

Isolamento, clonagem e expressão de genes codificantes de lipases de fungos isolados de amostras ambientais



Uirajá C. M. Ruschoni^{1,2}; Bruna G. Loeser^{1,3}; Débora Vom Endt^{1,4}; Ana L. Kern^{1,5};

¹ Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS), Unidade Novo Hamburgo, Av. Inconfidentes, 395 – Bairro Primavera, Novo Hamburgo, RS; ² Bolsista FAPERGS; ³ Bolsista CNPq; ⁴ Co-orientador; ⁵ Orientador

INTRODUÇÃO

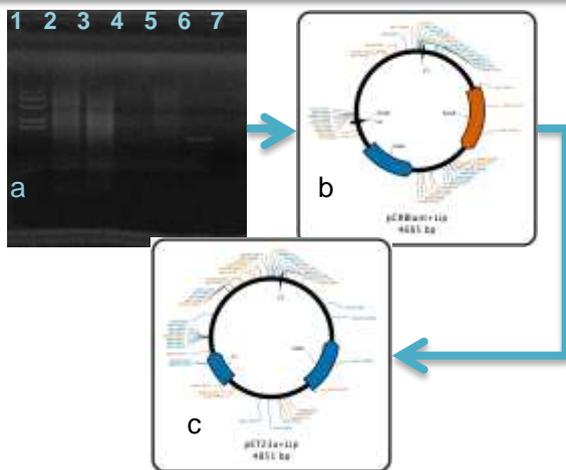
O Biodiesel tem surgido como uma alternativa sustentável e ambientalmente correta ao diesel de petróleo. Para a utilização de óleos vegetais para obtenção desse combustível recorre-se a transesterificação que pode empregar catalisadores alcalinos, ácidos ou enzimáticos. O emprego da catálise enzimática implica em vantagens como: menor gasto energético com temperatura, o subproduto glicerol pode ser facilmente recuperado e não geração rejeito aquoso alcalino.² Nesse contexto o presente estudo tem como objetivo isolar, amplificar e expressar o gene da lipase de fungos isolados de amostras ambientais.

METODOLOGIA

O gene da lipase do isolado 6156 foi amplificado por PCR, clonado em vetor pCR®-Blunt, e será subclonado em vetor pET-23a™. A superexpressão será realizada em linhagem de *Escherichia coli* BL-21. Os primers utilizados foram construídos a partir das regiões 5' e 3' conservadas de genes de lipase de espécies de *Rhizopus sp.* Os testes de atividade enzimática serão realizados utilizando para-nitrofenil palmitato (p-NPP) como substrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação do gene da lipase dos isolados 6156 e 5884 foram efetivas em 15 mM e 25 mM de MgCl₂, respectivamente. As cepas de leveduras (OFF2, OFF3, OFF-6), o isolado 6150 e a cepa filamentosa E1 não tiveram amplificação provavelmente por falta de anelamento dos primers.



Fonte a: Ruschoni, Loeser (2014)

Fonte b/c: Software PlasmaDNA®, disponibilizado pela Universidade de Helsinki

Legenda: Canaleta 01: 1Kb DNA Plus; Canaleta 02: 50mM MgCl₂; Canaleta 03: 45mM MgCl₂; Canaleta 04: 30mM MgCl₂; Canaleta 05: 25mM MgCl₂; Canaleta 06: 15mM MgCl₂; Canaleta 07: controle negativo.

A curva padrão do teste enzimático foi realizada, porém apresentou valores de R baixos nos ajustes, não sendo representativa.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Amplificação genes de lipases de outras fontes, realização das subclonagens pretendidas e estudo sobre a expressão em sistema heterólogo são procedimentos em andamento dentro do grupo.

Existe a pretensão de otimizar a curva padrão do teste com p-NPP e realizar expressão em *Pichia pastoris*.

REFERÊNCIAS

- MOURA, B.S.. **Transesterificação alcalina de óleos vegetais para produção de biodiesel**: Avaliação Técnica e Econômica. 2010. 166f. Dissertação (mestrado) – Curso de Pós graduação em Engenharia Química, Departamento de engenharia química, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal rural d Rio de Janeiro. Seropédica, 2010.
- GERPEN, J. V. et. al. **Biodiesel Production Technology**: August 2002 – January 2004, Colorado: NREL, 2004.
- UNIVERSITY OF HELSINKI. **Plasma DNA**: A free, cross-platform PLASmid MAnipulation program.2006.

AGRADECIMENTOS:

