

# CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA MANGANÊS PEROXIDASE DE *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel, A PARTIR DE CÉLULAS DE *Escherichia coli*.

**Cleidineia Souza de Santana<sup>1</sup>; Raquel Guimarães Benevides<sup>2</sup>; Dalila de Souza Santos Ferreira<sup>3</sup> e Aristóteles Góes Neto<sup>4</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [s.santanacleide@yahoo.com.br](mailto:s.santanacleide@yahoo.com.br)
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [raquelgb@gmail.com](mailto:raquelgb@gmail.com)
3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [dalilassouza@gmail.com](mailto:dalilassouza@gmail.com)
4. Participante do projeto, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, e-mail: [arigoesneto@gmail.com](mailto:arigoesneto@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** basidiomiceto, enzima recombinante, lignina

## INTRODUÇÃO

A indústria de açúcar e etanol tem um importante papel no processo de desenvolvimento do Brasil, assim há a geração de uma quantidade elevada de resíduos agroindustriais. As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, pelos resíduos agroindustriais, pelos resíduos urbanos e madeiras. Dentre essas, os resíduos agroindustriais ganham destaque por serem derivados do processamento de matérias primas com maior valor agregado (CASTRO E PEREIRA JR., 2010).

Os fungos são um dos mais importantes decompositores na cadeia alimentar sendo capazes de degradar de forma eficiente uma vasta quantidade de resíduos. A degradação da lignina, por exemplo, ocorre por meio de fungos que produzem enzimas ligninolíticas extracelulares. O uso de enzimas é considerado na atualidade, um dos maiores setores da indústria biotecnológica. A exploração vem sendo feita da forma bruta, a partir de origem animal e vegetal, ou pelo aproveitamento da expressão enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos (COLEN, 2006).

O sistema de degradação de materiais lignocelulósicos envolve uma série de reações. As espécies de basidiomicetos, incluindo as do gênero *Trametes*, são capazes de realizarem a degradação, devido ao complexo enzimático lignocelulolítico específico (ALVES, 2010). Dessas enzimas, as que estão em um maior nível de estudo são as Lignina peroxidases (LiPs), Manganês peroxidases (MnPs) e Lacases (Lacs) (GUILLÉN et al., 2000; CONESA et al., 2002; SIGOILLOT, 2012; JANUSZ G, 2013).

Desse modo, o presente trabalho propõe obter e caracterizar na forma recombinante a enzima Manganês peroxidase (MnP) do fungo *Trametes villosa*, objetivando-se uma futura aplicação na deslignificação no bagaço de cana.

## METODOLOGIA

A linhagem do fungo *Trametes villosa* foi adquirida na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB) da UEFS, com número de identificação CCMB561, preservado em método Castellani. Para a reativação do fungo e indução da enzima de interesse o micélio de *T. villosa* foi transferido para o meio de cultura sólido, Agar batata e dextrose (BDA) e posteriormente o micélio foi transferido para o meio de cultura sólido ABSA (Agar, bagaço de cana e sulfato de amônio) sendo incubado em B.O.D a 28°C por 7 dias.

No procedimento de extração de RNA, seguiu-se o protocolo do Reagente Trizol (Invitrogen<sup>®</sup>). Os materiais necessários foram: cadinho, pistilo, espátula, bisturi pinça e ponteiros estéreis. Os equipamentos necessários foram: centrífuga 5804 R (Eppendorf<sup>®</sup>), vórtex MS1 Minishaker (IKA<sup>®</sup>), pipetas (Eppendorf<sup>®</sup>), NanoDrop200 (ThermoScientific<sup>®</sup>), cuba de eletroforese, fotodocumentador (KODAK EDAS 290<sup>®</sup>).

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 (Eppendorf<sup>®</sup>) de 2 mL, em seguida adicionou-se 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen<sup>®</sup>) 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 ressuscitado em 50 µL de água RNase-free e utilizando-se a pipeta foi feito movimentos *up-down* por até cinco vezes, o RNA obtido foi armazenado em -20°C. O RNA extraído foi analisado quantitativamente pela técnica de espectofotometria NanoDrop2000 (ThermoScientific<sup>®</sup>), no comprimento da onda A260/280nm e tendo como fator de correção 40, observando-se a razão 260/280nm e 260/230nm. Sendo também analisado por visualização em fotografia digital (KODAK EDAS 290<sup>®</sup>), após 1 hora de corrida eletroforética.

A síntese de DNA complementar (cDNA), foi feita em duas etapas, na etapa 1 foi feita a digestão das moléculas de DNA, com enzimas de DNase I, o mix dessa reação foi preparado adicionando-se em um Eppendorf estéril de 200 µL, 8 µL do RNA total extraído, 1 µL da enzima DNase I e 1 µL do tampão DNase I 10x, em seguida foi incubado por 30 min, sendo 15 min à temperatura ambiente e 15 min a 65°C. Decorridos os 30 minutos procedeu-se a etapa 2, reação da transcriptase reversa, o mix dessa reação foi feito adicionando-se em um Eppendorf estéril de 200 µL, 5 µL de RNA tratado com DNase I, 1 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de OligodT, 3 µL de Água *Nuclease free* em seguida foi incubado a 65°C por 5 min e submetido a banho de gelo por 1 min. Prosseguindo-se foi adicionado 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2 µL de DTT 0,1M, 2 µL de tampão RT 10x e 1 µL da enzima inibidora RNase out sendo incubada a 42°C por 2 min. Em seguida adicionou-se 1 µL da enzima Super Script II RT, e novamente o mix foi incubado sendo a 42° por 50min e a reação foi parada a 70° por 15 min e submetida a banho de gelo. No passo final foi adicionado 1µL da enzima RNase H, em seguida a reação foi incubada a 37°C por 20 min, decorridos o tempo o cDNA sintetizado foi armazenado em um freezer à temperatura de -20°C.

O *primer* para o gene da enzima MnP foi desenhado a partir da sequência parcial nucleotídica obtida por Carneiro (2011). Para verificar a estrutura do primer, porcentagem de conteúdo C/G, bem como temperatura de *melting* (Tm) foi utilizado o simulador gratuito de construção de *primers* disponível na página <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>.

Tabela 1. Dados referentes aos *primers* senso desenhados

| Denominação | Seqüência (5' 3')          | Teor de C/G | Temp. de <i>melting</i> (T <sub>m</sub> ) |
|-------------|----------------------------|-------------|---|
| MPerox_TvF  | <i>gTTCCACACTCCCgACCAg</i> | 59,93%      | 63°C                                      |

Para a amplificação do cDNA foi utilizada a estratégia de 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). Para a reação de PCR foi utilizado o kit GoTaq® Green Master Mix: tampão de reação, dNTPmix 10 mM (cada), iniciadores para o gene (senso e anti-senso), DNA molde (cDNA), enzima GoTaq polimerase 5 U/μL, e água estéril, seguindo-se as instruções do fabricante. A reação de PCR foi feita seguindo-se os seguintes passos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados referentes à reação de polimerase em cadeia

| Passo           | Temperatura (°C) | Tempo | Ciclos |
|-----------------|------------------|-------|--------|
| Desnat. Inicial | 95               | 3'    | 1      |
| Desnaturação    | 95               | 45''  | 35     |
| Anelamento      | 55               | 1'    | 35     |
| Extensão        | 72               | 3'    | 35     |
| Extensão Final  | 72               | 5'    | 1      |
| Final           | 16               | -     | 1      |

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de promover o desenvolvimento da biomassa micelial bem como a expressão da enzima Manganês peroxidase (MnP), o fungo *Trametes villosa* foi cultivado em meio BDA e em meio ABSA. O cultivo do fungo em BDA (Figura 1) por sete dias a partir dos resultados por análises quantitativa e qualitativa foi considerado aceitável em relação à produção de biomassa micelial, presumivelmente pelo fato do meio ser rico em nutrientes, não favorecendo assim a expressão da enzima de interesse pelo fungo *T.villosa*. No entanto, quando cultivado em meio ABSA (Figura 2) (ágar, bagaço-de-cana e sulfato de amônio), o fungo apresentou menor crescimento de biomassa, pelo fato do meio ser rico em substrato lignocelulósico, sendo o resultado considerado satisfatório para a produção da enzima MnP pelo fungo *T. villosa*.

Figura 1: *T. villosa* cultivado em meio BDA.Figura 2: *T. villosa* cultivado em meio ABSA.

Segundo alguns autores, como Menezes, Silva & Durrant (2009), Pirota et al., (2009) e Regina et al., (2009) o bagaço de cana é um substrato com potencial capacidade de induzir a produção de enzimas ligninolíticas, devido ao alto teor de lignina presente na sua estrutura. Por outro lado, o meio não favorece a grande produção de biomassa micelial por ser um meio pobre em nutrientes, corroborando Carneiro (2011). O micélio de *T. villosa* quando cultivado em meio ABSA, foi submetido à extração de RNA total, verificando-se a integridade do RNA extraído (Figura 3).

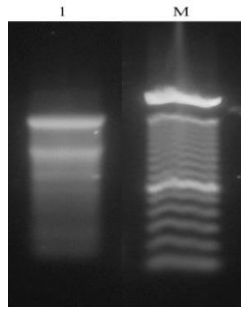


Figura 3: Resultado de RNA, cultivado em ABSA. Da direita para a esquerda: M: Marcador de massa molecular de 100pb DNA Ladder; 1: *T.villosa*;

Em relação à amplificação da MnP por meio da técnica de PCR, verificou-se o anelamento do primer formando um produto de aproximadamente 500pb. A formação do fragmento de 500pb a partir do anelamento do primer na região de interesse comprova a indução da enzima MnP pelo fungo *T. villosa* sob as condições utilizadas.

O amplificado está em fase de clonagem para sequenciamento e início dos experimentos referentes à produção da enzima de forma recombinante.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados por meio da extração de RNA, pode-se concluir que o meio ABSA foi o mais favorável para a expressão da enzima Manganês peroxidase pelo fungo *T. villosa*. Com base no produto de *T. villosa*, após a reação de PCR, foi possível verificar o fragmento de 500pb referente à amplificação da região específica de MnP, confirmando que houve a indução da enzima Manganês peroxidase. Os estudos seguirão avançando para a produção da enzima na forma recombinante.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, F. Modelagem e simulação de biorreator operando com fungos trametes versicolor para produção de enzima lacase. / Fabiano Alves — São Caetano do Sul, SP: CEUN-EEM, 2010. 80 p.
- BALLESTEROS, M. 2001. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: Biocombustibles para el sector del transporte. *Energía*, 161(1):29-34.
- CARNEIRO, R.T.O. Produção das enzimas lignina e manganês peroxidases; isolamento e caracterização parcial do gene da LiP de uma linhagem de *Trametes villosa* isolada do semi-árido brasileiro. 2011. Dissertação (Departamento de Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Feira de Santana. 2011.
- CARVALHO, M.E.A. Produção de Lignina Peroxidase e sua Aplicação no Biobranqueamento de Pasta de Celulose. 2003, 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.
- CASTRO, A.M., Pereira Jr., N., 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, 33, 1-12.
- COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Minas Gerais: UFMG, 2006. 206 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2006.
- MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte de produção de enzimas lignocelulolíticas. *Estudos tecnológicos* vol. 5, nº1. p. 68-78, 2009.
- REGINA, M.; BROETTO, F.; GIOVANNOZZI-SERMANNI, G.; MARABOTINI, R.; PERANNI, C.; LINDE, G. A. *et al*, Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais *Semina: Ciências Agrárias* vol 30. nº 4, p. 881-888, Londrina, out./dez., 2009.