

## Seleção e caracterização de clones e isolados celulolíticos, oriundos de biblioteca metagenômica e coleção de culturas biológicas de solo.

Isabela B. Lima (TM), Joice de S. Rocha (TM), Beatriz S. Guimarães (IC), Letícia B. Diogo (TM), Marcio M. Loureiro (PQ)\*

Laboratório Multidisciplinar de Biologia – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) – Campus Duque de Caxias – RJ, marcio.loureiro@ifrj.edu.br

Palavras Chave: *celulases, metagenômica, microrganismos celulolíticos, solos agrícolas.*

### Introdução

A celulose consiste em um homopolímero linear, composto por 8000 a 12000 unidades de glicose ligadas através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, as quais são hidrolisadas por fungos e bactérias com atividade celulolítica, enquanto que a hemicelulose consiste em um heteropolímero, formado por pentoses (D-xilose, D-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose) e açúcares ácidos (xilanos). Estes polímeros apresentam ampla disponibilidade na forma de lixo urbano, industrial, agrícola e florestal, o que tem atraído grande atenção para o desenvolvimento de tecnologia voltada para bioconversão desta biomassa em produtos de valor agregado, especialmente, etanol. As celulases são agrupadas em 3 principais classes de enzimas, as quais atuam sinergicamente para hidrolisar celulose em glicose, sendo denominadas: Endo-1-4- $\beta$ -glucanase que cortam randomicamente sítios internos na superfície da celulose cristalina, gerando novas extremidades de cadeias; Celobiohidrolase que atuam em extremidades reduzidas ou não-reduzidas de celulose e liberam celobiose como principal produto; e  $\beta$ -glicosidase que hidrolisam celodextrinas e celobiose em glicose. Devido a estas características, possuem inúmeras aplicações em diversos segmentos industriais, que apliquem processos dependentes de atividade celulolítica, realizados numa ampla faixa de pH, temperatura e condições iônicas. Neste sentido, este projeto de pesquisa utiliza uma abordagem metagenômica, através da construção de bibliotecas genômicas, a partir de amostras de DNA isoladas de solos agrícolas, com finalidade de propiciar a identificação de novas enzimas com potencial biotecnológico, oriundas principalmente de microrganismos não cultiváveis em laboratório, bem como isolamento de microrganismos celulolíticos, a partir de amostras de solo.

### Resultados e Discussão

Para tal propósito, realizamos extrações de DNAs metagenômicos de amostras de solo agrícola, para

construirmos 02 bibliotecas genômicas, sendo a primeira construída a partir de insertos de DNA, com pesos moleculares variando de 10 a 40 Kb, através da utilização de diferentes metodologias. E a segunda, a partir de sequências de rDNA 16S, amplificadas por PCR e clonadas em plasmídeo pGEM, as quais estão sendo geradas em sequenciador automático DNA, para posteriormente procedermos análises de bioinformática, acerca da variabilidade genética dos solos analisados. Adicionalmente, estamos realizando isolamentos de fungos e bactérias com atividade celulolítica, em meios de cultura complexos, confeccionados a partir de extratos de solo e carboximetilcelulose (CMC), onde os inóculos diluídos entre  $10^{-2}$  e  $10^{-6}$ , foram plaqueados através da técnica *spread plate* e incubados de 2-4 dias a 27°C, para posteriormente repicarmos as colônias isoladas para tubos de criopreservação, contendo 1 mL de caldo LB e incubá-los por mais 2 dias a 27 °C, antes de adicionarmos glicerol estéril na concentração final de 15% e estocá-las em ultrafreezer -80°C. Atualmente, possuímos 1 biblioteca genômica de rDNA 16S contendo aproximadamente 1200 clones em análise, bem como uma biblioteca de fosmídeos contendo aproximadamente 800 clones e uma coleção de culturas biológicas, contendo aproximadamente 500 microrganismos celulolíticos e DNAs purificados e quantificados para execução de novas clonagens de DNA. Em breve pretendemos iniciar nossas análises de bioinformática, bem como estamos procedendo a seleção de clones das bibliotecas metagenômicas e isolados da coleção de culturas biológicas, através da detecção de atividade celulolítica, exibida pelos isolados e clones cultivados em meio de cultura suplementado com carboximetilcelulose (CMC), corados com o corante vermelho congo.

### Conclusões

Em breve pretendemos iniciar os estudos de biodiversidade dos solos analisados, através da análise das sequências de DNA, obtidas a partir dos clones da biblioteca genômica de rDNA 16S, bem como iniciaremos a caracterização dos clones oriundos das bibliotecas metagenômicas, e isolados

*Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*

celulolíticos da coleção de culturas biológicas, com atividade celulolítica expressiva, detectada em meio de cultura suplementado com CMC.

### **Agradecimentos**

CNPq, FAPERJ & PFRH/ANP/PETROBRÁS.