



**XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS
SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024**

**SELEÇÃO E CLONAGEM DE SEQUÊNCIA CODIFICANTE DE CELULASE
DE MONILIOPHTHORA PERNICIOSA EM CÉLULAS DE E. COLI**

**Tiago Sandes Galvão¹; Paloma Tavares Macedo²; Alison Borges Vitor²; Raquel
Guimarães Benevides³**

1. Tiago Sandes Galvão – PROBIC/UEFS, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: tsgalvao15@gmail.com

2. Lapem, Universidade Estadual de Feira de Santana

3. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelgb@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: basidiomiceto; lignase; produção recombinante.

INTRODUÇÃO

Diante do atual cenário global de insegurança energética perante as crescentes mudanças climáticas, crises sanitárias e políticas e o declínio das reservas de combustíveis fósseis, se mostra explícita a necessidade de um novo modelo energético e as fragilidades e a insustentabilidade do modelo atual. A substituição dos combustíveis fósseis é importante para atender às demandas das gerações futuras, com governos e indústrias em todo o mundo adotando várias medidas para fornecer soluções adequadas para compensar esses problemas; no entanto, o petróleo e outros meios não sustentáveis continuam sendo a principal fonte que está sendo usada para atender às demandas mundiais de combustível (CHAKRABOTY; LI; BHATTACHRYA, 2021).

O bagaço da cana é um resíduo agroindustrial constituído por uma rede complexa e resistente de materiais ligninocelulosicos, composta em sua maior parte por celulose, de 30 a 50 por cento, seguido por hemicelulose e lignina (RODRIGUES et al., 2017). Uma das maiores dificuldades em aproveitar esse resíduo lignocelulósico está no arranjo desse complexo celulose-hemicelulose-lignina. Uma vez essa barreira sendo rompida, moléculas de celulose presentes na estrutura desse material ligninocelulósico são convertidas em álcool via fermentação alcoólica. Esse material pode ser degradado por processos físicos (explosão a vapor), químicos (soda cáustica) ou biológicos (enzimas ligninocelulósicas), sendo este último o mais almejado para sustentabilidade, uma vez que permite a degradação dos polissacarídeos de interesse com o mínimo de poluição ao meio.

A produção heteróloga de celulases de *Moniliophthora perniciosa*, utilizando-se de células de *E. coli*, se apresenta então como um eficiente mecanismo para a produção de enzimas estáveis, visto seu rápido crescimento e baixo custo em seus substratos necessários, além de dispor de um genoma bem caracterizado, o que viabiliza a manipulação genética e amplia as futuras expectativas no que concerne ao processamento de biocombustíveis (MENDOZA, 2018). Diante de tudo que foi apresentado, o presente trabalho propõe a seleção de sequências codificantes de celulase de *M. perniciosa*, para a sua clonagem em células de *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Busca em banco de dados genômicos

Foi realizado um levantamento bibliográfico através da plataforma do NCBI, através da combinação de palavras chave como “perniciosa” e “exoglucanase”,. Através das plataformas dos sites Expasy e Clustalw, foi feito uma seleção dessas sequências através da sua viabilidade, primeiramente verificando se elas se traduzem corretamente em proteínas, através das ferramentas do Expasy, e posteriormente pareando estas com sequências já verificadas como viáveis, disponibilizadas por doutorandos do laboratório, através da plataforma de pareamento do site Clustalw.

Por fim, para garantir a viabilidade das sequências, foi realizada a construção da estrutura tridimensional das sequências obtidas pelos processos de seleção anteriores. Para a predição da estrutura tridimensional da sequência de exoglucanase de *M. perniciosa*, foi utilizada a modelagem comparativa a fim de selecionar moldes com base em sequências com estrutura cristalográfica definida e depositadas no PDB, utilizando-se a plataforma SWISS-MODEL (BIASINI et al., 2014). A construção dos modelos foi realizada com base no servidor SWISS-MODEL e, a partir do escore determinado pelo GMQE (Global Model Quality Estimation) e QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis), determinou-se a estabilidade conformacional e a qualidade da proteína. A ferramenta PyMOL (v 1.3) (SCHRÖDINGER, 2009) foi utilizada para a análise dos modelos, bem como a sobreposição destes e seus respectivos moldes.

Cultivo do fungo

O fungo *Moniliophthora perniciosa*, isolado do semiárido e disponibilizado pela Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB) da UEFS, foi preservado em meio de cultura Ágar Batata e Dextrose (BDA) no período de 10 dias. Em seguida, uma fração do micélio foi transferida para a placa de Petri, contendo o meio líquido WY, com os seguintes constituintes: 40 g de farelo de trigo; 6 g de extrato de levedura; 1 g de K₂HPO₄; 0,2 g de MgSO₄; 0,2 g de KCL e água destilada q.s.p. 1 L., e foi incubado em BOD, a 25°C, por um período de 10 dias.

Extração de RNA

Para a realização do processo, os ácidos ribonucléicos foram extraídos do *Moniliophthora perniciosa* utilizando-se o Kit TRIZOL Reagent (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação, a determinação da pureza e a integridade das amostras de RNA foram analisadas através de métodos espectrofotométricos a 260 e 280nm e de eletroforese em gel de agarose a 1%.

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

Busca em banco de dados genômicos

A partir do levantamento bibliográfico pode-se perceber uma baixa viabilidade das sequências encontradas, muitas por estarem incompletas, não sendo traduzidas corretamente. Foram encontradas um número maior de sequências de exoglucanases, e foram comparadas a sequências já obtidas em laboratório e já verificadas suas viabilidades, através da ferramenta de *Multiple Sequence Alignment* do Clustalw. A partir disso foi selecionada uma sequência do grupo das exoglucanases do tipo cellobiohidrolase (exo1,4-β-D-glucanase), denominada EEB92206.

Seleção da proteína molde para Modelagem Comparativa

Em seguida, utilizando-se a plataforma SWISSMODEL, foram realizadas buscas por proteínas já depositadas no PDB a fim de selecionar os modelos estruturais mais adequados para a construção das estruturas tridimensionais. Desta maneira, as melhores estruturas cristalográficas encontradas – como resultado do alinhamento – foi a proteína com o código

PDB 5xcy.1.A, que corresponde à celobiohidrolase do basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* e pertence à família GH6 (TACHIOKA, 2017).

Foram parâmetros relevantes para esta análise o percentual de identidade da sequência de aminoácidos em estudo em relação à proteína molde, devendo apresentar um percentual de identidade entre as sequências acima de 50 %, e o desvio de mínimo quadrado (RMSD) de uma estrutura em relação à outra na ordem de 2 – parâmetro intimamente relacionado à resolução da estrutura cristalográfica (LEMUCHI et al., 2013; SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

Portanto, os resultados obtidos estão de acordo com os critérios descritos na literatura, de modo que a identidade sequencial da estrutura cristalográfica foi de 66,87%, e em relação à resolução da estrutura cristalográfica, o resultado foi de 1,2. Outro aspecto importante no que concerne à seleção do molde está intimamente relacionado à verificação quanto à presença de ligantes como celobiose (CBI) e celotetraose (CTT) – parâmetro importante para a compreensão da interação do sítio ativo da proteína e do seu respectivo substrato (GAO et al., 2017).

Construção do Modelo 3D e Avaliação do Molde

Para a construção da estrutura tridimensional, além dos parâmetros considerados acima, a avaliação do modelo inclui a análise dos valores de QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis) e GMQE (Global Model Quality Estimation). QMEAN ou z-score sendo utilizado para analisar a qualidade de toda a estrutura ou a qualidade dos resíduos de aminoácidos. Logo, para este parâmetro, um modelo é dito de baixa qualidade quando atinge valores igual ou menor que -4. Já em relação ao parâmetro GMQE é necessário que o modelo alcance valores entre 0 e 1 para que seja validado (SILVA; BASTOS; SANTOS; 2021) Logo, o GMQE obtido após o alinhamento entre a sequência EEB92206 e o molde foi de 0,83, se mostrando válido.

É importante ressaltar que a avaliação do modelo gerado também engloba a análise da qualidade estereoquímica através do gráfico de Ramachandran, que expressa a conformação de uma determinada proteína, além de determinar o percentual de resíduos dispostos em regiões energeticamente favoráveis. Nesse sentido, um modelo é considerado adequado quando possui cerca de 90% dos resíduos em regiões energeticamente favoráveis (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968). Portanto, ao considerar o modelo gerado a partir da sequência, verificou-se que apresenta 93,88% dos resíduos dispostos em regiões energeticamente favoráveis. (Figura 2).

Diante da análise de tais parâmetros, foi possível predizer os modelos tridimensionais da sequência em estudo com base no molde PDB 5xcy.1.A, o que está intimamente relacionado com o grau de similaridade entre as estruturas da sequência da proteína alvo e a estrutura sequencial da proteína molde, inferindo-se, portanto, que existem semelhanças entre o modelo cristalográfico das proteínas hipotéticas com o molde utilizado.

Com a avaliação positiva da estrutura dessa sequência, foi planejada a estratégia de futuramente utilizar PCR em tempo real para analisar a expressão desta sequência e de outra, já utilizada em laboratório e utilizada neste trabalho para pareamento a partir do site Clustalw, denominada “2929_g”, em células de *E. coli*, e qual das duas seria mais interessante para produção heteróloga. Para isso, contudo, se faz necessária a obtenção de extração de RNA de qualidade.

Reativação do fungo em meio BDA

Considerando o período de 7 dias, em estufa a 27 °C, o cultivo do fungo em meio batata-dextrose-ágar (BDA) demonstrou-se favorável para o crescimento e o desenvolvimento no que concerne à biomassa micelial, sendo isto relacionado de maneira vital com as fontes nutricionais necessárias, principalmente carbono e nitrogênio – elementos importantes para a síntese de compostos orgânicos que integram o protoplasma.

Contudo, para a análise da atividade enzimática, este meio de cultura se faz impróprio para este tipo de avaliação, já que não há a disponibilidade de uma fonte de componentes lignocelulósicos. Logo, se fez necessário o cultivo do fungo em um meio indutor de celulases.

Cultivo do fungo no meio WY

A formação do halo micelial corresponde à região de atividade enzimática, conforme descrito por JUNIOR PAZ et al (2020). Sabe-se também que o tempo de crescimento do fungo em meio líquido pode variar entre cinco e dez dias, como relatado em BONATO et al (2014). Nesse sentido, durante 10 dias, em B.O.D a 27 °C, o meio semissólido WY – que apresenta em sua constituição farelo de trigo – apresentou ter uma diferença na velocidade de crescimento de duas placas, denominadas “P” e “C”, com um possuindo um halo micelial menor que outro, como pode ser visto na Figura 4. Para garantir rendimento do material genético, foram coletadas amostras de ambas.

Extração de RNA total

Ao comparar os resultados encontrados para a extração de RNA a partir dos dois cultivos do *M. perniciosa* no meio WY, após 8 dias de incubação, foi possível observar que a visualização das bandas, associadas às subunidades 28S e 18S mantiveram-se mais íntegras e detectáveis nas amostras P1 e P2, relacionadas ao meio que demonstrou um crescimento mais lento, quando comparado às amostras C1 e C2, que demonstraram um crescimento mais rápido, como indica a Figura 4. A baixa detecção das amostras com crescimento mais rápido pode se dar pela maior aderência ao meio, podendo este ter contaminado as amostras 1C e 2C ao decorrer da extração.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

No que concerne à etapa de extração de RNA, se verificou uma alta capacidade de expressão em meios de baixo crescimento micelial, o que aponta para um rendimento maior que o esperado no caso de halos miceliais de pouco crescimento, como o observado no trabalho. Se fazem necessários a realização de mais testes a fim de obter resultados mais claros e consistentes. Pode-se constatar uma baixa viabilidade para as sequências de endoglucanases e beta-glicosidases disponíveis em plataformas de bancos de dados genômicos, com ênfase na plataforma do NCBI. Se demonstra uma possível necessidade de estudos relacionados a processos mais precisos de disponibilizar estas frequências nas plataformas, visando preservar a tradução destas sequências genômicas, para pesquisas posteriores.

A análise in silico, sobretudo a modelagem comparativa de proteínas, se manteve como sendo uma ferramenta útil para elucidar problemas associados às sequências de interesse, viabilizando a avaliação positiva de estruturas de sequências. Tendo isso em mente, foi planejada a estratégia de se realizar estudos utilizando PCR em tempo real para analisar a expressão das sequências priorizadas no estudo em células de *E. coli*, visando saber qual das duas seria mais interessante para produção heteróloga.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Sibtain et al. Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Pak J Bot*, v. 41, n. 3, p. 1411-1419, 2009.
- BIASINI, M. E. A. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. W1, p. W252-W258, 2014.
- BONATO, A. L. V. et al. Otimização do método de extração de DNA de *Magnaporthe oryzae* de trigo. *Comunicado Técnico*, 343, v. 1, 2014.
- CASTRO, Aline Machado de; PEREIRA JR, Nei. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.

- CHAKRABORTY, Sudip et al. The solution to the global energy crisis with new materials, and sustainability. *Journal of Phase Change Materials*, v. 1, n. 2, 2021.
- CORTEZ, Luís Augusto Barbosa. Sugarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability. Blutcher, 2010.
- DINIZ, Fernanda Viana et al. ATIVIDADE ENZIMÁ TICA DE FUNGOS ENDOFÁ TICOS DE BACABA (*Oenocarpus bacaba* MART.). *Biota Amazônica (Biota Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v. 10, n. 3, p. 7-11, 2020.
- EMBRAPA: Árvore do conhecimento – Cana de açúcar. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana>>. Acesso em: 30 de setembro de 2024.
- GAO, J., et al., Characterization and crystal structure of a thermostable glycoside hydrolase family 45 1, 4- β -endoglucanase from *Thielavia terrestris*. *Enzyme and microbial technology*, v. 99, p. 32-37, 2017.
- JÚNIOR PAZ, F. B. da et al. Evaluation of the proteolytic activity of *Penicillium chrysogenum* isolated from the IFPE – s Recife memorial room. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 8, p. 60502-60508, 2020.
- LEMUCHI, M. O. et al. Use of Comparative Modeling in Structural Determination of *Yersinia* Phytase. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports*, v.2, n.1, p. 25-30, 2013.
- MACHADO, Angela da Silva. Estudo de glicosil hidrolases das famílias 6 e 7 provenientes de basidiomicetos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- MENDOZA, Josman Andrey Velasco. Expressão heteróloga, análise bioquímica e avaliação da produção fermentativa de uma enzima exo-arabinanase da família GH93. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- MORAIS, Martival dos Santos et al. Cellulolytic complex produced by two species of phytopathogenic fungi isolated from cassava. *Summa Phytopathologica*, v. 42, p. 249-253, 2016.
- ROBAK, Katarzyna; BALCEREK, Maria. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food technology and biotechnology*, v. 56, n. 2, p. 174, 2018.
- RODRIGUES, Cristiane et al. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. *Biotecnologia aplicada a agroindústria*, 2017.
- SCHRÖDINGER. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, 2009.
- SILVA, L. X.; BASTOS, L. L.; SANTOS, L. H. Modelagem computacional de proteínas. In: *BIOINFO – Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional*. 1^a ed. Vol 1. Lagoa Santa: Editora Alfahelix, 2021.
- SOLÍS, Nataly et al. Use of Cellulase enzyme obtained from *Monilia* (*Moniliophthora roreri*) for treatment of solid waste of Cob, Rice husks and Cocoa shell. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 6, n. 3, p. 066-070, 2016.
- SONI, Sanjeev Kumar; SHARMA, Amita; SONI, Raman. Cellulases: role in lignocellulosic biomass utilization. *Cellulases: Methods and Protocols*, p. 3-23, 2018.
- TACHIOKA, M. et al., Estrutura cristalina de uma família 6 celobiohidrolase do basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2017.
- TEIXEIRA, Fábio Andrade; PIRES, Aureliano Vieira; NASCIMENTO, Paulo Valter Nunes. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, v. 8, n. 6, p. 1-9, 2007.
- VISSE, Evan Michael et al. Production and application of an enzyme blend from *Chrysoporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, v. 144, p. 587-594, 2013.