada para a construção de uma árvore filogenética com base no alinhamento entre as quatro sequências correspondentes à proteína em estudo e as duas sequências de cepas diferentes de *Moniliophthora roreri* já depositadas no *GenBank*.

RESULTADOS

O meio semissólido WY – constituído por farelo de trigo – viabilizou um melhor crescimento e desenvolvimento micelial do *M. perniciosa* quando comparado ao meio CMC, cuja a única fonte de carbono é o carboximeticelulose, como indica a figura 1.

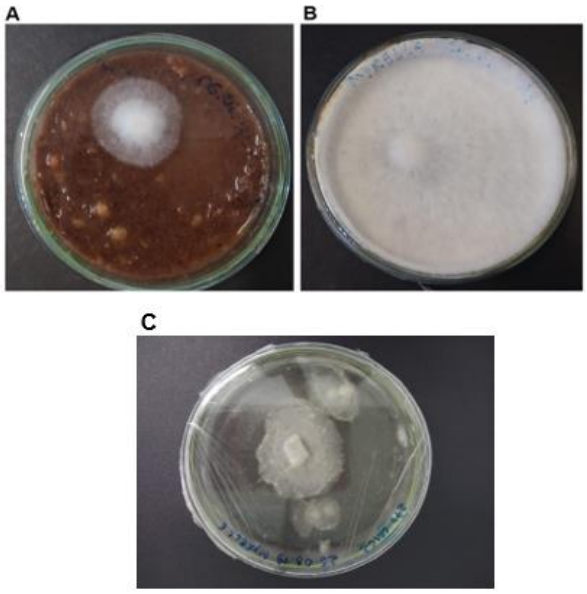

Figura 1 - *Moniliophthora perniciosa* cultivado em meio WY, nas seguintes condições: 6 dias (A) em estufa B.O.D a 25 ºC e (B) 20 dias em estufa B.O.D a 25 ºC. Em C, em meio CMC por 8 dias.

Na extração de RNA, as regiões relacionadas ao RNA ribossômico 28S e 18S mantiveram a integridade, conforme indica a figura 2.

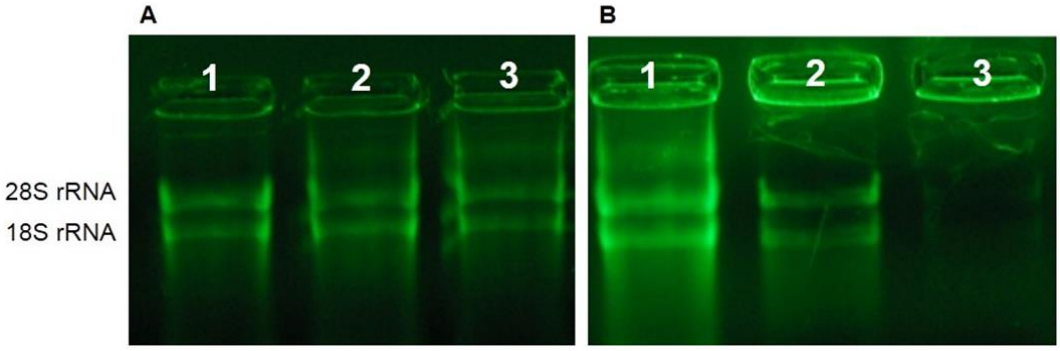

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose (1%). Extração de RNA protocolo Trizol, amostras 1, 2 e 3 (A) em meio WY por 10 dias e amostras 1 e 2 (B) meio WY por 8 dias.

Após a PCR, observou-se a presença de uma banda mais definida de cDNA ao utilizar o *primer* 2929, sob uma temperatura de anelamento de 61°C. Em relação aos *primers* 2927 e 4282, não foi possível a visualização de resultados satisfatórios durante as análises de bancada. Em relação ao fragmento amplificado, infere-se que este apresenta 1.500 pares de bases (Figura 3). A visualização dessas bandas permitiu inferir que houve a indução enzimática em meio WY.

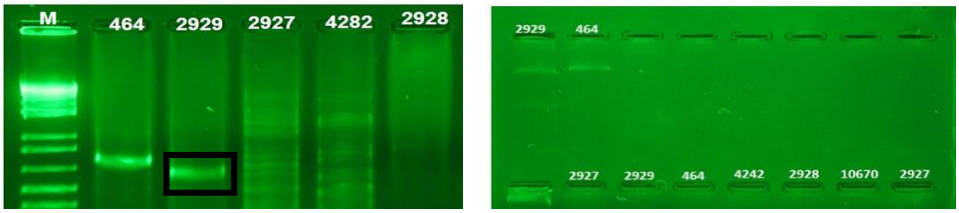

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando Green (*ThermoFisher Scientific*®), exibindo marcador (M) o marcador molecular 1Kb Ladder (Omega y7uBiotek) e as amplificações por par de *primer* (2929, 2927, 4282, 2928).

Quatro sequências do genoma de *M. perniciosa* foram identificadas como pertencentes ao grupo das exoglucanases do tipo cellobyohidrolase, pertencentes à família GH6, sendo estas: Seq_2927; Seq_2928; Seq_2929; Seq_4282, estabelecendo similaridade filogenética com as proteínas de *Moniliophthora roreri*. A Seq_2927 apresentou o maior nível de identidade (94,3%), embora tenha sido encontradas regiões de *gaps*, assim como a Seq_2929, sendo que este fator pode repercutir, portanto, em alterações a nível molecular.

A análise da árvore filogenética gerada (Figura 4), indica que existe um ancestral comum mais recente entre a Seq_2927 *(M. perniciosa)* e a Seq_ESK94155.1 *(M. roreri)*, sugerindo que entre estas sequências o nível de proximidade filogenética é ainda maior em consonância com os resultados apresentados pelo alinhamento, cujo percentual de identidade forneceu o melhor desempenho.

Figura 4 - Árvore filogenética de sequências de exoglucanases do gênero *Moniliophthora* gerada pela ferramenta *Clustal* (sequências 2927, 2928, 2929 e 4282 são provenientes do genoma de *M. perniciosa*) e as ESK e KTB de diferentes cepas de *M. roreri*).

CONSIDERAÇOES FINAIS

A predominância de materiais lignocelulósicos no meio WY favoreceu o maior desempenho de massa micelial, viabilizando as etapas de extração do RNA e a amplificação do cDNA, uma vez que a utilização do *primer* 2929 exibiu um comportamento positivo, resultando na amplificação de em um fragmento contendo 1.500 pb, indicando que esta sequência pode ser selecionada para as próximas etapas de purificação, sequenciamento e subsequente expressão heteróloga. As análises *in silico* indicam que as sequências de *Moniliophthora perniciosa* pertencem à família GH6 e o grau de identidade e similaridade com as sequências de aminoácidos de *Moniliophthora roreri* confirmam o interesse quanto à busca pela otimização de protocolos, além direcionar os estudos de modelagem comparativa para a seleção de uma exoglucanase biotecnologicamente ativa.

PRINCIPAIS REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. C. O. de. 2012. Indução de celulases e xilanases por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variabile* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos. Universidade Federal de Santa Catarina, Dissertação.

AKRAM, F. HAQ UL, I. IMRAN, W. MUKHTAR, H. 2018. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review**.** *Renewable Energy*, v. 122: 225-238.

CHEN, S. X *et al*. 2018. The Model Filamentous Fungus Neurospora crassa: Progress Toward a Systems Understanding of Plant Cell Wall Deconstruction. *Fungal Cellulolytic Enzymes*, p. 107-134.