

BIOPROSPECÇÃO DE NOVAS ENZIMAS COM ATIVIDADE CELULOLÍTICA (CELULASES), ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE UMA ABORDAGEM METAGENÔMICA APLICADA EM SOLOS AGRÍCOLAS

Tainá S. Almeida (IC), Isabela B. Lima (TM), Beatriz S. Guimarães (TM), Miguel A. Paz (TM), Lucas S. Gonçalves (TM), Thayná Araújo (TM), Marcio M. Loureiro (PQ)

* tainasalmeida@gmail.com

Laboratório Multidisciplinar de Biologia- Instituto Federal do Rio de Janeiro- Duque de Caxias

Palavras Chave: *Bioprospecção, Celulases, Metagenômico, Solo agrícola.*

Introdução

A celulose consiste em um homopolímero linear, enquanto que a hemicelulose consiste em um heteropolímero. 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.

Utilizamos a metagenômica, através da construção de bibliotecas a partir de amostras de DNA isoladas de solos agrícolas, podem propiciar a identificação de novas enzimas de grande potencial biotecnológico para otimização destes processos, oriundas principalmente de microrganismos não cultiváveis em laboratório.

Resultados e Discussão

Realizamos a extração de DNA metagenômico com o kit de extração de DNA de solo da MO BIO, após isso realizamos o PCR que é reação enzimática de primers desenhados para se anelarem em regiões conservadas dentro do DNA, o RNA ribossomal 16S, amplificando assim esse RNA, gerando assim após a eletroforese fragmentos de 1,5kb.

As reações de PCR foram aplicadas e excisadas em gel de agarose 1%, após isso foram purificadas utilizando o kit de purificação de DNA da MO BIO.

As amostras purificadas foram homogeneizadas em um único tubo, preparadas e quantificadas com marcadores de massa.

Os fragmentos de pcr purificados foram clonados, com o vetor de clonagem PGEM-T, foram colocados em um tubo 150 ng DNA, 50ng do vetor PGEM-T, 5µl de tampão e 1µl de T4 DNA ligase, esta reação foi incubada a temperatura ambiente por 2h e para maximizar resultado foi deixada overnight na geladeira. quantificamos uma alíquota da reação de clonagem para verificar sua eficácia. confirmando assim a geração da molécula de DNA recombinante.

após a geração da molécula DNA recombinante ela foi dialisada, foram retirados 5µl da amostra e homogeneizado com 50µl de bactérias esterilizada

coli, realizamos o procedimento de eletroporação, Após eletroporação, as células foram recuperadas em meio LB líquido e incubadas durante 1 h a 37 ° C. Posteriormente, as células serão plaqueadas em placas de petri contendo meio LB sólido suplementado com ampicilina. após o plaqueamento, cada placa um número superior a 400 colônias.

e demos início a construção da nossa biblioteca de clones de RNA 16S obtendo até o momento 1.200 mutantes que estão congelados esperando para serem sequenciados.

E também o isolamento das bactérias com atividade celulolítica está sendo realizado em meio complexo a partir de extratos de compostagem meio CMC. O inóculo está sendo preparado a partir de uma diluição decimal em série de compostagem em solução salina 0,85% esteril. De cada diluição, 0,1 mL está sendo estriado através da técnica de spread plate. As placas foram incubadas por 2-4 dias a 27°. As colônias estão sendo então replicadas em LB e incubadas em estufa por 2-4 dias a 27 °. E finalmente mantidas em LB com glicerol a temperatura de -80°C.

Conclusões

Em breve pretendemos iniciar os estudos de biodiversidade dos solos analisados, através da aplicação de técnica de sequenciamento de DNA, nos clones obtidos na biblioteca genômica de rRNA 16S, bem como realizaremos seleção de mutantes da biblioteca de cosmídeos em construção, através da detecção de atividade celulolítica, exibida por mutantes cultivados em meio de cultura suplementado com carboximetilcelulose, corados com o corante vermelho congo.

Agradecimentos

Agradecemos as agência de fomento, a Petrobrás, o PFRH e a Faperj.

¹Chang L., Ding M., Bao L., Chen Y., Zhou., & Lu H., characterization of bifunctional xylanase/endoglucanase from yak rumen microorganisms Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010 ; 90(6): 1933-1942

²Elkins J. G., Raman B. & Keller M. Engineered Microbial Systems for enhanced conversion of lignocellulosic biomass. Curr Opin. Biotechnol., 2010; 21 (5): 657-662