

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 13/12/2017.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AMINOPEPTIDASE DE *Mesorhizobium* sp. DESCOBERTA
POR MINERAÇÃO DE DADOS GENÔMICOS COM
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E SEU IMPACTO NA
FISIOLOGIA BACTERIANA**

Elwi Guillermo Machado Sierra

Microbiologista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AMINOPEPTIDASE DE *Mesorhizobium sp.* DESCOBERTA
POR MINERAÇÃO DE DADOS GENÔMICOS COM
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E SEU IMPACTO NA
FISIOLOGIA BACTERIANA**

Elwi Guillermo Machado Sierra

Orientadora: Prof^a. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Agropecuária.**

2016

M149a Machado, Elwi Guillermo Sierra
Aminopeptidase de *Mesorhizobium* sp. descoberta por mineração de dados genômicos com aplicações biotecnológicas e seu impacto na fisiologia bacteriana / Elwi Machado Sierra. -- Jaboticabal, 2016
xii, 100 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Banca examinadora: Maria Celia Bertolini, Eleni Gomes, Mariana Carina Frigieri, Marcos Tulio Oliveira
Bibliografia

1. Expressão genica. 2. Dados genômicos. 3. Prospecção-enzimas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.847

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ELWI GUILLERMO MACHADO SIERRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS.

Aos 13 dias do mês de junho do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) IPEBEN (Sala de Reuniões), reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS - Orientador(a) do(a) Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal, Profa. Dra. MARIA CELIA BERTOLINI do(a) Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química / UNESP/ Araraquara. sp, Profa. Dra. ELENI GOMES do(a) Departamento de Biologia / UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto, SP, Profa. Dra. MARIANA CARINA FRIGIERI do(a) Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP, Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA do(a) Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de ELWI GUILLERMO MACHADO SIERRA, intitulada **AMINOPEPTIDASE DE *Mesorhizobium* sp. DESCOBERTA POR MINERAÇÃO DE DADOS GENÔMICOS COM APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E SEU IMPACTO NA FISIOLOGIA BACTERIANA.** Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Profa. Dra. MARIA CELIA BERTOLINI

Profa. Dra. ELENI GOMES

Profa. Dra. MARIANA CARINA FRIGIERI

Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Elwi Guillermo Machado Sierra – Nascido em 12 de Agosto de 1980 em Barquisimeto, Venezuela. Iniciou sua graduação em Microbiologia em Fevereiro de 1999 na Universidad Libre de Barranquilla na cidade de Barranquilla, Colômbia, concluindo seu curso em Junho de 2004. Em Março de 2007 ingressou no curso de Pós-graduação em Biotecnologia de Micro-organismos na Faculdade de Ciências - Universidad dos Andes (ULA), em Mérida, Venezuela, obtendo o título de Mestre em Biotecnologia de Micro-organismos. Em agosto de 2012 ingressou no curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, sob a orientação da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, como bolsista Capes.

“O saber não nos torna melhores nem mais felizes.”

Mas a educação pode ajudar a nos tornarmos melhores, se não mais felizes, e nos ensinar a assumir a parte prosaica e viver a parte poética de nossas vidas

Edgar Morin

DEDICATÓRIA

Esta meta lograda con esfuerzo y sacrificio, pero con el objetivo siempre en mente se lo dedico a:

Las hermanitas Sierra – El destino me premio no con una, sino con cinco madres, no le puedo pedir más nada a la vida

Familias Díaz y Aranguren – gracias por tratarme como un hijo más, y sobre todo por hacer de Yani esa increíble mujer

Las familias Orozco Sierra y Sierra Fontalvo

Daniela Rodríguez – Es difícil ver como creces y darme cuenta que no eres una bebe Fuani, Olaya, Delfina -

Mi ermanita la gran H (Marcela) – Tu valentía siempre me ha motivado e inspirado.

Mi Madre, Elina – Tu apoyo incondicional cada vez me sorprende más.

Mi Padre, Willian – aunque de joven nunca lo entendí, ahora me queda muy claro porqué siempre me presionaste por ir cada vez más lejos.

La persona más importante, Yani – te dedico no solo este logro, sino todos los alcanzados en los últimos 9 años y los próximos 99.

AGRADECIMENTOS

Á **Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**, pela orientação e oportunidade de realizar um sonho que tenho esperando quase 30 anos;

Ao **Programa de Pós – Graduação em Microbiologia Agropecuária** e a **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – FCAV-UNESP**;

A **CAPES** pela bolsa concedida;

Ao **João Carlos Campanharo, Camila Cesario e Luciano Kishi**, pela assistência e ensinamentos transmitidos;

Á minhas companheiras de bancada e amigas para a vida toda, as Doutoradas: **Elisângela Gomes, Thaís Maester, Mariana Pereira, Rosmeriana Garcia e Erica Lopes**, obrigado por compartilhar um pouquinho de suas vidas.

A todos da equipe **LBMP**, que no início deste caminho não foi fácil, mas com o tempo vocês viraram minha família.

A **Fernando e Wilmar**, Colombia (el país), nos espera con los brazos abiertos.

A **Cris, Sonia e Augusto**, minha família em Brasil.

Á **Dra. Yani Cristina Aranguren Díaz**, no tengo las palabras para agradecerle todo lo que has hecho por mí, toda la vida estaré eternamente agradecido...TE AMO.

Esta es una forma sencilla, pero que siempre les recordara lo mucho que estoy agradecido con ustedes.....**Gracias Totales**

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	ix
LISTA DE UNIDADES.....	x
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Mesorhizobium sp.	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Aplicações biotecnológicas.....	3
2.2 Peptidases	5
2.2.1 Generalidades e classificação	5
2.2.2 Sistema proteolítico nas bactérias	6
2.2.3 Classificação das peptidases.....	7
2.2.4 Aplicação industrial das peptidases	11
2.2.5 Inibidores de proteases	12
2.3 Aminopeptidases.....	13
2.3.1 Generalidades	13
2.3.2 Aplicações industriais	13
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Sequenciamento do genoma do isolado	16
4.1.1 Construção das bibliotecas.....	16
4.1.2 Análise das Sequências e Anotação genômica	16
4.2 Prospecção de genes de interesse biotecnológico no genoma do <i>Mesorhizobium</i> sp J5.	17
4.3 Mineração de dados na literatura científica	17
4.4 Análise das sequências.....	18
4.5 Modelagem molecular	18
4.6 Amplificação dos genes codificadores de enzimas proteolíticas	19
4.6.1 Quantificação e análise do DNA	20

4.6.2	Digestão dos fragmentos amplificados	21
4.6.3	Ligação dos fragmentos ao vetor de expressão.....	21
4.6.4	Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	22
4.6.5	Transformação de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	22
4.6.6	Coleta, estoque dos clones e confirmação da clonagem.	23
4.7	Sequenciamento das ORFs	23
4.8	Expressão e extração das proteínas recombinantes	24
4.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	25
4.10	Purificação de enzimas proteolíticas	26
4.10.1	Purificação por cromatografia de afinidade.....	26
4.10.2	Purificação por exclusão molecular	26
4.11	Zimograma.....	26
4.12	Ensaio espectroscópicos.....	27
4.12.1	Dicroísmo circular.....	27
4.12.2	Termostabilidade da estrutura secundária.....	27
4.13	Determinação da atividade enzimática.....	27
4.14	Efeito do pH sobre a atividade da enzima	29
4.15	Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	29
4.16	Influência de íons metálicos, inibidores e detergentes sobre a atividade enzimática	29
4.17	Determinação dos parâmetros cinéticos	30
4.18	Construção do mutante Δ mesoamp	30
4.18.1	Preparação de células competentes de <i>Mesorhizobium sp.</i> J5	30
4.18.2	Construção do vetor suicida pNPTS138 Δ mesoamp	31
4.18.3	Eletroporação de <i>Mesorhizobium sp.</i> J5.....	31
4.18.4	Seleção dos clones positivos.....	32
4.19	Caracterização fenotípica da linhagem Δ mesoamp.....	34
4.19.1	Curva de crescimento <i>in vitro</i> de <i>Mesorhizobium sp.</i> J5 vs linhagem Δ mesoamp	34
4.19.2	Produção de exopolissacarídeos (EPS)	35
4.19.3	Tolerância ao estresse salino	35
4.19.4	Cinética de lise	36
4.19.5	Termotolerância	36
4.19.6	Produção de biofilme.....	36

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Predição de peptidase em <i>Mesorhizobium sp.</i> J5	38
5.1.1 Degradação inicial de proteínas extracelulares.....	38
5.1.2 Maquinaria de degradação de proteínas intracelulares.....	39
5.1.3 Manutenção do pool de aminoácidos	39
5.2 Peptidases com potencial biotecnológico no genoma do <i>Mesorhizobium sp.</i> J5	41
5.3 Clonagem das sequências e expressão das enzimas proteolíticas	41
5.3.1 Amplificação e clonagem dos genes no vetor pET28a.....	41
5.3.2 Ensaio de expressão e extração das proteínas recombinantes	45
5.4 Análise da sequência da MesoAmp	47
5.5 A estrutura dimérica da MesoAmp possui elevado grau de conservação....	51
5.6 Expressão e avaliação da estrutura quaternária da MesoAmp.....	54
5.7 MesoAmp apresenta atividade numa extensa faixa de pH e temperatura ...	56
5.8 MesoAmp é uma enzima altamente dependente de íons metálicos	57
5.9 Análise de dicroísmo circular e termoestabilidade.....	60
5.10 Efeito de reagentes desnaturantes e inibidores na atividade da MesoAmp .	61
5.11 MesoAmp mantém sua atividade na presença de altas concentrações de sal, detergentes e solventes orgânicos.....	62
5.12 MesoAmp foi imobilizada e reutilizada com sucesso	68
5.13 Impacto da MesoAmp sobre a fisiologia do <i>Mesorhizobium sp</i> J5.....	68
5.14 Halo-tolerância de <i>Mesorhizobium sp</i> J5 e da linhagem Δ mesoamp.....	75
5.15 Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	77
5.16 Produção de biofilme	77
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS	81
8. ANEXOS	91

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. As peptidases e seus mecanismos de ação.....	8
Tabela 2. Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores de síntese utilizados para amplificação dos genes codificadores de peptidases.	20
Tabela 3. Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para gerar a mutação do gene mesoamp.	31
Tabela 4. Peptidases com potencial biotecnológico no genoma de Mesorhizobium sp. J5.....	43
Tabela 5. Características das proteínas selecionadas obtidas a partir de ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/).....	45
Tabela 6. Efeito dos diferentes cátions bivalentes sobre a atividade da MesoAmp..	59
Tabela 7. Valores de Km e Kcat de amino-peptidases ou leucina-amino-peptidases presentes em outros micro-organismos.	60
Tabela 8. Efeito de inibidores e agentes desnaturantes sobre a atividade da MesoAmp*	64
Tabela 9. Efeito dos detergentes na atividade da MesoAmp*.....	66
Tabela 10. Estudos relacionados com a amino-peptidase M29 e seu impacto na fisiologia bacteriana.	70

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Mecanismo catalítico das peptidases. As enzimas proteolíticas reconhecem as ligações peptídicas (entre o grupo amino de um aminoácidos e o grupo carboxila do outro aminoácidos) das proteínas, realizando um ataque nucleofílico com ajuda de uma molécula de água.	6
Figura 2. Mecanismo de hidrólise das principais famílias de Peptidases. Nos sítios ativos da Serina (nas Serina-peptidases) e Cistina (nas Cistina-peptidases) interagem com um grupo aceptor de prótons para promover o ataque nucleofílico sobre a ligação peptídica. As Aspartato-peptidases, Metallo-peptidases e Treonina-peptidases precisam de uma molécula de água para realizar o ataque nucleofílico. O processo geral de excisão da ligação peptídica é o mesmo para todas as proteases. a) Serina-peptidases, b) Cisteína-peptidases, c) Aspartato-peptidase, d) Metallo-peptidases e e) Treonina-peptidase.	9
Figura 3. Mapa do vetor pET-28a. A. Vetor usado para a expressão das ORFs codificadoras de enzimas proteolíticas; B. Região de clonagem e expressão do vetor pET28.	22
Figura 4. Esquema da reação de hidrólise da L-Leucina-p-nitroanilida por enzimas proteolíticas.	28
Figura 5. Esquema da PCR overlapping para a construção da versão deletada do gene mesoamp. As letras A, B, C e D indicam a posição dos oligonucleotídeos iniciadores no genoma de Mesorhizobium sp. J5.	32
Figura 6. Mapa do vetor pNPTS138 usado na mutação sítio dirigida.	33
Figura 7. Evento de deleção do gene mesoamp usando o vetor suicida pNPTS138 Δ mesoamp.	34
Figura 8. Modelo do sistema proteolítico de Mesorhizobium sp J5, baseada na mineração dos dados genômicos. As peptidases descritas em vermelho apresentam atividade de amino-peptidase.	40
Figura 9. Eletroforograma dos fragmentos gênicos de interesse, em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo. A. Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (Fermentas). Canaletas (1,2,3) Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (Fermentas); Eletroforograma das ORFs 3, 6, 8 e 9 – A seta vermelha sinaliza a temperatura escolhida para as futuras amplificações. Triângulos cinzas na parte superior sinalizam o gradiente de temperatura usada na PCR.	44
Figura 10. Eletroforograma do DNA plasmidial extraído de alguns clones para confirmar a clonagem da construção pET28-mesoamp. A. Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (fermentas). Canaletas: 1-10 Amplificação por PCR dos clones com a construção pET28-mesoamp; canaleta J5: Amplificação por PCR do DNA genômico de Mesorhizobium sp. J5.	45
Figura 11. Eletroforograma em gel de poliacrilamida 12% com SDS (SDS-Page) do extrato celular total da bactérias E. coli BL21 transformada como pET28-mesoamp. Canaletas: (1) Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained	

BioRad), (2) extrato celular (EC) sem indução, (3) EC após 4 h de indução com 0,1 mM de IPTG, (4) EC após 6 h de indução, (5) EC após 12 h de indução, (6) EC após 24 h de indução. A seta da direita (◄) sinaliza a banda de proteína sobre-expressa (MesoAmp) com um tamanho molecular compatível com MesoAmp.47

Figura 12. Dendrograma das relações filogenéticas entre as peptidases da família M29 e MesoAmp (seta preta). Construído com o algoritmo de máxima verossimilhança, com bootstrap de 1000 e usado a matriz de substituição de aminoácidos LG (LE; GASCUEL, 2008).48

Figura 13. Estrutura cristalográfica resolvidas experimentalmente usadas para a construção do modelo tridimensional de MesoAmp. Os códigos acima de modelo indicam o código PDB. PDB1ZJC: modelo de *Staphylococcus aureus*, PDB4ICQ: *Streptococcus thermophilus* e PDB2AYI: *Thermus thermophilus*.49

Figura 14. Alinhamento multiplex de sequências sinalizando as regiões conservadas de MesoAmp presentes também nos membros mais representativos da família de amino-peptidase M29. O alinhamento de sequências de aminoácidos de MesoAmp e amino-peptidase T de *Thermus thermophilus* (MER001285), amino-peptidase II de *Geobacillus stearothermophilus* (MER001287), amino-peptidase S de *Streptococcus thermophilus* (MER005731), e amino-peptidase S de *Staphylococcus aureus* (MER014416), usando ClustalX e exibidos com Esript 3 (<http://esript.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>). A estrutura secundária prevista de MesoAmp é mostrada na parte superior, com as espirais indicando a hélice α , e as setas indicando folha β . A barra colorida na parte inferior do alinhamento representa a escala de conservação [não-conservados (azul), para estados altamente conservados (roxo)] para cada um dos aminoácidos de MesoAmp, de acordo com a análise do servidor ConSurf. Os motivos conservados que fornecem uma assinatura para metaloproteases termofílicas se apresentam em caixas cinzas. Os resíduos de ligação a metais estão indicados por um círculo (●), e os resíduos catalíticos são indicados por um triângulo (▲).50

Figura 15. Configuração do sítio ativo de MesoAmp. Resíduos catalíticos (Tyr361), de ligação a metais (Glu259, Glu325, His354, His387), interagindo com o substrato. Os números pequenos indicam a distância em Å das pontes de hidrogênio.51

Figura 16. Análise do gráfico Ramachandran de MesoAmp. Os resíduos de Isoleucina 12 e Asparagina 104 e 127 estão em regiões não permitidas.52

Figura 17. Características estruturais do modelo MesoAmp. **A.** Sobreposição das estruturas tridimensionais de MesoAmp (azul) e AmpS de *Staphylococcus aureus* desvio quadrático médio (RMSD), **B.** Sobreposição do resíduo catalítico (Tyr 361) e os resíduos de ligação a metais Glu259, Glu325, His354, His387 e Asp389, com os resíduos na estrutura de contrapartida AmpS, as esferas pretas representam os íons de cobalto, **C.** Representação do sítio catalítico do MesoAmp (S1) e da cavidade de ligação ao substrato (S2).52

Figura 18. Super expressão e purificação de MesoAmp em sua forma ativa. **A.** Eletroforograma SDS-PAGE para cada etapa de purificação de MesoAmp. Canaletas: (1) Marcador de peso molecular, (2) Fração solúvel antes da indução, (3) Fração solúvel após indução com IPTG, (4) Proteínas não ligadas na resina de Ni-NTA, (5) MesoAmp eluída com 500 mM de imidazol, (6) MesoAmp purificada após

cromatografia de filtração em gel. A seta na direita indicam o peso molecular da MesoAmp. **B.** Perfil de eluição de MesoAmp por filtração em gel utilizando Superdex-200. Linha preta (—) corresponde ao mAu medida a 280 nm; Barra cinza: atividade relativa em porcentagem de MesoAmp. Pico 1 corresponde à agregação de oligômeros de MesoAmp com baixa atividade. Pico 2: frações com alta atividade enzimática. Caixa superior esquerda: análise do peso molecular da MesoAmp nativa com proteínas padrões [Tiroglobulina bovina (670 kDa), γ -globulina (150 kDa), albumina (43 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa) e Ácido p-amino benzoico (pABA) (0,13 kDa)] usando a análises de regressão lineal para a determinação do tamanho molecular dos oligômeros (1) e dos homodímeros (2). Caixa superior direita: análise de SDS-PAGE das frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel. Canaletas: (1) Marcador de peso molecular, (2-4) Pico 1, (5-10) Pico 2. 55

Figura 19. Análise físico-químico da MesoAmp. **A.** O efeito do pH sobre a atividade enzimática usando diferentes tampões: Mcllvaine ($\blacktriangle$); Citrato de sódio (Δ); Fosfato de sódio ($\blacklozenge$); Tris-HCl ($\bullet$); Bicarbonato de sódio-hidróxido ($\blacktriangledown$); Glicina-hidróxido de sódio ($\diamond$); Fosfato monossódico-hidróxido de sódio ($\circ$). **B.** Efeito da temperatura sobre a atividade da MesoAmp determinada com 100 mM de tampão Bicarbonato de sódio-hidróxido (pH 8,5). As letras minúsculas na parte superior dos valores (a-k) indicam a diferença significativa entre cada condição testada, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tabela inferior: faixa de pH e os diferentes tampões testados para a determinação do pH ótimo. 58

Figura 20. Análise espectroscópica e de desnaturação térmica de MesoAmp. **A.** O espectro de dicroísmo circular em tampão 100 mM de Bicarbonato de sódio-hidróxido (pH 8,5). **B.** Perfil de desnaturação térmica da estrutura secundária de MesoAmp. As alterações na elipticidade a 222 nm foram representadas graficamente como uma função da temperatura a pH 8,5. A intercepção das linhas pontilhadas indica a temperatura de fusão (T_m) estimada pelo ajuste dos dados utilizando a função sigmoide. 61

Figura 21. Termoestabilidade de MesoAmp usando Leu-p-NA como substrato. A enzima foi incubada a diferentes temperaturas (45 a 80°C) por em intervalos de tempo. 61

Figura 22. Modelo tridimensional de MesoAmp. **A.** MesoAmp, Esferas amarelas indicam a posição das cisteínas no modelo. **B.** Cisteínas (C353, C360, C364) localizadas próximas ao resíduo catalítico de tirosina (Y316). Os números sinalizam a distância (em Å) entre os átomos de enxofre presentes na proteína. **C.** Estrutura tridimensional de PepS (PDB4ICQ). Esferas amarelas indicam a posição das cisteínas na estrutura. 65

Figura 23. Efeito de solventes orgânicos (a diferentes concentrações) na atividade da MesoAmp. 67

Figura 24. Estabilidade operacional de MesoAmp imobilizada. A atividade enzimática em cada ciclo foi realizada com Tris-HCl pH 8,0; 2 mM de Cobalto e 2 mM de Leu-p-NA e 40 °C, durante 15 min ou até atingir o estado estacionário. 68

Figura 25. Diagrama de Venn do sistema proteolítico de *S. aureus* (*Staphylococcus aureus* USAD300); *S. thermophilus* (*Streptococcus thermophilus* CNR21066); *L. monocitogenes* (*Listeria monocytogenes* EGD-e) e *Mesorhizobium* sp J5. Números

embaixo de cada nome indicam a quantidade de peptidases presentes em cada micro-organismo. As peças sobrepostas de diferentes elipses representam o número de peptidases em comum desses grupos em comparação.	71
Figura 26. Eletroforograma para confirmar a mutação no gene mesoamp. 1: Produto de PCR com os oligonucleotídeos A+B; 2: Produto de PCR com os oligonucleotídeos C+D; 3: Produto de PCR de superposição com os oligonucleotídeos A+D; 4: PCR do plasmídeo pNPTS138 Δ mesoamp; 5: PCR do DNA genômico de <i>Mesorhizobium</i> sp. J5, usando os oligonucleotídeos A+D; 6 e 7: PCR do DNA genômico da linhagem Δ mesoamp (dois mutantes), usando os oligonucleotídeos A+D; M: Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (Fermentas)	72
Figura 27. Atividade de leucina amino-peptidase global do <i>Mesorhizobium</i> sp. J5 e da linhagem Δ mesoamp. A atividade amino-peptidase foi normalizada usando a mesma concentração de proteína total (1 mg/ml).	73
Figura 28. Crescimento do <i>Mesorhizobium</i> sp. J5 e da linhagem Δ mesoamp em meio líquido TY. O ensaio foi realizado em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão.	74
Figura 29. Efeito do estresse salino no desenvolvimento do <i>Mesorhizobium</i> sp J5 e da linhagem Δ mesoamp.	76
Figura 30. Análises dos componentes principais (PCA) dos transportadores ABC de aminoácidos e aminopeptidases M29. Foi possível observar que bactérias que não possuem a enzima aminopeptidase M29 apresentaram uma tendência a possuir uma maior quantidade de transportadores ABC de aminoácidos. Seta vermelha sinaliza a M29.	76
Figura 31. Produção do exopolissacarídeos (EPS) do <i>Mesorhizobium</i> J5 e do linhagem Δ mesoamp. As características reológicas do EPS (viscosidade), foram modificadas pela deleção do gene mesoamp.	77
Figura 32. Produção de biofilme. A. teste in vitro da produção de biofilme por <i>Mesorhizobium</i> sp. J5. (M. sp J5) e o mutante com a deleção no gene mesoamp (Δ mesoamp). B. Porcentagem da produção de biofilme. Os dados de absorbância foram normalizados e tratados usando a equação 3.	78

ABREVIATURAS

Abs- Absorbância

DO_{600nm} – Absorbância medida a 600 nanômetros de comprimento de onda

aa- Aminoácidos

DNA- ácido desoxirribonucleico

dNTP- desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

Xgal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

DMF - N,N'dimethyl-formamida

p/v – peso por volume

TEB- solução tampão Tris-ácido bórico- EDTA

Tris- tris[hidroximetil]aminometano

UV- luz ultravioleta

v/v- volume por volume

BLAST – *Basic Local Alignment Sequence Tool*

E.C. – *Enzyme Commission*

GenBank – banco de sequências de genes e proteínas do *NCBI*

Kb – mil pares de bases

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ORF – *Open Reading Frame* (Fase de leitura aberta codificadora de proteína)

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

MEROPS – Base de dados curadas para peptidases

pH – potencial hidrogeniônico $\log [H^+]$

pI – ponto isoelétrico

r.p.m. – rotações por minuto

SAP – *Shrimp Alkaline Phosphatase*

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

IUBMB - (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)

LISTA DE UNIDADES

g – aceleração da gravidade

g – grama

L – litro

g^{-L} – gramas por litro

kb – kilobase

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

ng – nanogramas

pb – pares de bases

U – unidades

V - volt

kDa - Quilo Daltons

h – horas

s – segundos

min – minutos

AMINOPEPTIDASE DE *Mesorhizobium* sp. DESCOBERTA POR MINERAÇÃO DE DADOS GENÔMICOS COM APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E SEU IMPACTO NA FISIOLÓGIA BACTERIANA

RESUMO - A análise de mineração de dados genômicos de *Mesorhizobium* sp. revelou a presença de uma ORF de 1257pb contendo o gene *mesoamp*, que codifica uma proteína de 418 aminoácidos. A sequência de aminoácidos deduzida apresenta 50% de identidade com uma amino-peptidase termoestável de *Thermus thermophilus*, membro da família de peptidase M29, e oito assinaturas características das metalo-protease termofílicas foram encontrados. O gene *mesoamp* foi clonado e expresso em *Escherichia coli*. A massa molecular da proteína foi avaliada por SDS-PAGE e filtração em gel, o que indicou que a proteína apresenta 45,72kDa e 88,05kDa, respectivamente, sugerindo uma estrutura dimérica da enzima recombinante. A enzima foi nomeada como MesoAmp. Em seguida realizou-se a modelagem 3D estrutural, que mostrou uma região de dimerização e uma região de ligação ao substrato altamente conservada contendo os resíduos de ligação a metais e o resíduo catalítico. A enzima apresentou atividade ótima em pH 8,5 e temperatura de 45°C, foi fortemente ativada por Co^{2+} e Mn^{2+} , nestas mesmas condições de reação, a enzima apresentou K_m e K_{cat} de $0,2364 \pm 0,018 \text{mM}$ e $712,1 \pm 88,12 \text{seg}^{-1}$, respectivamente. Além disso, foi verificado uma notável estabilidade da enzima em solventes orgânicos e elevadas concentrações de NaCl, além de um alto grau de reutilização sem perda apreciável de atividade o que torna MesoAmp única, este trabalho estabelece as bases para potenciais aplicações biotecnológicas e/ou o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, além de descrever uma das primeiras aminopeptidases solúvel e halo-tolerantes identificados para o gênero *Mesorhizobium* sp.

Palavras-chave: Expressão genica, Dados genômicos, Prospecção-enzimas

AMINOPEPTIDASE FROM A *Mesorhizobium* sp. DISCOVERED BY GENOMIC DATA MINING WITH POTENTIAL BIOTECHNOLOGY APPLICATION AND ITS IMPACT ON BACTERIAL PHYSIOLOGY

ABSTRACT - The genomic data mining analysis of a *Mesorhizobium* sp. revealed the presence of a 1257-bp open reading frame containing the *Mesoamp* gene, which encodes a protein of 418 amino acids. The deduced amino acid sequence was 50% identical to the thermostable amino-peptidase from *Thermus thermophilus*, a member of peptidase family M29, and eight fingerprints signatures for a thermophilic metalloprotease were found. The *mesoamp* gene was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*. The molecular mass of the protein was assessed by SDS-PAGE and gel filtration, which indicated the protein weighs 45.72kDa and 88.05kDa, respectively, suggesting a dimeric structure of the recombinant enzyme. The enzyme was designated as MesoAmp. The 3D structural modeling showed a dimerization region with highly conserved catalytic and binding metal residues. The enzyme exhibited optimum activity at pH 8.5 and 45°C and was strongly activated by Co^{2+} and Mn^{2+} . Under these reaction conditions, the enzyme displayed K_m and K_{cat} values of $0.2364 \pm 0.018 \text{ mM}$ and $712.1 \pm 88.12 \text{ seg}^{-1}$, respectively. Additionally, the remarkable stability of the enzyme in organic solvents, its activity at high concentrations of NaCl and the high degree of reuse without appreciable loss of activity makes MesoAmp unique. In summary, this work lays the foundation for potential biotechnological applications and/or the development of environmentally friendly technologies and describes the first solvent and halo-tolerant amino-peptidases identified for the *Mesorhizobium* sp genus.

Keywords: Gene expression, Mining Data, enzyme prospection

1. INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente complexo e heterogêneo, considerado um extraordinário reservatório da diversidade bioquímica e genética microbiana, tornando-se uma fonte quase inesgotável de biomoléculas, como as enzimas. A busca por enzimas com aplicações industriais tem-se centrado em um número limitado de gêneros microbianos como *Bacillus* (MARUTHIAH et al., 2013), *Pseudomonas* (MEENA et al., 2013) e *Aspergillus* (KANG et al., 2014), deixando outros micro-organismos de interesse biotecnológico, como o *Mesorhizobium*, em um segundo plano.

O gênero *Mesorhizobium* é composto por 24 espécies distribuídas no mundo todo (WANG et al., 2014a) e caracteriza-se por ser geneticamente variável, apresentando características fisiológicas bem distintas entre as espécies. Esta riqueza genética e bioquímica tem sido pobremente estudada, já que 3467 sequências de peptidases conhecidas, putativas ou homólogas de *Mesorhizobium* encontram-se submetidas na base de dados de peptidases (MEROPS) (RAWLINGS et al., 2014), mas nenhuma foi caracterizada ou estudada até o momento. As peptidases são umas das enzimas mais usadas na indústria biotecnológica, atingindo um mercado de quase 8 bilhões de dólares (LI et al., 2012) e projetado para crescer mais nos próximos anos. Todo este crescimento pode ser alcançado por meio de novas abordagens, como a mineração de genes em dados genômicos (GDM) (ADRIO; DEMAINE, 2014; LUO, 2012). O GDM oferece uma oportunidade sem precedentes na área da biotecnologia, devido à abundância de dados pré-existentes e inexplorados, e usando como padrão sequências similares de enzimas conhecidas. Na atualidade esta metodologia está sendo usada na prospecção de enzimas como endoglucanases, lacases, nitrilases, redutases, xilanases e também de policetídeos sintases, as PKS (BACHMANN; VAN LANEN; BALTZ, 2014; GONG et al., 2013; HE et al., 2014), além de outras de grande valor industrial como as peptidases.

As peptidases (E.C. 3.4) são o tipo de enzima mais importante do ponto de vista industrial, capazes de hidrolisar ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos. Podem ser utilizadas em diversas atividades industriais, tais como processamento de bebidas, alimentos, processamento de couro e pele, indústrias têxteis, formulação de

detergentes, no amaciamento de carne e formulação de medicamentos. Os micro-organismos são a fonte mais empregada para a obtenção de proteases de uso industrial, obtidas através de processos fermentativos (RAO et al., 1998). As bactérias, fungos filamentosos e leveduras são pesquisados a fim de alcançar novos genes codificadores de proteases, além de aumentar a produtividade e a estabilidade enzimática daqueles que já são admitidos como micro-organismos proteolíticos.

Observando a versatilidade das proteases na indústria e a demanda pela descoberta de novas enzimas, este trabalho descreve a mineração de dados genômicos de *Mesorhizobium sp* J5, para a prospecção e análises de enzimas proteolíticas, visando sua aplicação em processos biotecnológicos.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível identificar quatro ORFs codificadoras de enzimas proteolíticas no genoma de *Mesorhizobium* sp J5 com possíveis aplicações biotecnológicas e, ainda, desenvolver a caracterização funcional e avaliar o impacto da enzima amino-peptidase da família M29 sobre o metabolismo desta bactéria. Os resultados obtidos com os ensaios experimentais empregados nos permitem concluir que:

- Os genes *mesoamp*, *mesoleu* e *mesocarx* foram corretamente clonados para expressão heteróloga em *E. coli*;
- A proteína recombinante MesoAmp, referente ao produto do gene *mesoamp*, foi expressa solúvel e ativa como homo-dímero em *E. coli*;
- A atividade leucil-aminopeptidolítica de MesoAmp é sensível ao SDS e β -mercaptoetanol e depende de sua forma dimérica para a atividade.
- A enzima MesoAmp possui atividade ótima em pH 8,5 e a 45°C, o que a caracteriza como termofílica;
- A MesoAmp é uma enzima altamente dependente de íons metálicos, principalmente Co^{2+} e Mn^{2+} .
- O padrão de inibição indica que a MesoAmp é uma metalo-peptidase;
- A desestabilização da estrutura terciária da MesoAmp em função da temperatura está bem correlacionada com a perda de sua atividade;
- A atividade da MesoAmp quase não foi alterada na presença dos solventes testados, sugerindo uma aplicação compatível com solventes orgânicos.
- A MesoAmp apresentou modelos estruturais da família das alfa/beta hidrolases, com uma região altamente conservada na cavidade catalítica da enzima.
- O estudo *in silico* da MesoAmp forneceu detalhes quanto a sua estrutura terciária; localização da tríade catalítica; da região de ligação ao substrato; da característica da cavidade interna e a localização da tríade
- Estudos preliminares revelaram que atividade de peptidase da MesoAmp, não está limitada a manter o *pool* de aminoácidos.

- O gene *mesoamp* apresenta pleiotrópismo além da codificação da enzima MesoAmp, como: tolerância ao estresse salino, modificações na estrutura de exopolissacarídeos e formação de biofilme.

7. REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 16 jan. 2014.
- AHN, S.-J.; YANG, C.-H.; COOKSEY, D. A. Pseudomonas putida 06909 genes expressed during colonization on mycelial surfaces and phenotypic characterization of mutants. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 1, p. 120–32, jul. 2007.
- ALLIEGRO, M. C. Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 282, n. 1, p. 102–106, 2000.
- ARUNACHALAM, C.; SARITHA, K. Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 12, p. 29–32, 2009.
- ASHKENAZY, H. et al. ConSurf 2010: Calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 529–533, 2010.
- BACHMANN, B. O.; VAN LANEN, S. G.; BALTZ, R. H. Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making? **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 175–184, 2014.
- BAILEY, S. et al. Agrobacterium tumefaciens VirB8 structure reveals potential protein-protein interaction sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2582–2587, 21 fev. 2006.
- BARRETT, A. J. [1] Enzyme Nomenclature In Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. In: BARRETT, A. J. (Ed.). **Methods in enzymology**. London: Academic Press, 1992. v. 244p. 1–15.
- BEENKEN, K. E.; BLEVINS, J. S.; SMELTZER, M. S. Mutation of sarA in Staphylococcus aureus Limits Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4206–4211, 1 jul. 2003.
- BERGGREN, M. et al. Efficient aquatic bacterial metabolism of dissolved low-molecular-weight compounds from terrestrial sources. **The ISME Journal**, v. 4, n. 3, p. 408–416, 12 mar. 2010.
- BERINGER, J. E. R factor transfer in Rhizobium leguminosarum. **Journal of general microbiology**, v. 84, n. 1, p. 188–98, set. 1974.
- BERTIN, P. B. et al. The thermophilic, homohexameric aminopeptidase of Borrelia burgdorferi is a member of the M29 family of metallopeptidases. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2253–2261, 2005.
- BRITTEN, R. J.; MCCLURE, F. T. The amino acid pool in Escherichia coli. **Bacteriological reviews**, v. 26, p. 292–335, 1962.
- CARROLL, R. K. et al. The Staphylococcus aureus leucine aminopeptidase is localized

to the bacterial cytosol and demonstrates a broad substrate range that extends beyond leucine. **Biological Chemistry**, v. 394, n. 6, p. 1199–1216, 1 jan. 2013.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. D. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, n. October, p. 191–197, 2014.

CASTELLANE, T. C. L.; OTOBONI, A. M. M. B.; LEMOS, E. G. DE M. Characterization of Exopolysaccharides Produced by *Rhizobia* Species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1566–1575, dez. 2015.

CHANG, A. et al. BRENDA in 2015: exciting developments in its 25th year of existence. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D439–46, 2015.

CHENG, C. et al. Aminopeptidase T of M29 Family Acts as A Novel Intracellular Virulence Factor for *Listeria monocytogenes* Infection - Material suplementar. **Scientific Reports**, v. 5, p. 17370, 2015.

CONSORTIUM, T. U. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D204–D212, 2015.

DAS, S. K. et al. Mutation in the *lysA* gene impairs the symbiotic properties of *Mesorhizobium ciceri*. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 1, p. 69–77, 2010.

DEANGELIS, P. L.; WHITE, C. L. Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from *Pasteurella multocida* type D. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7209–13, 1 mar. 2002.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.**, 2004.

DÍAZ-PÉREZ, A. L.; DÍAZ-PÉREZ, C.; CAMPOS-GARCÍA, J. Bacterial l-leucine catabolism as a source of secondary metabolites. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 15, p. 1–29, 2015.

DIOUF, F. et al. Genetic and Genomic Diversity Studies of *Acacia* Symbionts in Senegal Reveal New Species of *Mesorhizobium* with a Putative Geographical Pattern. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0117667, 6 fev. 2015.

DONG, L. et al. The leucyl aminopeptidase from *Helicobacter pylori* is an allosteric enzyme. **Microbiology**, v. 151, n. 6, p. 2017–2023, 2005.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 270–282, 2010.

EITINGER, T. et al. Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. 3–67, jan. 2011.

ETYORINI, E. S. et al. Purification and Characterization of Two Novel Halotolerant Extracellular proteases from *Bacillus subtilis* Strain FP-133. **Bioscience, biotechnology and biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 433–440, 2006.

EVERS, S.; COURVALIN, P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene

expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 5, p. 1302–9, mar. 1996.

FISER, A.; SALI, A.; ŠALI, A. MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. **Methods in Enzymology**, v. 374, p. 461–491, jan. 2003.

FONSECA, P.; MORENO, R.; ROJO, F. Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 3, p. 329–339, jun. 2011.

FREDERIKS, W. M.; MOOK, O. R. F. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 52, n. 6, p. 711–22, jun. 2004.

FREY, S. T. et al. Immobilization of the Aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* on Mg²⁺/Al³⁺ Layered Double Hydroxide Particles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 10, p. 2828–2832, 27 out. 2010.

GAUR, R. et al. Purification and characterization of a solvent stable aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*: Cloning and analysis of aminopeptidase gene conferring solvent stability. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 757–764, 2010.

GHOBAKHLOU, A.-F. et al. Microarray transcriptional profiling of Arctic *Mesorhizobium* strain N33 at low temperature provides insights into cold adaption strategies. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 383, dez. 2015.

GONG, J.-S. et al. Metagenomic technology and genome mining: emerging areas for exploring novel nitrilases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6603–6611, 2013.

GONZALES, T.; ROBERT-BAUDOUY, J. Bacterial aminopeptidases : Properties and functions. **FEMS microbiology Reviews**, v. 18, p. 319–344, 1996.

GUPTA, A.; KHARE, S. K. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1788–1793, out. 2006.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, jun. 2002.

HAN, S. H. et al. Multiple determinants influence root colonization and induction of induced systemic resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6. **Molecular plant pathology**, v. 7, n. 6, p. 463–72, nov. 2006.

HASSAN, A. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 305–311, 2011.

HE, Y.-C. et al. Biosynthesis of Ethyl (S)-4-Chloro-3-Hydroxybutanoate by NADH-

Dependent Reductase from *E. coli* CCZU-Y10 Discovered by Genome Data Mining Using Mannitol as Cosubstrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 8, p. 2042–2053, 2014.

HOLM, L. et al. Searching protein structure databases with DaliLite v.3. **Bioinformatics**, v. 24, n. 23, p. 2780–2781, 1 dez. 2008.

HOSHINO, T.; KOSE-TERAI, K.; URATANI, Y. Isolation of the *braZ* gene encoding the carrier for a novel branched-chain amino acid transport system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 6, p. 1855–61, mar. 1991.

HU, X.-P.; YANG, Y.; MA, B.-G. Amino Acid Flux from Metabolic Network Benefits Protein Translation: the Role of Resource Availability. **Scientific reports**, v. 5, n. January, p. 11113, 2015.

HUO, Y.-X. et al. Conversion of proteins into biofuels by engineering nitrogen flux. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 346–351, abr. 2011.

HUO, Y.-X. X.; WERNICK, D. G.; LIAO, J. C. Toward nitrogen neutral biofuel production. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 406–13, jun. 2012.

ISHIKAWA, K. et al. Novel Bifunctional Hyperthermostable Carboxypeptidase / Aminoacylase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 Novel Bifunctional Hyperthermostable Carboxypeptidase / Aminoacylase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 2, p. 673–679, 2001.

JAGER, G. J. DE. **Identifying stress-tolerance genes in hyperarid desert soils using functional metagenomics**. [s.l.] Pretoria, 2015.

JARVIS, B. D. W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 895–898, 1997.

JENAL, U.; HENGGE-ARONIS, R. Regulation by proteolysis in bacterial cells. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 163–172, 2003.

JOHNSON, S.; PELLECCIA, M. Structure- and fragment-based approaches to protease inhibition. **Current top Medical Chem**, v. 6, p. 317–329, 2006.

KANG, C. et al. Cloning and expression of a novel prolyl endopeptidase from *Aspergillus oryzae* and its application in beer stabilization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 263–272, 2014.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. **Critical reviews in microbiology**, v. 37, n. 3, p. 262–76, ago. 2011.

KELLY, S. J. **Requirement for Exopolysaccharide in the Mesorhizobium-Lotus Symbiosis**. [s.l.] University of Otago, Dunedin, 2012.

KIM, J. et al. Cloning and characterization of a novel β -transaminase from *Mesorhizobium* sp. strain LUK: A new biocatalyst for the synthesis of enantiomerically pure ??-amino acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1772–

1782, 2007.

KIRSTEIN, J. et al. Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 589–599, ago. 2009.

KONOVALOVA, A.; SØGAARD-ANDERSEN, L.; KROOS, L. Regulated proteolysis in bacterial development. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 3, p. 493–522, 2014.

KRICK, A. et al. A Marine Mesorhizobium sp. Produces Structurally Novel Long-Chain N-Acyl-L-Homoserine Lactones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 11, p. 3587–3594, 1 jun. 2007.

KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. W. Production optimization of an extracellular cold-active alkaline protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and its application in detergent industry. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 7, p. 809–816, 2011.

KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. W. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. **Critical reviews in microbiology**, v. 38, n. 4, p. 330–8, nov. 2012.

KUO, L. Y. et al. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* leucine aminopeptidase II by hydrogen peroxide and site-directed mutagenesis of methionine residues on the enzyme. **The protein journal**, v. 23, n. 4, p. 295–302, 2004.

KUO, L.-Y. et al. Overexpression, purification, and characterization of the recombinant leucine aminopeptidase II of *Bacillus stearothermophilus*. **Current microbiology**, v. 47, n. 1, p. 40–45, 2003.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, 15 ago. 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>>

LARANJO, M.; ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 2–17, jan. 2014.

LE, S. Q.; GASCUEL, O. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1307–1320, 3 abr. 2008.

LI, S. et al. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2012.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008.

LUO, X.-J. Genomic Data Mining: An Efficient Way to Find New and Better Enzymes. **Enzyme Engineering**, v. 01, n. 01, p. 1–4, 2012.

MADERN, D.; EBEL, C.; ZACCAI, G. Halophilic adaptation of enzymes. **Extremophiles**, v. 4, n. 2, p. 91–98, 14 abr. 2000.

MARUTHIAH, T. et al. Purification and characterization of moderately halophilic

alkaline serine protease from marine *Bacillus subtilis* AP-MSU 6. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 116–119, abr. 2013.

MAURER, K.-H. H. Detergent proteases. **Current opinion in biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 330–4, ago. 2004.

MCGUFFIN, L. J.; BUENAVISTA, M. T.; ROCHE, D. B. The ModFOLD4 server for the quality assessment of 3D protein models. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W368–W372, 1 jul. 2013.

MCNAMARA, J. C. et al. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (crustacea, decapoda) during long-term salinity acclimation. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 37, n. 3, p. 193–208, 2004.

MEASURES, J. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. **Nature**, v. 257, p. 398–400, 1975.

MEENA, P. et al. Utilization of agro-industrial waste (wheat bran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 210–216, jul. 2013.

MEGURO, H. et al. Putative role of cellosomal protease inhibitors in *Clostridium cellulovorans* based on gene expression and measurement of activities. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 19, p. 5527–30, out. 2011.

MENGES, D. A et al. Continuous assay of proteases using a microtiter plate fluorescence reader. **Analytical biochemistry**, v. 254, n. 1, p. 144–147, 1997.

MERHEB-DINI, C. et al. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9210–9217, 2009.

MILLER, K. J.; WOOD, J. M. Osmoadaptation by Rhizosphere bacteria. **Annual review of microbiology**, v. 50, p. 101–136, 1996.

MITCHELL, A. et al. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D213–D221, 28 jan. 2015.

MUGO, A. N. et al. Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase from *Mesorhizobium loti*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1834, n. 6, p. 953–63, 2013.

NANDAN, A.; NAMPOOTHIRI, K. M. Extracellular proline aminopeptidase production by *Streptomyces lavendulae* ATCC14162 under solid-state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 72, n. 9-10, p. 591–595, 2013.

NWODO, U. U.; GREEN, E.; OKOH, A. I. Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 14002–14015, 2012.

ODINTSOV, S. G. et al. Substrate access to the active sites in aminopeptidase T, a representative of a new metallopeptidase clan. **Journal of Molecular Biology**, v. 354, n. 2, p. 403–412, 2005a.

ODINTSOV, S. G. et al. Staphylococcus aureus aminopeptidase S is a founding member of a new peptidase clan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27792–27799, 2005b.

OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 252–63, 2013.

OLIVEIRA, S. H. P. et al. KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin. **BMC bioinformatics**, v. 15, p. 197, 2014.

ORTEGA, G. et al. Halophilic enzyme activation induced by salts. **Scientific reports**, v. 1, p. 6, 2011.

OVERBEEK, R. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D206–D214, 2014.

PERALTA-YAHYA, P. P. et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 320–8, 16 ago. 2012.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 29 set. 2011.

PLOTKA, M. et al. Novel Highly Thermostable Endolysin from *Thermus scotoductus* MAT2119 Bacteriophage Ph2119 with Amino Acid Sequence Similarity to Eukaryotic Peptidoglycan Recognition Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 886–895, 1 fev. 2014.

POLANIA, J.; MACCABE, A. **Industrial Enzymes**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. v. 254

PRASAD, M. P.; SETHI, R. Optimization of cellulase production from a novel bacterial isolate *Mesorhizobium* sp. from marine source. **Journal of Enzyme Research**, v. 4, n. 1, p. 39–45, 2013.

RAJASEKHAR, A. et al. Thermostable Bacterial Protease - A New Way for Quality Silk Production. **International Journal of Bioscience and biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 43–58, 2011.

RAJU, R. M.; GOLDBERG, A. L.; RUBIN, E. J. Bacterial proteolytic complexes as therapeutic targets. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 10, p. 777–89, 2012.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597–635, set. 1998.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 343–350, 2014.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 183–228, 1995.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. **Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine**

Peptidases. [s.l: s.n.]. v. 244

RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. (EDS.). **Handbook of Proteolytic Enzymes.** 3. ed. London: Academic Press, 2013. v. 8

RAY, A. Protease Enzyme- Potential Industrial Scope. **International Journal Technology**, v. 2, n. 1, p. 1–4, 2012.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 578–592, 2010.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 12 ago. 2003.

ROUF, S. M. A. et al. Propeptide processing and proteolytic activity of proenzymes of the staphylococcal and enterococcal GluV8-family protease. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 49, n. 6, p. 421–7, dez. 2012.

RUL, F. PepS Aminopeptidase. In: RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. (Eds.). . **Handbook of Proteolytic Enzymes.** Third ed. San Diego, CA: Academic Press publications - Elsevier, 2013. p. 1677–1678.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3. ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SAYEM, S. et al. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 74, 2011.

SCHAECHTER, M. et al. Proteases, Production. In: SCHAECHTER, E.-C. M. (Ed.). . **Applied Microbiology: Industrial In Encyclopedia of Microbiology.** 3. ed. Oxford: Academic Press, 2009. p. 495–511.

SCULLY, S. M. et al. Branched-chain alcohol formation by thermophilic bacteria within the genera of *Thermoanaerobacter* and *Caldanaerobacter*. **Extremophiles**, v. 19, n. 4, p. 809–818, 22 jul. 2015.

SHARMA, U. **Genetic basis of the activation of the cryptic dct genes in *Mesorhizobium loti*.** [s.l: s.n.].

SHEN, Y. et al. Biochemical properties and potential applications of recombinant leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 11, p. 7609–7625, 2011.

SILVER, R. P.; AARONSON, W.; VANN, W. F. The K1 capsular polysaccharide of *Escherichia coli*. **Reviews of infectious diseases**, v. 10 Suppl 2, p. S282–6, 1988.

SJÖDAHL, J. et al. Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*). **Protein expression and purification**, v. 26, n. 1, p. 153–61, out. 2002.

STONER, M. R. et al. Protease autolysis in heavy-duty liquid detergent formulations: effects of thermodynamic stabilizers and protease inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 2, p. 114–125, fev. 2004.

TA, H. M. et al. Structure-based elucidation of the regulatory mechanism for

aminopeptidase activity. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 69, n. 9, p. 1738–1747, 1 set. 2013.

TAKAMI, H.; TAKAKI, Y.; UCHIYAMA, I. Genome sequence of *Oceanobacillus iheyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 18, p. 3927–35, 15 set. 2002.

TAKATA, G. et al. Characterization of *Mesorhizobium loti* L -Rhamnose Isomerase and Its Application to L -Talose Production. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 5, p. 1006–1009, 23 maio 2011.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–9, out. 2011.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, jun. 2013.

TENG, Y. et al. Isolation of the PCB-degrading bacteria *Mesorhizobium* sp. ZY1 and its combined remediation with *Astragalus sinicus* L. for contaminated soil. **International journal of phytoremediation**, v. 20, 20 ago. 2015.

THOMAS, S. et al. The role of aminopeptidase PepS in the growth of *Streptococcus thermophilus* is not restricted to nitrogen nutrition. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 148–157, 2010.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673–80, 11 nov. 1994.

TIAN, G.; FINLEY, D. Cell biology: Destruction deconstructed. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 170–171, 2012.

TIAN, R. et al. Expression and Characterization of a Novel Thermo-Alkalistable Lipase from Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 5, p. 1482–97, 2015.

TYE, A J. et al. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 2-3, p. 190–7, jul. 2002.

UECHI, K. et al. Gene Cloning and Characterization of L-Ribulose 3-epimerase from *Mesorhizobium loti* and its Application to Rare Sugar Production. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 3, p. 511–515, 2013.

VENKATACHALAM, G. et al. Characterization and applications of cyclic β -(1,2)-glucan produced from *R. meliloti*. **RSC Advances**, v. 4, n. 22, p. 11393, 2014.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J.; VIEILLE, C. Thermostability Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.

WANG, F. et al. Biochemical Properties of Recombinant Leucine Aminopeptidase II from *Bacillus stearothermophilus* and Potential Applications in the Hydrolysis of Chinese Anchovy (*Engraulis japonicus*) Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 165–172, 11 jan. 2012.

WANG, S. et al. Whole-genome sequencing of *Mesorhizobium huakuii* 7653R provides molecular insights into host specificity and symbiosis island dynamics. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 440, 2014a.

WANG, T.-F. et al. Biophysical characterization of a recombinant aminopeptidase II from the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Biological Physics**, v. 40, n. 1, p. 25–40, 2014b.

WANG, W.; WANG, D. I. C.; LI, Z. Facile fabrication of recyclable and active nanobiocatalyst: purification and immobilization of enzyme in one pot with Ni-NTA functionalized magnetic nanoparticle. **Chemical Communications**, v. 47, n. 28, p. 8115, 2011.

WERNICK, D.; LIAO, J. Protein-based biorefining: metabolic engineering for production of chemicals and fuel with regeneration of nitrogen fertilizers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1397–1406, 2013.

WEST, L.; YANG, D.; STEPHENS, C. Use of the *Caulobacter crescentus* Genome Sequence To Develop a Method for Systematic Genetic Mapping. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 8, p. 2155–2166, 15 abr. 2002.

YANG, J. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 7–8, 2014.

YIN, J. et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1433–1442, nov. 2015.

YIN, L. J.; CHOU, Y. H.; JIANG, S. T. Purification and characterization of acidic protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118. **Journal of Marine Science and Technology (Taiwan)**, v. 21, n. 1, p. 105–110, 2013.

ZHU, X. et al. Mechanism of peptide hydrolysis by co-catalytic metal centers containing leucine aminopeptidase enzyme: A DFT approach. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 209–222, 2012.

ZHUO, S.; DIXON, J. E. Effects of sulfhydryl reagents on the activity of lambda Ser/Thr phosphoprotein phosphatase and inhibition of the enzyme by zinc ion. **Protein engineering**, v. 10, n. 12, p. 1445–52, dez. 1997.