

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

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E MODELAGEM DE UMA  
ENZIMA LIPOLÍTICA UTILIZANDO A ABORDAGEM  
METAGENÔMICA**

**Rosmeriana Áfnis Marioto Garcia  
Tecnóloga em Biocombustíveis**

**2014**

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

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E MODELAGEM DE UMA  
ENZIMA LIPOLÍTICA UTILIZANDO A ABORDAGEM  
METAGENÔMICA**

**Rosmeriana Áfnis Marioto Garcia**

**Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**

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

**2014**

G216e Garcia, Rosmeriana Áfnis Marioto  
Expressão heteróloga e modelagem de uma enzima lipolítica  
utilizando a abordagem metagenômica/ Rosmeriana Áfnis Marioto  
Garcia. – -Jaboticabal, 2014  
x, 57 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos  
Banca examinadora: Janete Aparecida Desidério/ Mariana  
Carina Frigieri Salaro  
Bibliografia

1. Esterase. 2. Lipase. 3. Metagenoma. 4. Modelagem de  
Proteína. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 576.8



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** EXPRESSÃO HETERÓLOGA E MODELAGEM DE UMA ENZIMA LIPOLÍTICA  
UTILIZANDO A ABORDAGEM METAGENÔMICA

**AUTORA:** ROSMERIANA ÁFNIS MARIOTO GARCIA

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS  
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. MARIANA CARINA FRIGIERI  
Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal / Jaboticabal/SP

Data da realização: 19 de novembro de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ROSMERIANA AFNIS MARIOTO GARCIA** – Nascida em 20 de maio de 1990 em Araraquara, SP. Iniciou sua graduação em Tecnologia em Biocombustíveis em Fevereiro de 2009 na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal –FATEC JB na cidade de Jaboticabal, SP, concluindo seu curso em dezembro de 2011. Durante a graduação, estagiou no Laboratório de Bioquímica de Micro-Organismos e Plantas 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. Em agosto de 2012 ingressou no curso de Pós- graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, também sob a orientação da Profa. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, como bolsista Capes.

### ***Epígrafe***

*“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança; o seu anjo da guarda.” Joseph Addison*

## **Dedicatória**

Aos meus pais **Diomar Marioto** e **Manoel Garcia Filho**, com muito carinho dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por sempre me proteger e colocar em meus caminhos pessoas tão maravilhosas com as quais eu aprendi, ensinei, convivi e compartilhei muitas coisas as quais me tornaram uma profissional e uma pessoa melhor.

À Professora **Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos** que acreditou em mim e me deu a oportunidade de aprender e realizar este trabalho em seu laboratório;

Aos professores **Dra. Lúcia Maria Carareto Alves** e ao Professor **Dr. Jackson Marcondes Fernandes** por toda ajuda e contribuição;

Aos membros da banca examinadora **Janete Aparecida Desidério** e **Mariana Carina Frigieri Salaro** por terem colaborado para minha formação profissional e terem aceitado o convite de participar da banca;

A **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- FCAV-UNESP** Jaboticabal e ao **Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária** pelo suporte e por tornarem meu mestrado possível;

A **CAPES** pela bolsa concedida;

Ao técnico de laboratório **Dr. João Carlos Campanharo**, que sempre me ajudou prontamente quando precisei e por sua alegria todos os dias de trabalho;

A toda a equipe do **LBMP**, todos vocês de alguma forma contribuíram para o meu amadurecimento. Obrigada pelos conselhos, pela troca de conhecimento, pelos momentos de descontração, pela ajuda em todo esse processo de formação;

Aos meus amigos de trabalho, que se tornaram amigos para a vida: **Thaís Maester, Elisângela Gomes, Érica Lopes, Mariana Pereira e Elwi Machado**, com certeza devo muito a todos vocês, nos momentos de desespero e de alegria sempre pude contar com todos de alguma forma, fica aqui o meu imenso agradecimento e o meu carinho. Vocês são referência de profissionalismo, dedicação e persistência, tenho muito orgulho de ter participado deste grupo.

Aos meus pais **Diomar Marioto e Manoel Garcia Filho** (*in memorian*) me faltam palavras para expressar o tamanho da gratidão que tenho por tudo que fizeram por mim e por sempre acreditarem que eu podia chegar sempre mais longe. Não foi fácil chegar até aqui, ainda mais sem um de vocês presente no meu dia a dia, mas o amor é um sentimento tão sublime que nos dá força para chegarmos sempre em nossos objetivos... Amo Vocês Muito, obrigada.

Aos meus irmãos **Reuel e Raiane** e a minha sobrinha **Júlia** por serem pessoas tão diferentes e tão iguais a mim. Obrigada por todo apoio e carinho todos esses anos, amo vocês.

Aos meus amigos de longa data **Laís e Victor**, que não permitiram que o tempo e a distância nos afastassem e que sempre torceram por mim mesmo longe. Vocês são pessoas iluminadas. Obrigada por estarem sempre comigo.

Às minhas companheiras de apartamento, **Aline, Nayara, Luriany** e nossa agregada **Raissa** que me ensinaram muito sobre a vida e a convivência, com certeza muito dos melhores momentos da minha vida eu vivi e dividi com vocês. Me sinto abençoada por ter tido a sorte de conhecer, conviver e ser amiga de pessoas de coração tão bom como vocês. Eternamente 24! Amo Vocês Migas!

Ao **Juliano Camargo**, que me mostrou o verdadeiro significado da palavra superação e o quanto nós podemos evoluir como seres humanos, com pequenos gestos. Obrigada por estar sempre ao meu lado me apoiando e me mostrando o lado bom da vida.

A todas as pessoas que em algum momento fizeram parte dessa trajetória e contribuíram positivamente para a pessoa que eu sou hoje, muito obrigada a todos que dispenderam algum tempo para me ajudar, me alegrar, ensinar e aprender.

**Muito Obrigada!**

## SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA (CIBio) .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	v
ABREVIACÕES.....	vi
LISTA DE UNIDADES.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
1 INTRODUÇÃO .....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1 Diversidade microbiana do solo .....	12
2.2 Metagenômica na prospecção de genes .....	13
2.3 Enzimas Lipolíticas .....	14
2.4 Classificação em Famílias .....	16
2.5 Família de dobramento alfa/beta hidrolase .....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Análise <i>in vitro</i> de produção de enzimas lipolíticas nos subclones da sub- biblioteca.....	19
3.2 Extração e Quantificação do DNA plasmidial do Subclone.....	19
3.3 Sequenciamento e análise do subclone.....	20
3.4 Clonagem do gene codificador da proteína orf2 em vetor pET28a.....	21
3.4.1 Amplificação do gene de interesse .....	21
3.4.2 Reação de Ligação do Inseto ao Vetor.....	22
3.4.3 Transformação das células de <i>Escherichia coli</i> .....	23
3.4.4 Coleta e estoque dos clones e extração plasmidial pET28a-orf2 .....	24
3.4.5 Confirmação da Clonagem e Sequenciamento .....	24
3.5 Expressão e Extração da proteína orf2.....	24
3.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE.....	26
3.7 Purificação da Proteína Recombinante.....	26
3.8 Zimograma.....	27
3.9 Análise <i>in silico</i> da proteína orf2 .....	27

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Análise <i>in vitro</i> de produção de enzimas lipolíticas nos subclones da biblioteca metagenômica .....	28
4.2 Extração e Quantificação Plasmidial do Subclone PL01.A03 .....	29
4.3 Análise das Sequências.....	29
4.4 Identificação da família lipolítica a qual orf2 está inserida .....	32
4.5 Clonagem do gene em vetor de expressão pET28a .....	34
4.5.1 Amplificação do gene de interesse .....	34
4.5.2 Obtenção da construção pET28a-orf2 e transformação em células de <i>Escherichia coli</i> BL21(D3).....	37
4.5.3 Extração do DNA plasmidial pET28a-orf2 e confirmação da clonagem.....	38
4.6 Expressão e Extração da Proteína orf2 .....	38
4.7 Purificação da Proteína Recombinante.....	41
4.8 Zimograma.....	43
4.9 Análise <i>in silico</i> da proteína orf2 .....	44
5 CONCLUSÕES .....	47
REFERÊNCIAS.....	48

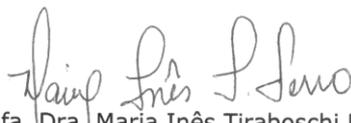
**CERTIFICADO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA (CIBio)**

	<b>Comissão Interna de Biossegurança</b>	
	<b>Ofício CIBio 013/14</b>	
	<b>Ref.: Certificado de Aprovação de Projeto de Pesquisa</b>	

**CERTIFICADO**

Certificamos, a quem possa interessar, que o trabalho de pesquisa intitulado: "Expressão heteróloga e modelagem de uma enzima lipolítica utilizando a abordagem metagenômica", sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eliana Gertrudes Maedo Lemos, foi aprovado pela CIBio da FCAV-UNESP em reunião de 24/06/2013.

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2014.

  
Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro  
- Presidente da CIBio -

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1-</b> Descrição das famílias lipolíticas bacterianas I-VIII ( Arpigny e Jaeger, 1999).....	16
<b>Tabela 2-</b> Sequência dos oligonucleotídeos e parâmetros utilizados para amplificação do gene codificador da <i>orf2</i> .....	21
<b>Tabela 3-</b> Predição das ORFs identificadas no “contig” do subclone PI01.A03 .....	30
<b>Tabela 4-</b> Análise, através do BLASTP (Non-redundant protein sequence - nr), da <i>orf2</i> .....	32
<b>Tabela 5-</b> Características físico-químicas da <i>orf2</i> obtidos a partir do Protparam.....	39
<b>Tabela 6-</b> Estrutura usada como molde para a construção do modelo da proteína <i>orf2</i> .....	44

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura secundária do dobramento das alfa/beta hidrolases.....	18
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pET28a (Novagen).....	23
<b>Figura 3.</b> Análise <i>in vitro</i> da sub-biblioteca metagenômica.....	28
<b>Figura 4.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da extração do DNA plasmidial do subclone PL01.A03. ....	29
<b>Figura 5.</b> Mapa físico das ORFs selecionadas. ....	31
<b>Figura 6.</b> Dendograma hierárquico e alinhamento da sequência da orf2 .....	33
<b>Figura 7.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose 1% mostrando padronização da temperatura de pareamento das reações de PCR em termociclador de gradiente...	35
<b>Figura 8.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amplificação da orf2 em reação de PCR com a enzima “Pfu” DNA Polimerase .....	36
<b>Figura 9.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose 1% do inserto purificado após preparativa. ....	36
<b>Figura 10.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose 1% mostrando inserto e vetor purificados para clonagem .....	37
<b>Figura 11.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose 1% para confirmar a presença do inserto referente à orf2 .....	38
<b>Figura 12.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% Teste de Expressão.....	39
<b>Figura 13.</b> Análise da expressão e solubilidade em diferentes condições da orf2 evidenciada em SDS-PAGE 10%.....	40
<b>Figura 14.</b> Análise da purificação da orf 2 evidenciada em SDS-PAGE 10%.....	41
<b>Figura 15.</b> Análise de presença de peptídeo sinal na sequência da proteína orf2 ...	42
<b>Figura 16.</b> Zimograma .....	43
<b>Figura 17.</b> Modelo tridimensional da proteína orf2 .....	46

## ABREVIACÕES

Abs- Absorbância

aa- Aminoácidos

DNA- ácido desoxirribonucleico

dNTP- desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

IPTG – isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

p/v – peso por volume

PCR- reação em cadeia da polimerase

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*

DO600 – densidade ótica a 600 nm de comprimento de onda

E.C. – *Enzyme Commission*

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

Kb – mil pares de base

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ORF – *Open Reading Frame* (região codificadora de proteína)

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PDB – *Protein Data Bank*

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

pI – ponto isoelétrico

rpm – rotações por minuto

SAP – *Shrimp Alkaline Phosphatase* (fosfatase alcalina de camarão)

SDS – dodecil sulfato de sódio

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

FT- “Flow through” (Fração do lavado referente às proteínas que não se ligaram à resina)

**LISTA DE UNIDADES**

*g* – aceleração da gravidade

g – grama

kb – kilobase

L – litro

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

$\mu$ g – micrograma

$\mu$ L – microlitro

$\mu$ M – micromolar

ng – nanogramas

pb – pares de bases

U – unidades

V- volt

KDa- Quilo Daltons

## EXPRESSÃO HETERÓLOGA E MODELAGEM DE UMA ENZIMA LIPOLÍTICA UTILIZANDO A ABORDAGEM METAGENÔMICA

**RESUMO-** A metagenômica é uma ferramenta poderosa na descoberta de novos genes microbianos com potencial biotecnológico, pois não são necessárias as técnicas tradicionais de cultivo. Para suprir as necessidades de enzimas no mercado esta técnica tem sido muito utilizada para a descoberta de novos genes codificadores de lipases e esterases microbianas muito utilizadas em processos biotecnológicos como produção de detergentes, biodiesel e biorremediação. Em trabalhos anteriores, foram prospectadas sequências codificadoras para enzimas lipolíticas em uma biblioteca metagenômica de DNA com 4224 clones, de um consórcio microbiano obtido de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, localizado na cidade de Ribeirão Preto – São Paulo - Brasil, obtendo-se 30 clones com possível atividade lipolítica em Tributirina. No presente trabalho, um dos clones foi selecionado após ensaio em placa de Petri com Tributirina para a construção de uma sub-biblioteca, com 480 subclones. O sequenciamento foi realizado em aparelho ABI Prism 3100 e o “contig” obtido analisado no *ORF Finder* do National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Maryland, USA). Foi possível identificar um gene de 1032 pb, 344 aminoácidos, denominado *ORF2*, que codifica uma enzima lipolítica com identidade de 94 % com uma hidrolase de *Pseudomonas denitrificans* (YP\_007656829.1). As sequências que representam as oito famílias de enzimas lipolíticas propostas por Arpying e Jaeger (1999) foram extraídas do banco de dados do NCBI e comparadas com a sequência da *ORF2*, possibilitando afirmar que esta enzima é um novo membro da família V de enzimas lipolíticas bacteriana. O gene codificador da *ORF2* foi clonado em vetor de expressão pET28a e superexpressado em *Escherichia coli* BL21(D3). A fração solúvel da proteína foi analisada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), em condição desnaturante. A atividade lipolítica das bandas da proteína recombinante do gel de SDS-PAGE foi confirmada por um zimograma, indicando sua funcionalidade em substrato específico. A modelagem tridimensional também foi realizada sendo possível verificar que a proteína exibe a tríade catalítica (Ser147, Asp273 e His299) e motivos conservados, como o motivo GXSMGG, no qual o sítio da serina está inserido. A modelagem ainda possibilitou sugerir a entrada de acesso dos substratos através da cavidade interna. O nosso estudo demonstrou que a abordagem metagenômica pode ser aplicada para expandir o conhecimento de enzimas lipolíticas, sendo esta, uma ferramenta para identificar novas enzimas. Os ensaios iniciais com a proteína *ORF2* mostram a sua estabilidade em tampões e processos utilizados, o que a torna ainda mais interessante. Pretende-se realizar estudos de caracterização enzimática visando direcionar suas possíveis aplicações biotecnológicas.

**Palavras- Chave:** Esterase, Lipase, Metagenoma, Modelagem de Proteína.

## HETEROLOGOUS EXPRESSION AND MODELING OF AN ENZYME USING THE APPROACH LIPOLYTIC METAGENOMICS

**ABSTRACT-** The metagenomics is a powerful tool in the discovery of new microbial genes with biotechnological potential, they are not necessary traditional cultivation techniques. With increasing demand for enzymes in the market this technique has been widely used for the discovery of new genes encoding microbial lipases and esterases widely used in biotechnological processes such as the production of detergents, biodiesel and bioremediation. In previous work, coding sequences for lipolytic enzymes were prospected in 4224 clones from a metagenomic DNA library from a microbial consortium obtained from soil contaminated with petroleum hydrocarbons, located in the city of Ribeirão Preto - São Paulo - Brazil, obtaining 30 clones with possible lipase activity on tributyrin. In this study, one clone was selected after testing in a Petri dish with Tributyrin to build a sub-library, with 480 subclones. Sequencing was performed on ABI PRISM 3100 instrument and analyzed “*contig*”s obtained in the ORF finder from the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Maryland, USA). It was possible to identify a gene of 1032 bp, 344 amino acids, termed ORF2, encoding a lipolytic enzyme with 94% identity with a hydrolase from *Pseudomonas denitrificans* (YP\_007656829.1). The sequences representing eight families of lipolytic enzymes and Arpying proposed by Jaeger (1999) were extracted from the NCBI database and compared with the sequence of ORF2, allowing affirm that this enzyme is a new member of the family V bacterial lipolytic enzymes . The encoder ORF2 gene was cloned into pET28a expression vector and overexpressed in *Escherichia coli* BL21 (D3). The soluble protein fraction was analyzed by polyacrylamide (SDS-PAGE) gel in denaturing condition. The lipolytic activity of the recombinant protein bands on the SDS-PAGE gel was confirmed by a zymogram indicating its functionality in a specific substrate. Three-dimensional modeling was also carried out and through it we found that the protein exhibits the catalytic triad (Ser147, Asp273 and His299) and conserved motifs, like motif GXSMGG which Sino Serine is inserted, the modeling also enabled suggest entry access of substrates through internal cavity. Our study demonstrated that the metagenomic approach can be applied to expand the knowledge of lipolytic enzymes, this being a tool for identifying novel enzymes. The initial trials with the ORF2 protein show its stability in buffers and processes used, which makes it even more interesting. We intend to conduct studies of enzymatic characterization of this enzyme aiming to direct their potential biotechnological applications.

**Key-words:** Esterase, Lipase, Metagenome, Modeling of Protein.

## 1 INTRODUÇÃO

A biosfera é dominada pelos micro-organismos, entretanto, a maioria deles não foi estudada (SIMON e DANIEL, 2011) devido à restrição que as técnicas de cultivo tradicional ocasionam, pois nem sempre é possível reproduzir em laboratório as mesmas condições que as encontradas na natureza, seja com relação à nutrientes ou a temperatura e pressão, portanto, a maior parte deles não é cultivável (HANDELSMAN, 1998). Eles desempenham papéis importantes no equilíbrio ecológico, e devido às alterações ambientais que ocorrem ao longo do tempo, mostram grande diversidade genética (LIAW et al., 2010).

Os micro-organismos ambientais são extremamente diversos e têm inúmeras atividades metabólicas e produtos que poderiam ter aplicações industriais, no entanto, 99% não podem ser cultivados em condições comumente usadas em laboratório, deixando o seu potencial inexplorado e conseqüentemente produtos de seu metabolismo que poderiam ter aplicações industriais ainda não prospectados (SINGH, 2009).

Para conseguir acessar o DNA sem o cultivo prévio há a abordagem metagenômica, onde o DNA genômico da comunidade microbiana é extraído diretamente do solo ou de qualquer outro ambiente e clonado em vetores, formando as bibliotecas metagenômicas (HANDELSMAN, 1998), que podem ser utilizadas para descobrir novas enzimas e estudar vias metabólicas secundárias, (LIAW et al., 2010). Esta abordagem juntamente com a aplicação da genética molecular em consórcios microbianos não cultiváveis tem um impacto substancial na busca de novas enzimas industriais, devido à grande diversidade de material genético analisado (LORENZ e ECK, 2005; JIANG et. al., 2010). A abordagem tem sido utilizada com êxito nos últimos anos para encontrar uma grande variedade de novos catalisadores e metabólitos secundários, como lipases (HENNE et. al., 2000), antibióticos (GILLESPIE et al., 2002), celulases (KIM et al., 2009), xilanases (HU et. al., 2008) e esterases (JEON et al., 2009).

Com relação à utilização das enzimas e sua movimentação comercial global, já há dez anos, a indústria de enzimas está estimada em 2,3 bilhões de dólares com

crescimento de 4 a 5% ao ano, cujo principal lucro está dividido entre os detergentes (US\$ 789 milhões), aplicações alimentícias (US\$ 634 milhões), agricultura (US\$ 237 milhões) e outras aplicações incluindo enzimas para produção de tecidos e produtos químicos (LORENZ e ECK, 2005). Dentro deste comércio, as enzimas lipolíticas estão atraindo enorme atenção por causa do seu potencial biotecnológico (VAKHLU e KOUR, 2006). As lipases de origem microbiana são economicamente atrativas, pois são facilmente biodegradáveis, causando menor impacto ambiental, atuarem geralmente em condições amenas (pH próximo a neutralidade e temperaturas de 20 °C a 40 °C) e são quimio-seletivas, ou seja, só atuam em um único tipo de grupo funcional (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Em relação aos processos industriais com lipases, o grande problema está no custo das etapas necessárias para a purificação, que geralmente provocam perdas na atividade das enzimas aumentando o custo final, entretanto, devido aos recentes avanços na tecnologia de engenharia genética e imobilização de lipases há perspectivas de mudança deste quadro (SAXENA et al., 2003; KOBLITZ e PASTORE, 2004).

Tendo em visto os inúmeros benefícios e aplicações industriais das enzimas lipolíticas e da utilização de abordagem metagenômica como forma de prospecção, foi construída no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas (LBMP), na UNESP – Campus de Jaboticabal, uma biblioteca metagenômica em vetor fosmidial, a partir de um consórcio microbiano degradador de hidrocarbonetos de petróleo (PAIXÃO et al., 2010), obtido de solo contaminado por aproximadamente 15 anos com resíduos químicos, de uma antiga fábrica de lubrificantes localizada na cidade de Ribeirão Preto - SP. A biblioteca possui 4224 clones e é utilizada para a prospecção de diversos genes de importância biotecnológica, entre eles, genes codificadores de enzimas lipolíticas. Foram identificados 30 clones positivos na biblioteca em trabalhos anteriores, um deles foi selecionado e subclonado em vetor pUC19. A sub-biblioteca possui 480 subclones que também foram submetidos ao ensaio bioquímico com Tributirina, um deles apresentou formação de halo. Ele foi utilizado neste trabalho que teve por objetivo a identificação do gene responsável pela produção da enzima lipolítica além de sua expressão, purificação e modelagem por homologia, visando o direcionamento para futuras aplicações biotecnológicas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Diversidade microbiana do solo

O solo é considerado um ambiente complexo, sendo um importante reservatório da diversidade genética microbiana (ROBE et al., 2003). Isso ocorre pela interação de múltiplos parâmetros, como: o pH, o teor de água, estrutura do solo, variações climáticas e atividade biótica (RAJENDHRAN;GUNASEKARAN, 2008).

É o habitat que contém a maior quantidade e diversidade de micro-organismos sendo que um grama de solo contém mais de 10.000 espécies diferentes (TORSVIK; OVREAS; THINGSTAD et al., 2002). O número de micro-organismos e suas biomassas coletivas variam dentro e entre os diferentes tipos e condições dos solos, sendo o grupo das bactérias o mais numeroso (WHITMAN et al., 1998).

Com o desenvolvimento de técnicas de cultivo puro, os micro-organismos puderam ser estudados individualmente e caracterizados, principalmente, por critérios nutricionais. Entretanto, a utilização da abordagem do cultivo puro limitou a avaliação taxonômica e filogenética, devido à falha de cultivo da maioria dos micro-organismos pelos métodos convencionais (HENNE et al., 2000; HARDEMAN e SJOLING, 2007).

Com as limitações que os métodos tradicionais de cultivo ocasionam, técnicas moleculares como 16SrRNA tem aumentado o conhecimento da diversidade microbiana dos solos. Como em trabalhos realizados para a estimativa e comparação da diversidade bacteriana de comunidades em solos de floresta nativa e outra adjacente com arboreto de eucalipto. Neste estudo, foi utilizado o DNA metagenômico correspondente ao gene 16SrRNA para a determinação da diversidade bacteriana em tais locais, sendo que, as análises filogenéticas revelaram diferenças entre os tipos de solos e alta diversidade em ambas as comunidades. No solo de arboreto foi encontrada maior diversidade bacteriana em comparação com o solo da área de floresta nativa (SILVEIRA et al., 2006; PEDRINHO et al., 2009; PAIXÃO et al.,2010).

## 2.2 Metagenômica na prospecção de genes

A metagenômica emergiu no final dos anos 90 como uma ferramenta para alcançar e estudar o material genético microbiano coletivo no ambiente e promoveu novas oportunidades e tecnologias para estudar a riqueza da diversidade microbiana de diferentes ambientes (TUFFIN et al., 2009). Essa abordagem possibilita a extração de DNA diretamente do ambiente e a construção de bibliotecas com este genoma microbiano total, para posterior clonagem e expressão de genes de interesse biotecnológico em hospedeiros de expressão (KNIGHT et al., 2003). Além disto, a sua aplicação em consórcios de microbianos não cultivados tem potencial para ter um impacto substancial na busca de novas enzimas industriais (GLOGAUER, 2011).

Cada organismo que vive em determinado ambiente tem um conjunto único de genes em seu genoma e os genomas de todos os membros da comunidade, combinados, formam o metagenoma. A tecnologia metagenômica levou ao acúmulo de sequências de DNA que estão à disposição para serem exploradas para novas aplicações biotecnológicas (FERRER et al., 2005).

Esta ferramenta abriu o caminho para a avaliação, independente de cultivo e a exploração de comunidades microbianas presentes em ecossistemas complexos. Nos últimos anos, significativos progressos têm sido feitos nessa área de pesquisa, sendo que um avanço importante é a melhoria e o desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento. A aplicação desta metodologia resultou na geração de grandes conjuntos de dados provenientes de vários ambientes, tais como o solo (HENNE et al., 2000; RONDON et al., 2000; LEE et al., 2004), e a água do oceano (CHU et al., 2008). A análise desses dados é uma oportunidade para o estudo da enorme diversidade filogenética e metabólica das comunidades microbianas que vivem em uma variedade de ecossistemas. Desta forma, estrutura, funções e interações das comunidades microbianas foram esclarecidas.

Ela tem provado ser uma poderosa ferramenta para a recuperação de novas biomoléculas. Na maioria dos casos, ela funciona através da construção e triagem de complexas bibliotecas de DNA metagenômico e tem sido aplicada para isolar enzimas e novas moléculas de importância industrial (SIMON e DANIEL, 2011).

Recentemente, foi relatado o isolamento e a caracterização da LipC12 (GLOGAUER et al, 2011) obtido a partir do metagenoma de solo contaminado com gordura animal, a partir de uma lagoa anaeróbia da estação de tratamento de águas residuais de uma indústria de carne e laticínios localizada em Carambeí, no estado do Paraná, Brasil. As características que esta lipase apresentou sugerem que ela tem o potencial para desempenhar processos biocatalíticos tais como a produção de biodiesel através de transesterificação em meios orgânicos (MARTINI et.al., 2012).

Outro exemplo são as construções de bibliotecas metagenômicas advindas de ambientes de baixa temperatura (HARDEMAN e SJOLING, 2007; ROH e VILLATTE, 2008; CIESLINSKI et al., 2009; HU et al., 2010), a fim de procurar nesta condição extrema (baixa temperatura) lipases com atividade ótima. Algumas das aplicações para lipases que atuam em baixas temperaturas são: aditivo de detergentes, diminuição de custos energéticos envolvidos na catálise e biorremediação em solos ou águas de ecossistemas frios (HARDEMAN e SJOLING, 2007).

### **2.3 Enzimas Lipolíticas**

As enzimas lipolíticas constituem atualmente um dos grupos mais importantes de enzimas com importância biotecnológica (JAEGER e EGGERT, 2002). As lipases (EC 3.1.1.3) e esterases (CE 3.1.1.1) fazem parte de um grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e à hidrólise dos lipídeos amplamente distribuídos na natureza. As lipases verdadeiras hidrolisam total ou parcialmente o triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, agindo parcialmente na interface óleo/água. Já as esterases agem em ésteres solúveis em água ou hidrolisam outros lipídeos (JAEGER e EGGERT, 2002).

As lipases e esterases possuem determinadas características que as tornam o grupo de biocatalisadores com maior aplicação industrial e enorme potencial biotecnológico, pois normalmente não requerem cofatores, são estáveis em solventes orgânicos e possuem ampla especificidade de substratos, reduzindo o desperdício, atuam em condições brandas e apresentam biodegradabilidade (JAEGER; DIJKSTRA e REETZ, 1999).

Dentre algumas aplicações industriais das enzimas lipolíticas microbianas estão a obtenção de: biopolímeros (JAEGER e EGGERT, 2002); biodiesel (JAEGER e EGGERT, 2002; GAO et.al, 2009); produtos farmacêuticos (SHARMA;CHISTI e BANERJEE, 2001; JAEGER e EGGERT, 2002; PRIYA e CHADHA,2003); agroquímicos (JAEGER e EGGERT, 2002), flavorizantes (JAEGER e EGGERT, 2002); detergentes (CHEETHAM, 1995); alimentos (HASAN et. al, 2006); química fina (SHARMA;CHISTI e BANERJEE, 2001; REETZ, 2002; HASAN et. al, 2006); o uso como biosensor de biorremediação (SUMNER, 2001); cosméticos e perfumaria (HAKI e RAKSHIT, 2003); oleoquímica (YAHYA, et. al., 1998; couros (TELES; CABRAL e SANTOS, 2001); polpa de papel e celulose (GANDHI, 1997; JAEGER e REETZ, 1998; SHARMA;CHISTI e BANERJEE, 2001); e no tratamento de resíduos industriais (JAEGER e REETZ,1998; MASSE; KENNEDY e CHOU, 2001; LEAL et. al., 2002).

O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases e esterases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (JAEGER et.al., 1994; GHOTRA; DYAL e NARINE, 2002). Lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras (JAEGER; REETZ, 1998).

Utilizando enzimas no processo é possível controlar quais produtos serão produzidos e prevenir a ocorrência de reações indesejáveis, a produção de compostos que não são de interesse são minimizadas devido à especificidade das enzimas (HASAN et. al, 2006).

Há seis anos o mercado de enzimas estava estimado em 2,5 bilhões de dólares com um crescimento anual de 6,5 a 10% (CBDM, 2008). Estima-se que há aproximadamente 4000 enzimas conhecidas, das quais 200 são de origem microbiana e utilizadas comercialmente. No entanto, somente cerca de 25 enzimas são realmente produzidas em escala comercial. (HASAN, 2006; LI et al., 2013).

No futuro, novas aplicações biotecnológicas devem impulsionar o mercado de enzimas industriais (LI et al., 2012), já que a substituição de catalisadores químicos pela catálise enzimática possibilita redução de energia, tempo e rejeitos industriais

que podem comprometer o meio ambiente, revertendo-se em benefícios econômicos (LORENZ, et. al.2002).

## 2.4 Classificação em Famílias

As lipases e esterases são classificadas em oito famílias baseadas nas sequências conservadas, *motivos* e propriedades biológicas (ARPIGNY e JAEGER, 1999). A classificação e descrição das famílias são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1-** Descrição das famílias lipolíticas bacterianas I-VIII ( Arpigny e Jaeger, 1999).

Famílias	Descrição
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grupo de lipases verdadeiras na maioria há a presença do pentapeptídeo conservado &lt;Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly&gt;.</li> <li>• Subdividido em seis subfamílias: Lipases de <i>Pseudomonas</i> e semelhantes (subfamílias I.1, I.2 e I.3); lipases de <i>Bacillus</i> e <i>Staphylococcus</i> e semelhantes (I.4 e I.5) e outras lipases (I.6).</li> </ul>
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modificação em torno do motivo conservado: &lt;Gly Asp-Ser- (Leu) &gt;[GDS (L)].</li> <li>• Ampla especificidade ao substrato</li> </ul>
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lipases e esterases extracelulares</li> <li>• Apresentam a típica tríade catalítica &lt;Ser-Asp-His&gt;</li> </ul>
IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muitos membros desta família apresentam semelhança com a sequência de lipase hormônio-sensitiva de mamíferos, (HSL).</li> <li>• Motivo conservado HGG</li> <li>• Enzimas lipolíticas de origem psicofílicas, mesofílicas e termófilas.</li> </ul>
V	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blocos conservados GXSMGG, PTLV e GH</li> <li>• Similaridade de seqüência com enzimas não lipolíticas: epóxido hidrolases, dehalogenases e haloperoxidases.</li> <li>• Esterases de origens psicofílicas, mesofílicas e termófilas.</li> <li>• Apresentam a típica tríade catalítica &lt;Ser-Asp-His&gt;</li> </ul>
VI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• As menores esterases conhecidas (23-26 kDa).</li> <li>• Similaridade de seqüência para lisofosfolipases eucarióticas.</li> <li>• Apresentam a típica tríade catalítica &lt;Ser-Asp-His&gt;</li> </ul>
VII	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grandes esterases bacterianas (55 kDa).</li> <li>• Seqüência homóloga com esterases acetilcolina eucarióticas e carboxilesterases de intestino e fígado.</li> </ul>
VIII	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Similaridade com várias <math>\beta</math>-lactamases da classe C.</li> <li>• Ordem dos resíduos catalíticos da sequência Ser-Asp-His, não é a mesma nesta subfamília</li> </ul>

A classificação feita por Arpigny e Jaeger (1999) é a referência mais usada para designar uma enzima lipolítica recém-descoberta, porém, novas famílias foram descobertas através da metagenômica desde que ele foi publicado (LÓPEZ, CERDÁN e SISO, 2014), por exemplo: LipG (LEE et al., 2006); EstA (CHU et al., 2008); LipEH166 (KIM et al., 2009); EstY (WU e SUN, 2009), EML1 (JEON et al., 2009), EstGK1 (BAYER et al., 2010). Espera-se que devido à constante busca por lipases e esterases haja um aumento no número de famílias existentes (RANJAN et al. 2005).

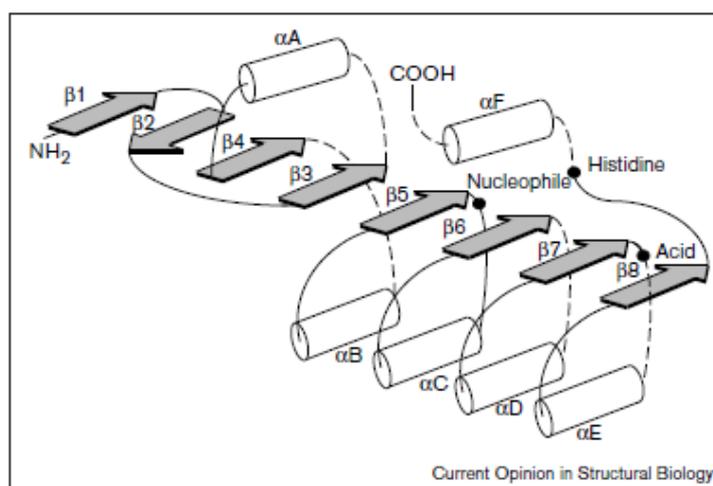
## 2.5 Família de dobramento alfa/beta hidrolase

As lipases e esterases são representantes da família com dobramento alfa/beta hidrolase, assim como as proteases e peroxidases fazendo desta família uma das mais versáteis e com dobramentos proteicos mais conhecidos. Embora elas não possuam similaridade de sequência e substratos, elas apresentam uma preservação na disposição dos sítios catalíticos, homologia estrutural, sugerindo um possível ancestral comum (OLLIS et al., 1992).

A caracterização do dobramento das  $\alpha/\beta$  hidrolase é dada por um núcleo de oito folhas  $\beta$  conectadas por  $\alpha$ -hélices, para dar a disposição  $\alpha/\beta/\alpha$  (Figura 1). Na maioria dos membros da família, as folhas  $\beta$  são paralelas, mas alguns apresentam uma inversão nessa ordem, resultando em uma orientação antiparalela. Para manter a maquinaria catalítica conservada, grandes inserções foram toleradas, como alguns resíduos de aminoácidos ou até mesmo um domínio extra completo, dando a esta família uma grande habilidade de evolução e adaptação (NARDINI e DIJKSTRA, 1999).

O dobramento das alfa/beta hidrolases pode fornecer um arcabouço estável para os sítios ativos de uma grande variedade de enzimas. Os resíduos catalíticos são sempre constituídos de uma tríade altamente conservada: o nucleofílico (serina, cisteína ou ácido aspártico) posicionado após a folha  $\beta$ 5; um resíduo ácido, posicionado quase sempre após a folha  $\beta$ 7; e uma histidina, que é um resíduo absolutamente conservado, situado após a última folha  $\beta$  (NARDINI e DIJSTRA,

1999). O membro nucleofílico sempre está localizado em uma curva acentuada, chamada “cotovelo nucleofílico”, facilitando a aproximação com o substrato. Esta geometria do “cotovelo nucleofílico” contribui na formação do sítio de ligação oxianion, que é necessário para estabilizar o estado transitório durante a hidrólise. Este sítio é identificado por uma sequência Sm-X-Nu-X-Sm (SM=pequeno resíduo, X=qualquer resíduo, e Nu=nucleofílico). O membro ácido da tríade catalítica está localizado em uma curva reversa, na folha  $\beta 7$ . Já a histidina é o único resíduo da tríade que é absolutamente conservado, entretanto, a forma e o comprimento do local que contém a histidina pode diferir consideravelmente entre os vários membros da família (NARDINI e DIJSTRA, 1999).



**Figura 1.** Estrutura secundária do dobramento das alfa/beta hidrolases.  $\alpha$ -hélices e  $\beta$ -folhas estão representadas através dos cilindros brancos e setas cinzas, respectivamente. A localização da tríade catalítica está indicada pelos círculos pretos. Fonte: Nardini e Dijkstra (1999).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Análise *in vitro* de produção de enzimas lipolíticas nos subclones da sub-biblioteca

No trabalho de dissertação de Pereira (2011), através do “screenig” da biblioteca de fosmídeo foram prospectados 30 clones que apresentaram atividade em Tributirina. Um desses clones foi selecionado e a partir dele construída uma sub-biblioteca pela técnica de “shotgun”, com 480 subclones (CANTÃO, et. al., 2007).

Os subclones foram submetidos ao ensaio em meio Luria-Bertani (LB) [1% de triptona (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v), 1% de NaCl (p/v) e 1,5% de ágar (p/v) (pH 7,0)] suplementado com 1% (v/v) de Tributirina, 1% de goma arábica (p/v) e ampicilina 70 µg/mL. O substrato foi adicionado e emulsionado (LEE et. al. 2004) com sonicador Branson Sonifier 250 (Branson, Connecticut, EUA), Duty Cycle de 30% em 3 ciclos de 10 segundos. Após autoclavado, o meio foi vertido em placa de Petri (150 mm x 15 mm). As placas foram incubadas na estufa a 37 °C e foram monitorados por três dias, depois foram monitorados por sete dias a 4°C para verificar a hidrólise do substrato e formação de halos.

#### 3.2 Extração e Quantificação do DNA plasmidial do Subclone

O subclone positivo teve o DNA plasmidial extraído através do kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos da América), seguindo as orientações do fabricante.

O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%, as amostras foram preparadas com 3 µL da alíquota do DNA mais 3 µL do tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% de glicerol (v/v)]. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal e conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido

Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3) a 80 V, por 1 hora e 30 minutos. O padrão de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Ontário, Canadá) foi aplicado ao gel e a visualização foi realizada sob luz UV. A imagem foi documentada em um aparelho fotodocumentador Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos da América), através do software Quantity One<sup>R</sup> (Bio-Rad) e em NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, Estados Unidos da América).

### 3.3 Sequenciamento e análise do subclone

Os fragmentos do DNA plasmidial foram sequenciados em microplacas nas seguintes condições: 1 µL BigDye Terminator (Applied Biosystems Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América), 10 pmoles do oligonucleotídeo iniciador M13, sendo que as reações foram feitas separadamente para “Forward” e “Reverse”, 3 µL de tampão 2,5 vezes concentrado (400 mM de Tris-HCl, pH 9, e 10 mM de MgCl<sub>2</sub>), 100 a 120 ng de DNA e água deionizada esterilizada para completar um volume de 10 µL.

As placas foram levadas ao termociclador e submetidas ao ciclo: desnaturaçãõ a 96 °C por 2 minutos; 39 ciclos de 96 °C por 10 segundos; 52 °C por 20 segundos, 61 °C por 4 minutos e ciclo final a 4 °C até serem retiradas.

O material foi sequenciado no aparelho ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América) e análise do foi realizada através do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING e GREEN, 1998; EWING et al., 1998), sendo que foram selecionadas somente sequências que apresentaram mais de 350 bases com qualidade Phred  $\geq$  20, através do programa contGEN. As sequências foram montadas e o “contig” formado analisado, sendo as ORFs (*open reading frames*) identificadas com o programa ORF Finder (WHEELER et al., 2003) do NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>), em que as sequências de aminoácidos foram comparadas com o banco de dados do NCBI através do algoritmo BLASTX (ALTSCHUL et al., 1997).

Para análise das relações filogenéticas foram utilizadas as sequências contidas nos trabalhos de Arpigny e Jaeger (1999). As sequências distintas de aminoácidos foram alinhadas usando o programa ClustalW, através do BioEdit Sequence Alignment Editor v.7 (HALL, 1999). As árvores filogenéticas foram construídas com o auxílio do programa Mega 5 (TAMURA et al., 2007) usando o algoritmo do vizinho mais próximo “neighbor-joining” (SAITOU; NEI, 1987), com *bootstrap* de 1000.

### 3.4 Clonagem do gene codificador da proteína orf2 em vetor pET28a

#### 3.4.1 Amplificação do gene de interesse

Um par de oligonucleotídeos iniciadores de síntese foi construído para possibilitar a clonagem do gene codificador da orf2 em vetor de expressão pET28a (Novagen, Gibbstown, New Jersey, Estados Unidos da América), e as enzimas de restrição utilizadas (região sublinhada), sendo ilustrado na Tabela 2.

**Tabela 2-** Sequência dos oligonucleotídeos e parâmetros utilizados para amplificação do gene codificador da orf2.

Proteína	Enzima de restrição	Oligonucleotídeos (Sequência 5´ - 3´)	TM*	Tamanho do fragmento
orf2	Forward_NdeI	GCGTTCCGGATTTTCACTCC <u>CATATG</u> CGTG	64.2°C	1032pb
	Reverse_XhoI	GATTCGCAGCTCGAGGATCAGGACCG	65.8°C	

\*TM= Temperatura de Pareamento

O gene da orf2 foi amplificado com reações de PCR com os oligonucleotídeos específicos, nas seguintes condições: 2 µL de Tampão 10X [Tris-HCl 200 mM, pH 8,8; 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 100 mM KCl; 1% (v/v) Triton X-100, 1 mg/mL BSA (Fermentas, Burlington, Ontário, Canadá)]; 16 mM de MgCl<sub>2</sub>; 4 mM de dNTP; 50 ng

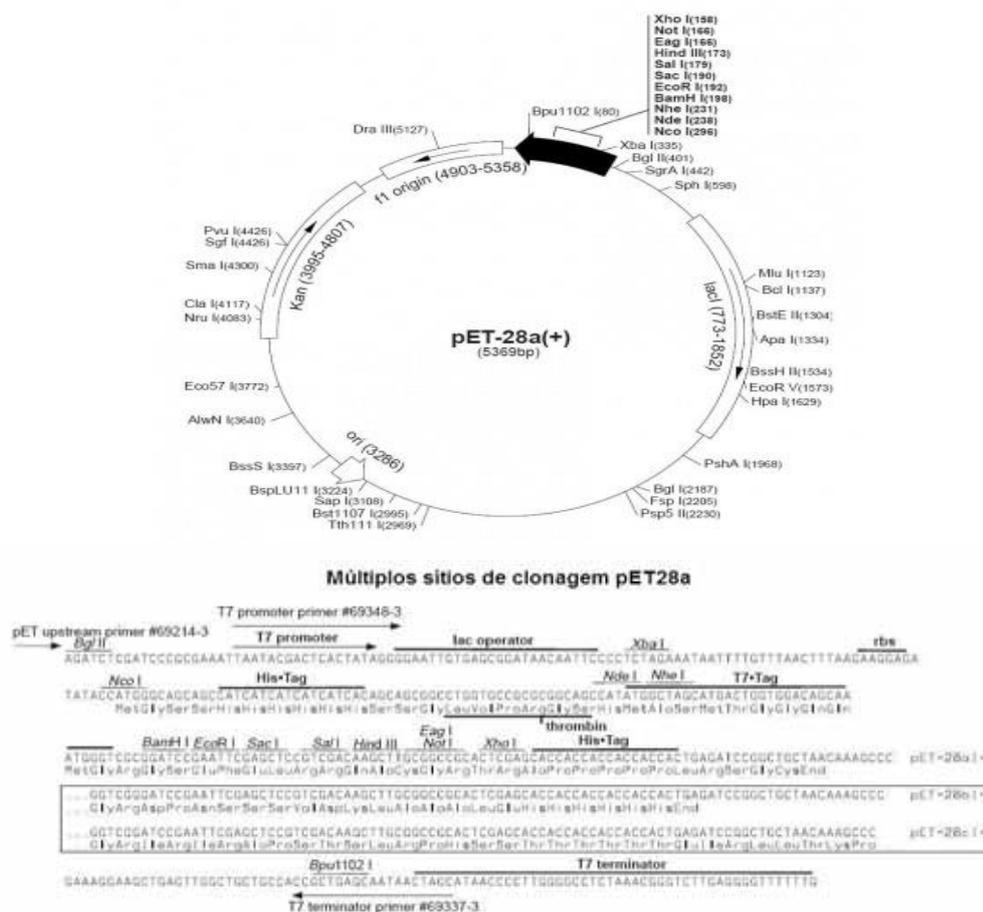
de DNA plasmidial do subclone PI01.A03; 50 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*); 1 U da enzima “Pfu” DNA Polimerase (Fermentas) e água filtrada para totalizar o volume final de reação de 20  $\mu$ L. As reações foram submetidas ao seguinte programa no termociclador: desnaturação a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de 95 °C por 45 s, 61 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e 30 s; extensão final a 72 °C por 5 min e estocadas a 4 °C.

Após as reações serem concluídas alíquotas de 3  $\mu$ L foram aplicadas em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL), a fim de visualizar a amplificação dos produtos de PCR (item 3.2). Para eliminar bandas inespecíficas todo o produto de PCR obtido foi submetido à eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 1%, isento de brometo de etídeo, sendo a região correspondente às bandas de interesse cortadas e retiradas do restante do gel. A eluição da banda selecionada foi feita seguindo as orientações do fabricante com o kit Wizard Plus SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA).

#### **3.4.2 Reação de Ligação do Inseto ao Vetor**

Depois da purificação, os fragmentos obtidos na PCR foram digeridos com as enzimas de restrição NdeI e XhoI de acordo com a construção dos oligonucleotídeos. O vetor pET28a também foi digerido com as enzimas de restrição utilizadas no inserto e desfosforilado com a enzima “Shrimp Alkaline Phosphatase” (SAP) (Fermentas) de modo a apresentar extremidades compatíveis com as do fragmento amplificado por PCR.

Após o preparo, vetor e inserto foram submetidos à reação de ligação para produção do DNA recombinante, realizada seguindo o protocolo de Sambrook e Russel (2001), utilizando T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos da América) na proporção 3:1 (inserto:vetor), resultando na construção pET28a-ORF2.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pET28a (Novagen).

### 3.4.3 Transformação das células de *Escherichia coli*

O resultado da reação de ligação foi utilizado para transformação da linhagem celular *Escherichia coli* BL21(D3). Na reação foi utilizado 20  $\mu$ L do DNA ligado e 200  $\mu$ L da célula competente BL21(D3). A transformação foi feita através de choque térmico, assim, a reação ficou 5 minutos no gelo, logo em seguida foi colocada a 42  $^{\circ}$ C por 90 segundos e recolocada no gelo por 2 minutos. Depois da transformação bacteriana foi adicionado 970  $\mu$ L de meio SOC (Triptona, Extrato de levedura, NaCl 1M, KCl 1M,  $Mg^{2+}$  2M e Glicose 2M) e o cultivo foi colocado sob agitação de 250 rpm a 37  $^{\circ}$ C, por 1 hora e 30 minutos. Após este período, uma alíquota de 118  $\mu$ L da cultura foi distribuída, com alça de Drigalski esterelizada, em placas de Petri contendo meio LB com 50  $\mu$ g/mL de canamicina. As placas foram incubadas por 16 horas a 37  $^{\circ}$ C.

#### **3.4.4 Coleta e estoque dos clones e extração plasmidial pET28a-orf2**

Foram coletados aleatoriamente seis clones da clonagem pET28a-orf2. A coleta foi feita com palitos de madeira e colocados em tubo do tipo falcon contendo 5 mL de meio LB com 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  canamicina. Os tubos foram incubados sob agitação orbital a 230 rpm, 37 °C, por 20 horas. Após este período, uma alíquota de 800  $\mu\text{L}$  da cultura foi transferida para tubo criogênico contendo 200  $\mu\text{L}$  de glicerol 40% esterelizado. Os tubos foram estocados a  $-80$  °C.

A extração foi feita com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) seguindo as orientações do fabricante e quantificado em gel de agarose 0,8% conforme item 3.2.

#### **3.4.5 Confirmação da Clonagem e Sequenciamento**

A confirmação da clonagem foi feita através da reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos, descritos no item 3.4 e a visualização do resultado foi feita eletroforese em gel de agarose 1%, ver item 3.2.

O gene clonado foi checado quanto à presença de mutações através do sequenciamento. Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram os específicos para pET28a, T7, nas seguintes condições: 1  $\mu\text{L}$  de BigDye Terminator (Applied Biosystems); 3  $\mu\text{L}$  de Tampão 5X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ); 5 pmoles do oligonucleotídeo (“forward” ou “reverse”); 100 ng de DNA e água Milli-Q filtrada em filtro 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore, Billeria, Massachusetts, Estados Unidos da América) para completar o volume de 10  $\mu\text{L}$ . Após o sequenciamento, os eletroferogramas dos clones foram analisados conforme descrito no item 3.3.

#### **3.5 Expressão e Extração da proteína ORF2**

Inicialmente foram realizados testes de expressão de proteína na célula hospedeira *Escherichia coli* BL21(D3). Para isso uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de meio LB com canamicina a 50 µg/mL e permaneceu sob agitação durante 16 horas, 37 °C, a 200 rpm. Uma alíquota de 2 mL foi inoculada em frasco contendo 200 mL de meio LB com canamicina 50 µg/mL, que permaneceu sob agitação a 200 rpm, 37 °C, até atingir a fase logarítmica de crescimento, com D.O<sub>600nm</sub> entre 0,4 e 0,6. A indução foi feita adicionando 0,1 mM de IPTG à cultura, que permaneceu nas condições descritas por 6 horas.

Para analisar a expressão da proteína de interesse em comparação às proteínas totais, foram coletadas alíquotas de 1 mL da cultura no tempo zero (T<sub>0</sub> - antes da indução), no tempo 2 (T<sub>2</sub> - 2 horas após a indução), no tempo 4 (T<sub>4</sub> - 4 horas após a indução) e no tempo 6 (T<sub>6</sub> - 6 horas após a indução) e centrifugadas por 5 min a 12000 rpm. Após confirmar a expressão, diferentes condições foram testadas, com variações na temperatura, tempo de incubação, aeração (volume de meio de cultura por frasco tipo Erlenmeyer) e concentração de IPTG. Uma vez determinada a melhor condição de expressão, ensaios de expressão em volumes maiores foram realizados, seguindo o procedimento descrito anteriormente.

Outra condição testada foi a 22°C, 200 rpm e após atingir fase logarítmica de crescimento, com D.O<sub>600nm</sub> entre 0,4 e 0,6. A indução foi feita adicionando 0,1 mM de IPTG à cultura, que permaneceu nas condições descritas por 24 horas. Alíquotas de 1 mL da cultura foram coletadas no tempo zero (T<sub>0</sub> - antes da indução), no tempo 24 (T<sub>24</sub> - 24 horas após a indução) e centrifugadas para posterior análise da expressão.

Para a extração da proteína o meio de cultura foi centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. O *pellet* celular foi ressuscitado em 10 mL do tampão de lise por litro de cultura [50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM de NaCl, 10 % (v/v) Glicerol] acrescido de 10 mg/mL de lisozima. Após serem mantidas no gelo por 30 minutos as amostras foram submetidas à lise com sonicador em aparelho Branson Sonifier 250, com 30% da razão cíclica por até 3 minutos com intervalos de 20 segundos. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 4°C, 18000 rpm, para separação de extratos solúveis e insolúveis. O extrato insolúvel foi ressuscitado no Tampão B (Tampão A acrescido de 2% de Triton X-100), 5 mL por litro de cultura, seguido de

um novo ciclo de lise através do sonicador e centrifugação nas mesmas condições anteriores.

### **3.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE**

A análise da expressão das proteínas foi realizada através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% - SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), com o sistema mini-protean (Bio-Rad, Estados Unidos da América). A corrida foi realizada a 30 mA, com o tampão de corrida Tris-Glicina [50 mM de Tris-HCl; 150 mM de Glicina e 0,1% de SDS (p/v)]. O preparo das amostras foi realizado com a adição de 4 µL do tampão de amostra 2X e fervura por 10 minutos a 95 °C e o gel foi corado com “Coomassie Brilliant Blue” [40% de metanol (v/v); 10% de ácido acético glacial (v/v) e “Coomassie” R-250 a 0,1% (p/v)] e descorado em solução contendo 10% de ácido acético (v/v) e 10% de etanol (v/v).

### **3.7 Purificação da Proteína Recombinante**

Os extratos solúveis foram purificados pelo método de cromatografia por afinidade a metal com resina carregada com níquel, Ni-NTA Agarose (Qiagen). A resina é carregada com níquel, permitindo a purificação de proteínas com cauda de histidina (6xHisTag). Assim, após lavagem da resina para retirar o etanol, foi acrescentado solução de Tris-HCl pH 8 contendo 20mM de Imidazol para equilibrar a resina e a coluna de polipropileno (Bio-Rad) também foi lavada com essa solução para equilibrar o sistema de purificação. A eluição da proteína se deu através de gradiente de imidazol (de 20 mM a 1M), que também possui afinidade pelo níquel, ele compete com os aminoácidos da histidina pela ligação à resina e possibilita a eluição da proteína. As frações obtidas correspondentes às frações foram estocadas a 4 °C para posterior análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, conforme descrito no item 3.6.

### 3.8 Zimograma

Como o gel apresentou várias bandas, foi utilizado o zimograma, que tem a função de verificar qual delas apresentava atividade.

A atividade lipolítica nas bandas da proteína recombinante do gel de SDS-PAGE foi detectada usando Tributirina como substrato, de acordo com o protocolo (OH et al., 1999), mas algumas modificações foram feitas: a amostra aplicada no gel não foi previamente fervida, o tampão de amostra não continha  $\beta$ -mercaptoetanol e o SDS foi removido após a eletroforese com agitação suave do gel por 10 minutos em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) contendo 1% de Triton X-100 e duas vezes em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) isento de detergente. Posteriormente, o gel foi colocado sob uma emulsão de ágar com Tributirina para detecção da atividade lipolítica e incubado a 30°C até o aparecimento dos halos de hidrólise (GLOGAUER et.al., 2011).

A emulsão de ágar com o substrato foi preparada com 1,3% (m/v) de ágar, 1% (v/v) de Tributirina, 25 mM Tris-HCl pH 8 e 0,5% de goma arábica . Uma metade do gel de eletroforese foi utilizada para o zimograma enquanto a outra metade foi corada com “Coomassie Brilliant Blue” para localizar qual banda apresentava atividade (OH et al., 1999; GLOGAUER et.al., 2011).

### 3.9 Análise *in silico* da proteína orf2

A modelagem molecular da proteína orf2 foi realizada a partir da estrutura molde com maior similaridade estrutural, através da análise comparativa com o BLAST *versus* Protein Data Bank (PDB). As coordenadas atômicas das estruturas foram usadas para modelagem comparativa por satisfação de restrições espaciais utilizando-se o programa Modeller (SALI; BLUNDELL, 1993) e o modelo final selecionado com base na qualidade estereoquímica total. Para o preparo das figuras e análises finais foi utilizado o programa Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC).

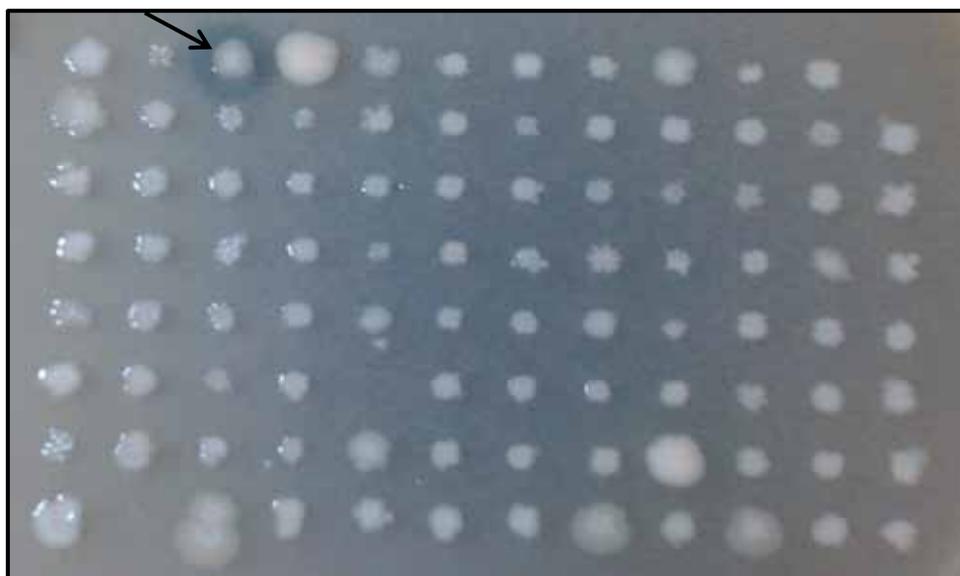
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise *in vitro* de produção de enzimas lipolíticas nos subclones da biblioteca metagenômica

Entre os 30 clones positivos identificados anteriormente no trabalho de dissertação de Pereira (2011), o clone PI40.B09 foi selecionado para ser subclonado.

A triagem feita na biblioteca foi realizada através de expressão funcional permitindo a descoberta de novos genes (ELEND et al., 2006; HU et.al.,2010). O alto número de clones com atividade lipolítica pode também estar relacionado com a amostra ambiental da qual foi construída a biblioteca (consórcio microbiano extraído de um solo contaminado com lubrificantes), conferindo um enriquecimento de micro-organismos lipolíticos (LIAW et al. 2010).

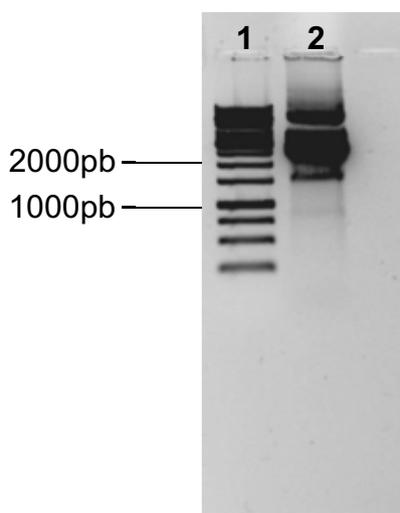
Após a construção da sub-biblioteca, esta também foi submetida ao teste bioquímico nos 480 subclones, gerando um subclone positivo denominado PL01.A03 (Figura 3).



**Figura 3.** Análise *in vitro* da sub-biblioteca metagenômica com o meio de cultura LB suplementado com 1% de tributirina (v/v); 1% de goma arábica (p/v); 0,001% de arabinose (v/v) e ampicilina 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (v/v). O subclone PL01.A03 hidrolisou o substrato e formou halo límpido ao redor da colônia (seta).

## 4.2 Extração e Quantificação Plasmidial do Subclone PL01.A03

O DNA plasmidial do subclone foi extraído para ser utilizado para clonagem. Após a extração ele foi avaliado em gel de agarose 0,8% (Figura 4) e quantificado em NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, a concentração obtida foi igual a 898 ng/μl e um grau de pureza de 1,89 na faixa de leitura de 260/280nm, indicando a ausência de contaminação por proteínas.



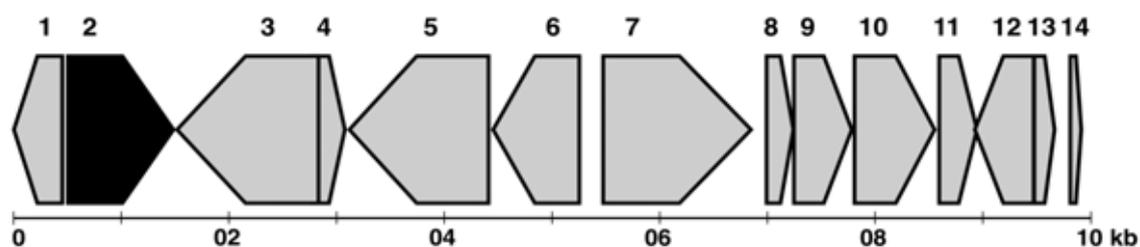
**Figura 4.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da extração do DNA plasmidial do subclone PL01.A03 1- Marcador de tamanho molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – DNA do subclone PL01.A03.

## 4.3 Análise das Sequências

Após o sequenciamento do subclone as sequências foram analisadas e se agruparam em um “contig” formado por 9914 pb que foi comparado através do programa ORF Finder do NCBI. Foram geradas 50 ORFs e todas foram analisadas, principalmente quanto a *Max score*, *Query coverage* e *E-value*. Sendo possível através desta análise, selecionar 14 ORFs e identificar a frame de leitura onde cada uma está localizada; determinar o início e término da ORF; aferir o tamanho em nucleotídeos e aminoácidos; e predizer qual o seu papel biológico, conforme demonstrado na Tabela 3. Todas as ORFs, selecionadas foram representadas através de um mapa físico ilustrado na Figura 5.

**Tabela 3-** Predição das ORFs identificadas no “contig” do subclone PI01.A03. As ORFs descritas quanto à possível função e micro-organismo de origem, levando em consideração a identidade (em porcentagem) e o *E-value*. Em cinza destaca-se a ORF2, com 94% de identidade com a hidrolase de *Pseudomonas*.

ORF Nº	ORF Início/ Final	ORF (pb)	ORF (aa)	Descrição	Micro-Organismo/Nº de Acesso	Identidade %	<i>E-value</i>
1	3-452	450	149	Proteína hipotética	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (WP_017520998.1)	87%	1e-40
2	505-1485	980	344	Hidrolase	<i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC 13867 (YP_007656829.1)	94%	0.0
3	1518-2831	1314	437	MFS transportador	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (WP_017522241.1)	97%	0.0
4	2752-3057	305	105	Proteína hipotética	<i>Sphingobium</i> sp. AP49 (WP_007715020.1)	35%	0.45
5	3118-4410	1293	430	Proteína hipotética	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (WP_017522240.1)	97%	0.0
6	4453-5253	801	266	citocromo C proteína de montagem	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (WP_017522239.1)	98%	2e-180
7	5475-6848	1374	457	Partícula de proteína de reconhecimento Srp54]	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (WP_017522238.1)	99%	0.0
8	6993-7241	249	82	30S Proteína Ribossomal S16	<i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC 13867 (YP_007659143.1)	98%	1e-51
9	7247-7783	537	178	16S rRNA-processing protein RimM	<i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC 13867 (YP_007659142.1)	97%	1e-121
10	7809-8552	744	247	tRNA (guanina-N(1)-) metiltransferase	<i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC 13867 (YP_007659141.1)	99%	1e-178
11	8596-8946	351	116	50S Proteína Ribossomal L19	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (WP_017522234.1)	100%	2e-76
12	8927-9472	546	181	RtcB proteína	<i>Deinococcus gobiensis</i> I-0 (YP_006262130.1)	29%	2.4
13	9478-9666	189	62	Proteína hipotética	<i>Mesorhizobium</i> sp. (WP_023774403.1)	32%	2.1
14	9813-9913	102	33	CCR4-NOT transcrição do complexo subunidade1 isoforma b	<i>Homo sapiens</i> (NP_996882.1)	68%	7.2



**Figura 5.** Mapa físico das ORFs selecionadas, gerado pelo programa Pages'09, versão 4.04 (Apple Inc., Cupertino, Califórnia, Estados Unidos da América), Foi selecionada a orf2 no "contig", (em preto), corresponde ao gene codificador de enzima lipolítica.

Como pode ser visto na Tabela 3 a identidade da primeira sequência encontrada foi alta, 94%, mas estudos de caracterização desta sequência não foram publicados. Uma justificativa para tal fato é que apesar das descobertas interessantes de novas enzimas lipolíticas com o metagenoma, a maioria delas permanece não caracterizadas. Desde o primeiro ensaio de bioprospecção em 2000 até 2009, foram identificados 76 clones positivos para esterases ou lipases, mas apenas 11 foram superexpressas e purificadas, para ensaios posteriores, como caracterização bioquímica (STEELE et al., 2009). O mesmo autor também relatada que novas enzimas são descobertas com testes de triagem, mas poucas são completamente caracterizadas devido ao esforço necessário, o que impede a aplicação potencial destes biocatalisadores em indústrias biotecnológicas.

Um exemplo disso é a esterase em estudo no trabalho de Rao et. al. (2013) que apresentou identidade acima de 70 % com outras disponíveis no banco de dados, porém, a caracterização da estabilidade térmica indicou diferenças significativas, mostrando que a diferença na composição de aminoácidos, mesmo que pequena, representa modificações significativas no modo de ação da enzima.

Após os resultados obtidos e a análise apurada de todas as ORFs foi possível encontrar através do BLASTP (Non-redundant protein sequence - nr) uma ORF codificadora com 94% de identidade com a hidrolase do micro-organismo *Pseudomonas denitrificans* (YP\_007656829.1), seguido de duas alfa/beta hidrolases com identidade 99% e 81% respectivamente e por último uma hidrolase putativa com 81% de identidade mostrados da Tabela 4.

**Tabela 4** - Análise, através do BLASTP (Non-redundant protein sequence - nr), da orf2 possível codificadora de enzimas lipolíticas encontrada no “contig” referente ao clone PI40.B09. Foram colocados os quatro primeiros resultados fornecidos pelo NCBI.

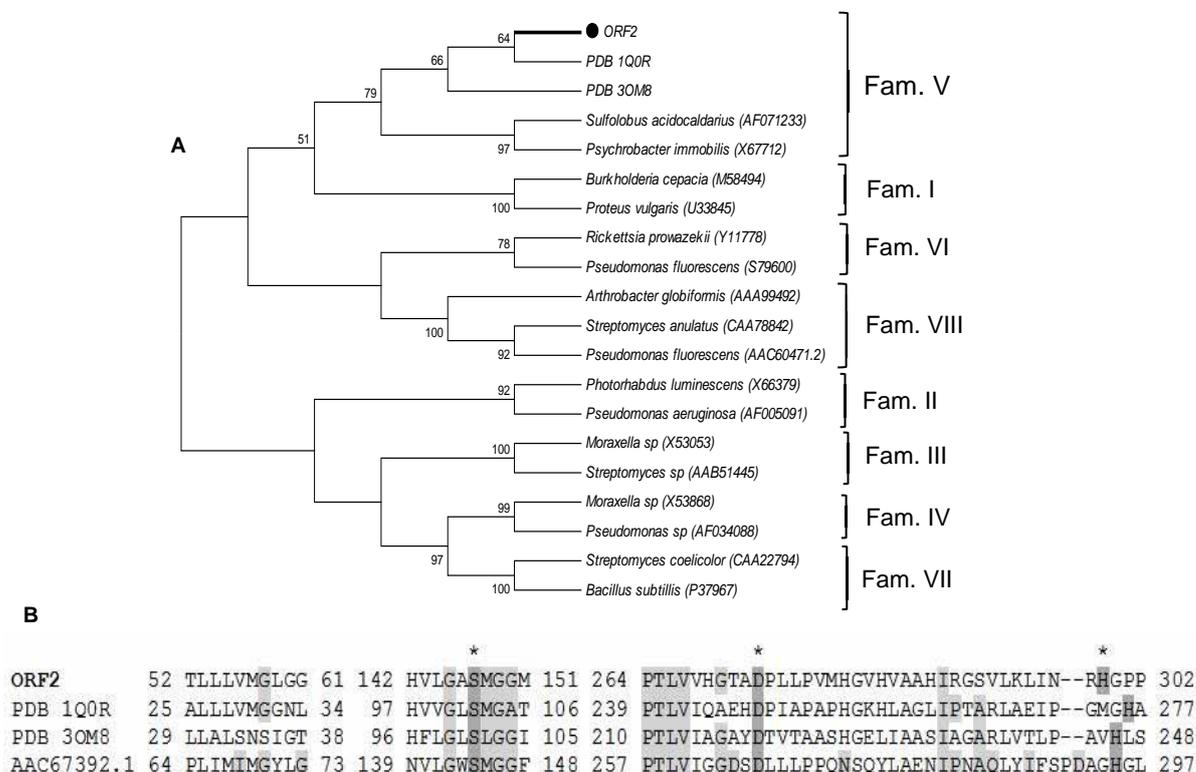
Predição	Organismo	Número de Acesso	Identidade (%)	Query coverage (%)	E-value
Hidrolase	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	YP_007656829.1	94	72	0.0
Alfa/beta hidrolase	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	WP_017520999.1	99	65	0.0
Alfa/beta hidrolase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ETV29551.1	81	80	5e-179
Hidrolase Putativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	YP_001346941.1	81	80	8e-179

Nas Tabelas mostradas acima é possível observar a presença do gênero *Pseudomonas* em grande quantidade. O motivo deste resultado vai de encontro a outros estudos que mostram a frequência deste gênero em solos contaminados com hidrocarbonetos (WUNSCHE et al., 1995, HIGASHIOKA, et al. 2009; PIRÔLLO et. al., 2008), devido a sua eficiência na degradação deste substrato (WHYTE et al. 1997, OBUEKWE, et al. 2008; BISHNOI, et. al., 2009). Isto ocorre porque grande quantidade de espécies de *Pseudomonas* tem a capacidade de utilizar como fonte de carbono, hidrocarbonetos de petróleo (WHYTE et al. 1997; YUSTE et al. 2000; DINKLA et al. 2001).

#### 4.4 Identificação da família lipolítica a qual orf2 está inserida

Após as análises das ORFs e identificação no mapa gênico, foram feitas análises dos alinhamentos, usando o ClustalW através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor. As relações filogenéticas foram construídas com o auxílio do programa Mega 5, usando sequências que representassem as oito famílias lipolíticas (Figura 6A). Foram feitos diferentes alinhamentos e construções

filogenéticas, sendo as sequências utilizadas extraídas dos trabalhos de Arpigny e Jaeger (1999) (Figura 6 A e B).



**Figura 6. (A)** Dendrograma do agrupamento hierárquico baseado nas sequências de membros das famílias lipolíticas obtidas do NCBI (números de acesso indicados), mostrando a relação filogenética da proteína orf2 indicada com círculo sólido (●), encontrada em parte do “contig” do clone PL40.B09. Análise com *bootstrap* de 1000, sendo que valores menores que 50 não são mostrados. **(B)** Alinhamento da sequência da orf2 com as sequências de aminoácidos de representantes da família V. As regiões cinza claro representam as regiões conservadas das enzimas lipolíticas; (\*) Possíveis resíduos de aminoácidos envolvidos na tríade catalítica (cinza escuro).

As enzimas lipolíticas têm sido classificadas em famílias e subfamílias a fim de identificar as sequências de motivos conservados característicos, e relacioná-los a elementos estruturais de terceira dimensão envolvidos no reconhecimento do substrato e catálise que é essencial para a compreensão da função das enzimas (ARPIGNY E JAEGER, 1999). Assim, por meio da análise da árvore filogenética é

possível observar que a orf2 ficou em um ramo único, entre os membros da família V, sugerindo que ela pertence a esta família.

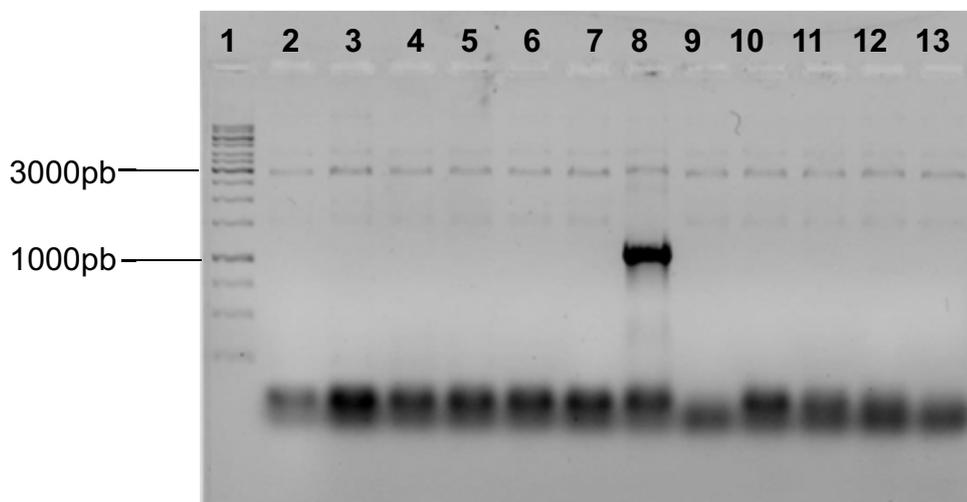
Os membros da família V possuem estruturas similares à dehalogenases, haloperoxidases e epóxido hidrolases, exibindo folha alfa/beta hidrolase como característica de estrutura terciária. Os blocos conservados GXSMGG, PTLV e HG são característicos nos membros da família V, sendo que, é possível encontrar os sítios catalíticos nestes blocos (ARPIGNY e JAEGER, 1999). O alinhamento foi feito com as sequências alguns membros da família V, *Streptomyces purpurascens* (1Q0R), *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (3OM8) e *Sulfolobus acidocaldarius* (AAC67392) mostrado na Figura 6B. Nele é possível identificar os resíduos de aminoácidos do sítio ativo que é composto pela serina, que está no motivo conservado GXSMGG, comum às alfa-beta hidrolases, além dos resíduos de aminoácidos do aspartato e histidina <Ser147-Asp273-His299>, confirmando que a proteína orf2 é um representante da família V. Como visto na Figura 6B, o sítio da histidina variou entre as sequências, mostrando que há diferenças entre elas. A histidina é o único resíduo da tríade que é absolutamente conservada, entretanto, a forma e o comprimento do local que ela está contida pode diferir consideravelmente entre os vários membros da família (NARDINI e DIJSTRA, 1999). Com isto, novas famílias e subfamílias têm sido propostas, baseadas em trocas de aminoácidos nos sítios catalíticos ou por sequências conservadas (JEON et. al., 2012 NACKE et. al.,2011; ZHANG et. al.,2013).

## **4.5 Clonagem do gene em vetor de expressão pET28a**

### **4.5.1 Amplificação do gene de interesse**

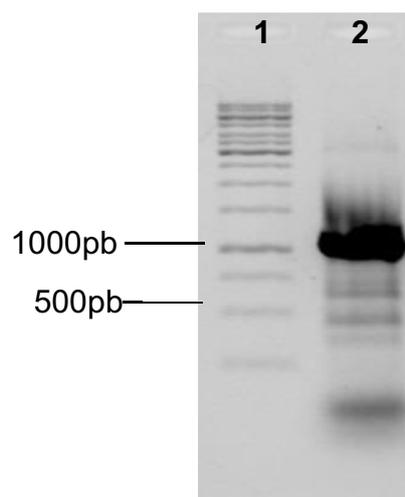
Para determinar a melhor temperatura de pareamento, as reações de PCR, foram submetidas à termociclador de gradiente (Biometra), com as temperaturas variando de 50°C até 70°C.

Através da análise em gel de agarose foi possível selecionar a temperatura 61°C (Figura 7). Esta temperatura foi escolhida, pois propiciou a amplificação da região de interesse, de 1032pb.

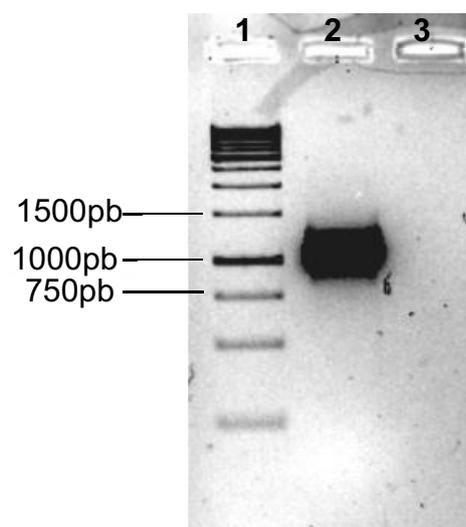


**Figura 7.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% mostrando padronização da temperatura de pareamento das reações de PCR em termociclador de gradiente (Biometra). 1- Marcador de tamanho molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 a 13- Variação da temperatura de pareamento (50 °C a 70 °C).

Após estabelecer a melhor temperatura para o pareamento, o fragmento foi amplificado com a enzima “Pfu” DNA Polimerase, que possui alta confiabilidade (Figura 8). Como pode ser visto, após a amplificação houve a presença de bandas que não eram de interesse, portanto, o produto de PCR foi submetido à preparativa, para eliminar bandas inespecíficas, e purificado através do kit Wizard Plus SV Gel and PCR Clean-Up System (Figura 9), o resultado foi a presença de apenas uma banda na região de interesse, que foi utilizada para a clonagem.



**Figura 8.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amplificação da orf2 em reação de PCR com a enzima “Pfu” DNA Polimerase 1- Marcador de tamanho molecular 1kb



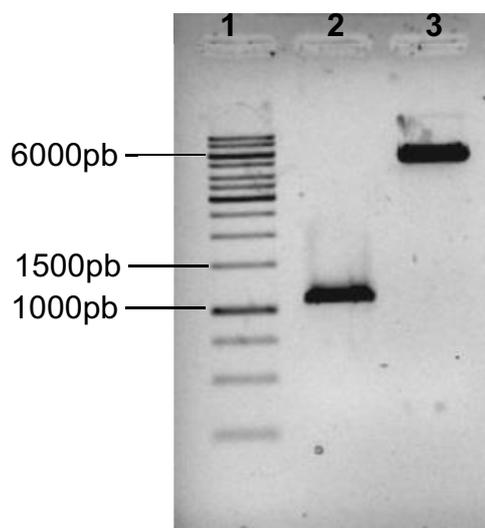
**Figura 9.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% do inserto purificado após preparativa. 1- Marcador de tamanho molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2- Produto de PCR purificado; 3- Canaleta Vazia

#### 4.5.2 Obtenção da construção pET28a-orf2 e transformação em células de *Escherichia coli* BL21(D3)

O produto de PCR purificado foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e XhoI. Após a reação os materiais genéticos foram novamente purificados para eliminar restos de reação que poderiam afetar a ligação (Figura 10). A quantificação no NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer permitiu verificar a concentração de 19,5 ng/μL e relação 260/280nm de 1,87, indicando ausência de contaminação com proteínas.

O produto da digestão foi utilizado na reação de ligação com o vetor, já digerido e desfosforilado, posteriormente, os plasmídeos recombinantes foram transformados na célula competente *Escherichia coli* BL21(D3).

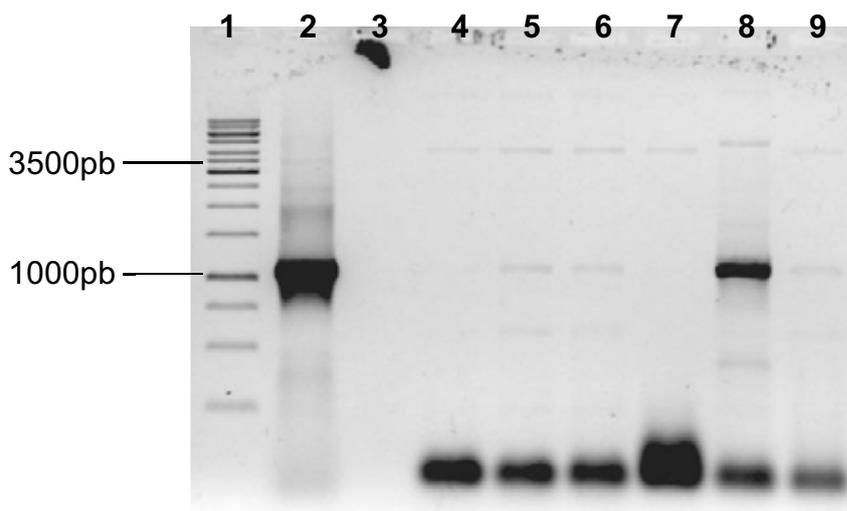
Foram coletados seis clones que após o cultivo foram estocados a -80 °C.



**Figura 10.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% mostrando inserto e vetor purificados para clonagem. 1- Marcador de tamanho molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2- Produto de PCR digerido e purificado; 3- Vetor pEt28a

#### 4.5.3 Extração do DNA plasmidial pET28a-orf2 e confirmação da clonagem

Foi realizada a extração do DNA plasmidial dos seis clones coletados da construção pET28a-orf2 e o material obtido foi submetido à PCR com os oligonucleotídeos específicos (item 3.4.1) (Figura 11).



**Figura 11.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% para confirmar a presença do inserto referente à orf2 1- Marcador de tamanho molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2- Controle Positivo; 3- Canaleta vazia; 4-9 – PCRs referentes aos clones coletados da transformação, ênfase para a canaleta 8 onde houve amplificação, confirmando a clonagem.

A análise do perfil eletroforético em gel de agarose possibilitou verificar que dos seis clones coletados da construção pET28-orf2 um teve amplificação da região de interesse (Figura 11). Os que não tiveram amplificação foram descartados. O material genético da orf2 foi sequenciado, sendo possível concluir que a clonagem foi bem sucedida, visto que o inserto estava corretamente ligado ao vetor de expressão.

#### 4.6 Expressão e Extração da Proteína orf2

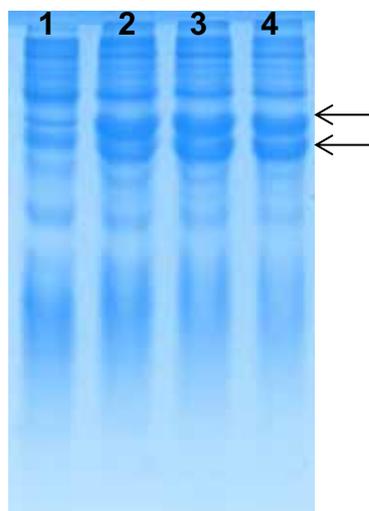
Análises iniciais das propriedades da proteína, como peso molecular e potencial isoelétrico (pI), foram feitas por meio da ferramenta ProtParam –

([web.expasy.org/protparam](http://web.expasy.org/protparam)) (GASTEIGER et. al., 2005). Os parâmetros obtidos são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Características físico-químicas da orf2 obtidos a partir do ProtParam

	<b>Clonado em pET28a</b>	<b>orf2</b>
	Nº. aa	344
	kDa	37.1
ProtParam	Coefficiente de Extinção	21680
	Abs 0.1% (=1 g/L)	
	pI	8.80

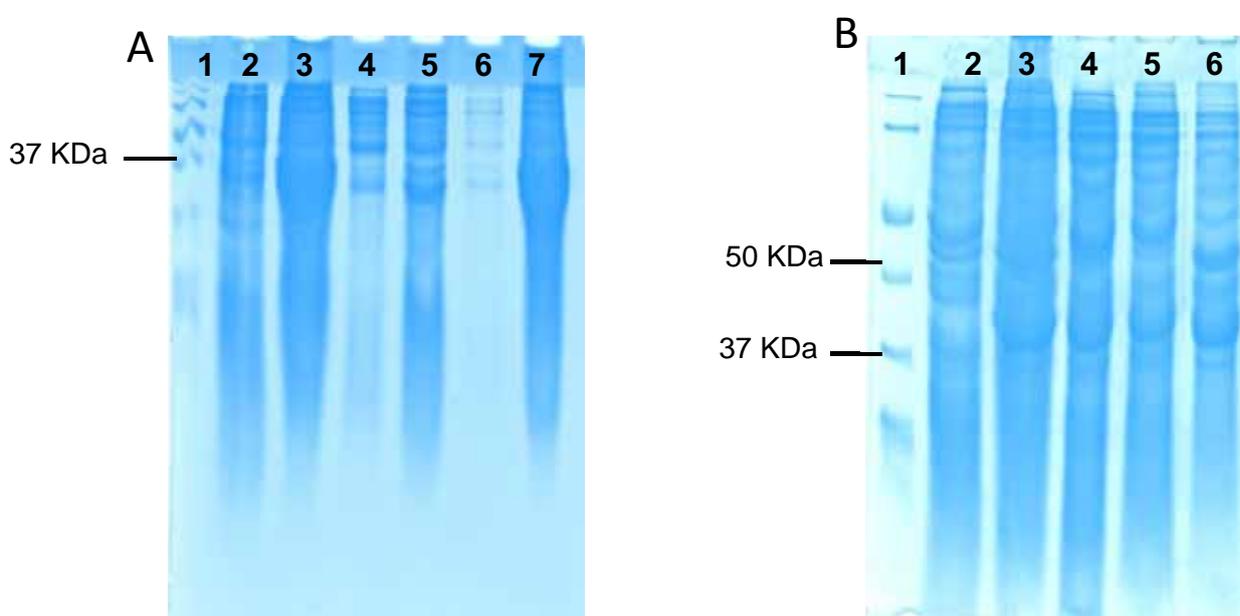
O teste inicial de expressão foi conduzido a 37°C, 0,1mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1tio-galactopiranosidio) e agitação orbital a 200 rpm. Para analisar os testes de expressão, alíquotas de 1 mL de extrato celular antes da indução (T0) e 1mL de extrato celular induzido (T2, T4 e T6) foram coletadas e centrifugadas a 12000 rpm para serem aplicadas em gel de poliacrilamida 12 %. Na Figura 12, é possível observar a expressão ao comparar as bandas do extrato celular antes da indução com aquelas dos extratos celulares após a indução.



**Figura 12.** Teste de Expressão. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com “Coomassie Brilliant Blue”. 1- Extrato total de células não induzidas (T0); 2- Extrato total de células induzidas expressando a proteína orf2 após 2 horas (T2); 3- Extrato total de células induzidas expressando a proteína orf2 após 4 horas (T4); 4- Extrato total de células induzidas expressando a proteína orf2 após 6 horas (T6).

A partir da confirmação da expressão da proteína, ela foi superexpressa em 2 litros de meio de cultura nas condições descritas anteriormente, utilizando como tempo de indução 4 horas. Após a indução procedeu-se com a extração a fim de obtê-la na fração solúvel. A extração se deu até o terceiro extrato utilizando o tampão A descrito no item 3.5. Neste teste, grande parte da proteína permaneceu na fração insolúvel (*pellet*) (Figura 13A).

Para obter a proteína na fração solúvel foi testada outra condição, a 22°C por 24 horas com 0,1mM IPTG e para a extração utilizou-se o tampão A e o tampão B, item 3.5, a extração foi feita até o segundo extrato (Figura 13B).



**Figura 13.** Análise da expressão e solubilidade em diferentes condições da orf2 evidenciada em SDS-PAGE 10%, corado com “Coomassie Brilliant Blue”.

**(A):** 1- Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Unstained (Bio-Rad, Hercules, Califórnia); 2- Extrato total de células não induzidas (T0); 3- Extrato total de células induzidas expressando a proteína orf2 após 4 horas (T4); 4 a 6- Extratos celulares solúveis; 7- Extratos celulares insolúveis (*pellet*).

**(B):** 1- Marcador de Peso Molecular Precision Plus Protein Unstained (Bio-Rad, Hercules, Califórnia); 2- Extrato total de células não induzidas (T0); 3- Extrato total de células induzidas expressando a proteína orf2 após 24 horas (Tf); 4 e 5- Extratos celulares solúveis; 6- Extratos celulares insolúveis (*pellet*).

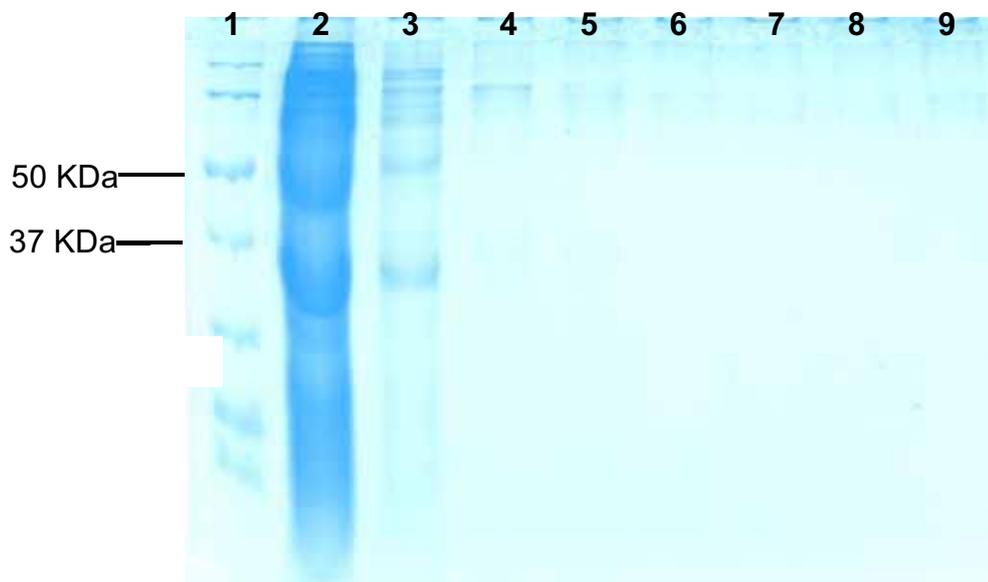
Através deste ensaio pode-se concluir que a expressão a 22 °C foi mais eficiente para deixar a proteína na forma solúvel, visto que no *pellet* houve menor quantidade de proteína (Figura 13B) em relação ao teste a 37°C (Figura 13A). Com isso a expressão foi padronizada a 22°C, por 24 horas e com 0,1mM de IPTG. A

baixa concentração de IPTG durante a indução foi utilizada para impedir a formação de corpúsculos de inclusão (WU; SUN, 2009).

#### 4.7 Purificação da Proteína Recombinante

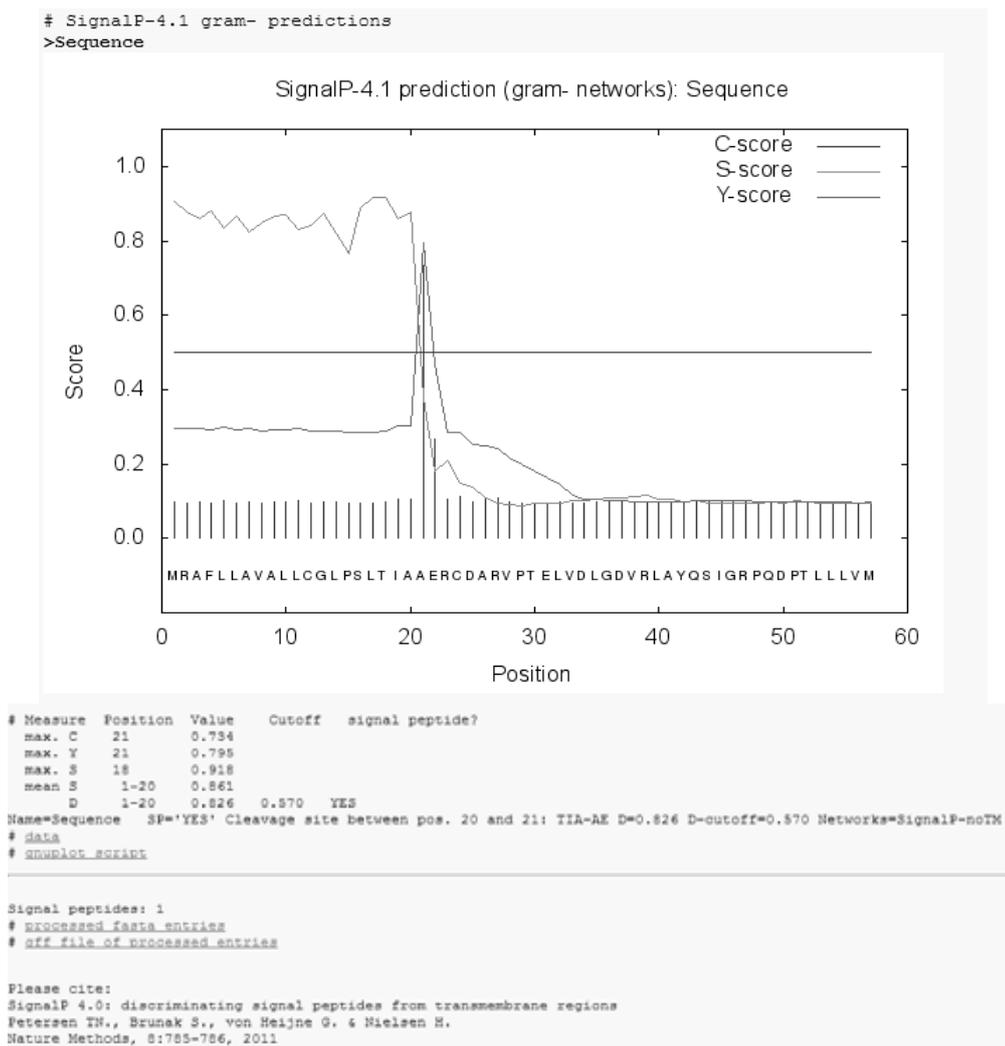
Após as condições de expressão serem estabelecidas, procedeu-se com a purificação da proteína, através da cromatografia de afinidade de metal imobilizado carregado com níquel como descrito no item 3.7.

Como pode ser visto na Figura 14, a proteína estava sendo eluída na fração do lavado referente às proteínas que não se ligaram à coluna (“Flow Through”- FT), ou seja, a proteína orf2 não estava se ligando a resina, como também pode ser verificado na Figura, indicado na canaleta 9, onde há a alíquota da resina utilizada e a proteína não se encontra, mostrando que ela não ficou retida após a eluição.



**Figura 14.** Análise da purificação da orf2 evidenciada em SDS-PAGE 10%, corado com “Coomassie Brilliant Blue”. 1- Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Unstained (Bio-Rad, Hercules, Califórnia). 2- Fração do lavado referente às proteínas que não se ligaram na coluna (FT); Canaletas 2 a 8: gradiente de eluição com Imidazol (Tampão de extração + 20mM; 50mM; 100mM; 200mM; 500mM e 1M de Imidazol, respectivamente); 9- alíquota da resina utilizada na purificação.

Uma justificativa para tal fato é que, na sequência de aminoácidos a qual a enzima é composta, há a presença de peptídeo sinal que afeta a solubilidade de proteínas expressas em *E. coli* (LEOW et. al.,2007). Na Figura 15 é possível verificar a análise referente à presença de peptídeo sinal, um indicativo para que a proteína não consiga se ligar à resina.

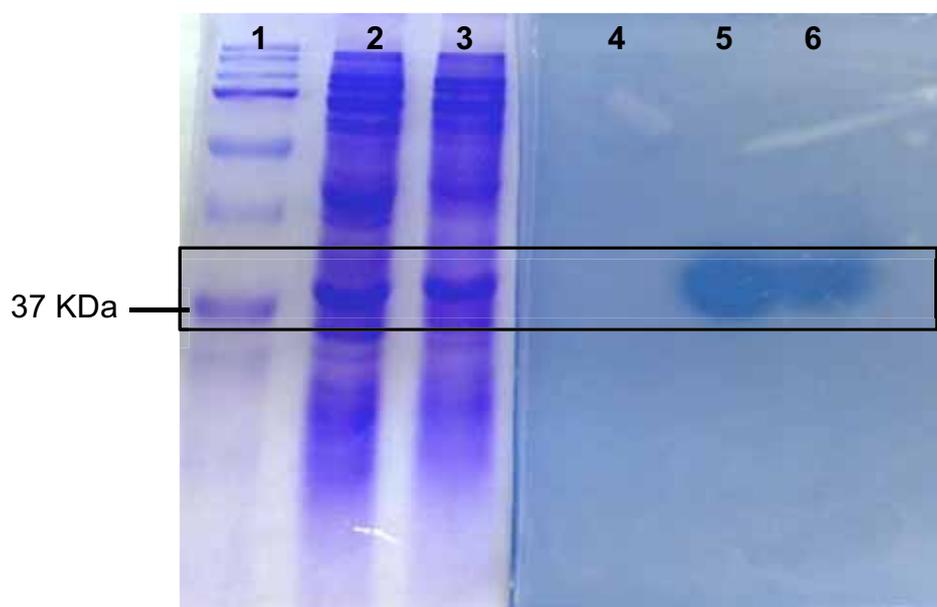


**Figura 15.** Análise de presença de peptídeo sinal na sequência da proteína *orf2* (SignalP 4.1 Server- CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>))

Uma solução para tal problema é a construção de um novo oligonucleotídeo eliminando essa sequência, uma nova clonagem e expressão.

## 4.8 Zimograma

O zimograma foi utilizado para identificar qual banda presente no gel realmente estava sendo expressa. Metade do gel foi corada com “Coomassie Brilliant Blue” e a outra metade foi colocada sobre a emulsão de ágar contendo Tributirina (item 3.8), o resultado é mostrado na Figura 16.



**Figura 16.** Zimograma 1- Marcador de Peso Molecular Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad, Hercules, Califórnia); 2- Primeiro extrato Solúvel; 3- Segundo Extrato Solúvel, 4- Marcador de Peso Molecular Precision Plus Protein Standards Dual Color; 5- Halo formado pelo primeiro extrato solúvel em Tributirina; 6- Halo formado pelo segundo extrato solúvel em Tributirina.

O aparecimento de resultados positivos de hidrólise, na região de massa molecular correspondente ao descrito anteriormente, revelou que a enzima se encontrava na forma ativa (GLOGAUER et.al., 2011).

#### 4.9 Análise *in silico* da proteína orf2

Para avaliar as características estruturais da proteína *orf2*, com as esterases e lipases com estrutura resolvida, foi construído o modelo estrutural baseado nas coordenadas estruturais de proteínas com maior homologia estrutural. A busca pelas estruturas moldes foi realizada através do BLAST da sequência da *orf2* contra o Banco de Dados de Proteínas (PDB - *Protein Data Bank*). A Tabela 6 apresenta a estrutura selecionada para a construção do modelo.

**Tabela 6** - Estrutura usada como molde para a construção do modelo da proteína *orf2*.

Função da estrutura molde	Código PDB	Organismo	(%) <i>Query cover</i>	(%) <i>identidade</i>	Referência
Aclacinomicina metilesterase	1Q0R	<i>Streptomyces purpurascens</i>	80	32	Jansson et al., 2003

É interessante notar que apesar da alta identidade que a *orf2* apresenta quando comparada no banco de dados de sequências de nucleotídeos, o mesmo não é verificado na comparação com as proteínas depositadas no PDB, sendo a maior identidade de 32% com aclacinomicina metilesterase (PDB 1Q0R) do micro-organismo *Streptomyces purpurascens* (Tabela 6).

O modelo final proposto para a proteína *orf2* mostra o arranjo elipsoidal formando por alfa-hélices e folhas betas, característico da família alfa beta hidrolase a qual as esterases e lipases são representantes (Figura 17 A e B).

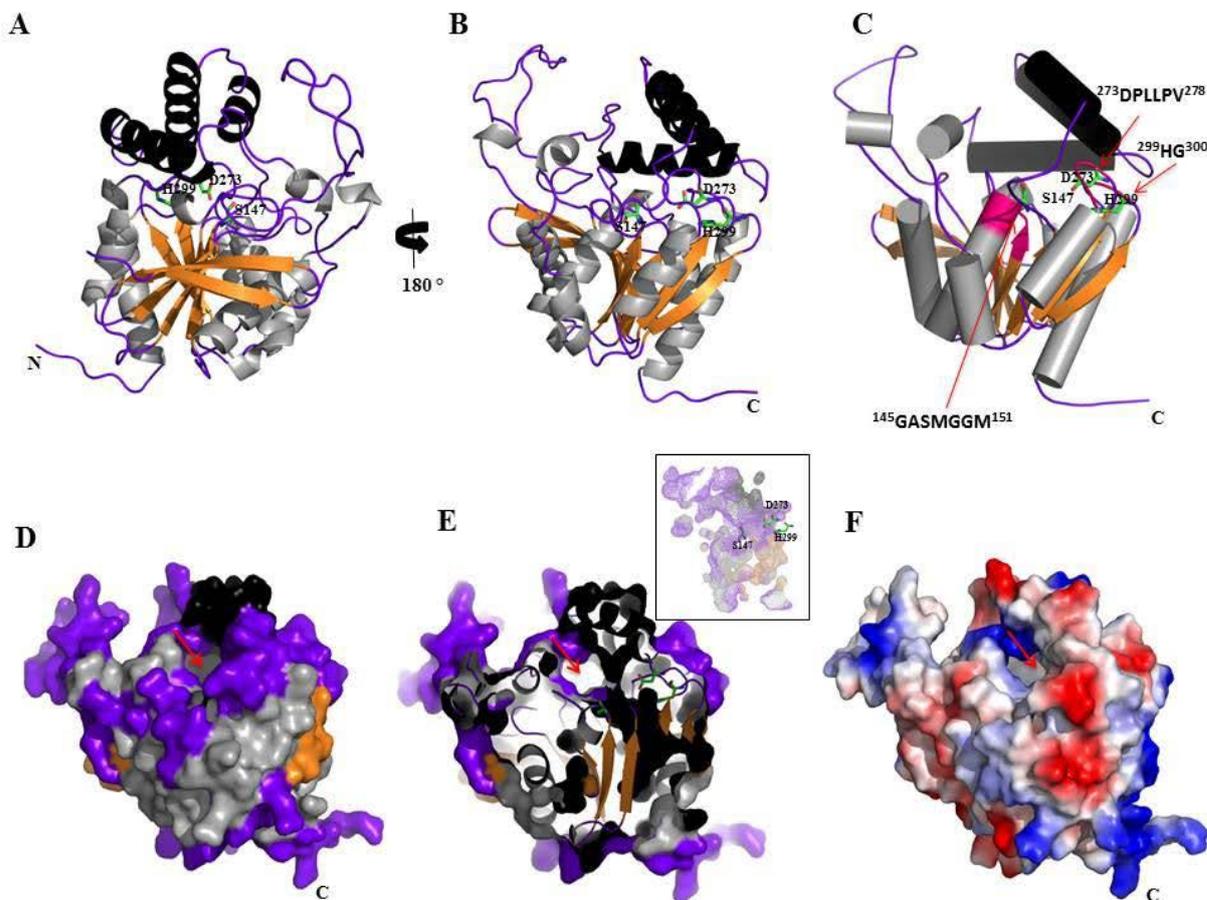
A *orf2* possui uma mistura de oito folhas beta, onde apenas a segunda folha beta é antiparalela, cercada por doze alfa-hélices: Leu83-His85; Asp88-Gln97; Pro135-Ser137; Leu142-Leu156; Met168-Arg183; Gln264-Ile268; Val275-R280; Met299-His307; Gli325-Thr342.

Hipotetiza-se que a proteína *orf2* apresente “small cap domain” composto por três alfa-hélices: Glu204-Arg212; Glu218-Gli233; Arg241-Ala255 (em preto, Figura 17 A - E). O “cap domain” está localizado em uma região superior à tríade catalítica, fato já verificado em outras esterases, e parece controlar a entrada dos substratos e

o reconhecimento dos mesmos, mantendo a integridade estrutural ao redor do bolsão de ligação (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

A atividade enzimática de quase todos os membros da família alfa beta hidrolase depende da tríade catalítica altamente conservada, que consiste em: Serina, Aspartado ou Glutamato e Histidina. Na orf2 foi possível identificar a tríade catalítica <Ser147-Asp273-His299> (“sticks” em verde, Figura 17 A, B, C e E), além dos motivos envolvidos na catálise, como <sup>145</sup>GXSMGGM<sup>151</sup>, <sup>273</sup>DPLLPV<sup>278</sup> e <sup>299</sup>HG<sup>300</sup> (em rosa, Figura 17C). Os resíduos da tríade catalítica, os detalhes do bolsão de ligação, assim como, a característica dos motivos conservados corroboram para que a orf2 seja considerada um membro da família V.

A análise do modelo da proteína orf2 possibilitou ainda, sugerir a entrada de acesso dos substratos (Figura 17, D e E), sendo possível verificar a grande cavidade interna (Figura 17 E), assim, espera-se que esta enzima seja capaz de hidrolisar longas cadeias de carbono. A análise do potencial eletrostático da proteína aponta o carácter hidrofílico na região interna do sítio de ligação da enzima (região cinza clara, Figura 17 F); e resíduos de carga positiva na região de ligação ao substrato (região azul, Figura 17F), que possivelmente fazem complementariedade eletrostática com os substratos (estergliceróis), que possuem carga negativa.



**Figura 17.** Modelo tridimensional da proteína orf2. (A) Representação em “cartoon” da estrutura com as alfa-hélices em cinza, as folhas beta em laranja 20 e loops em rosa. Os resíduos que compõem a tríade catalítica (Ser147, Asp273 e His299) estão em verde e o “cap domain” está em preto. (B) Outra visão da representação em “cartoon”. (C) Localização dos motivos conservados da família V. (D) Imagem em superfície apontando a entrada de acesso do substrato ao canal. (E) Detalhe do canal interno, da cavidade e localização dos resíduos da tríade catalítica. (F) Potencial eletrostático da orf2.

## 5 CONCLUSÕES

- Através do clone PI40.B09, prospectado em uma biblioteca metagenômica oriunda de um solo contaminado com hidrocarbonetos do petróleo, foi possível selecionar 14 ORFs, através de análises de bioinformática, sendo que uma delas codifica uma alfa/beta hidrolase, denominada orf2.
- Análises de relações filogenéticas e alinhamentos confirmaram que a orf2 pertence à família V das enzimas lipolíticas, através da localização de domínios conservados característicos da família, além de verificar a presença da tríade catalítica na sequência de aminoácidos.
- Embora a orf2 apresente alta identidade no banco de dados de nucleotídeos ela tem baixa similaridade com o banco de dados de proteínas.
- Foi possível fazer a expressão da proteína e verificar sua atividade em Tributirina no zimograma, confirmando sua capacidade de hidrólise de ácidos graxos, mesmo que ela não esteja purificada.
- O estudo *in silico* da orf2, forneceu detalhes quanto à estrutura terciária da proteína; localização da tríade catalítica; da região de ligação ao substrato; da característica da cavidade interna e a localização da tríade em relação a ela.
- Com a análise destes resultados espera-se que a orf2 apresente grande potencial e possa ser direcionada para diferentes aplicações biotecnológicas.

## REFERÊNCIAS

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **The Biochemical journal**, v. 343 Pt 1, p. 177–83, 1999.

ASTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.; Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BAYER S, KUNERT A, BALLSCHMITER M & GREINER-STOEFFELE T. Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and characterization of two esterases from a metagenomic library. **J. Mol Microb Biotech** v.18, p. 181–187, 2010.

BISHNOI. K.; SAIN, U.; KUMAR, R.; SINGH, R.; BISHNOI, NR. Distribution and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated sites of Hisar (India). **Indian J. Exp. Biol.**; v.3, p.210-217, 2009.

CANTÃO, M. E.; FERREIRA, J. E.; LEMOS, E. G. M. Optimal clone identifier for genomic shotgun libraries: OC Identifier tool. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 743-755, 2007.

CBDM, “The enzyme market survey”, [Online]. Available: <http://www.cbdt.com/index.php?id=4>. 2008.

CHEETHAM P.S.J. Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing. **Handbook of enzyme biotechnology**. p. 83–234, 1995.

CHU, X.; HE, H.; GUO, C.; SUN, B. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from south China sea. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 615-625, 2008.

CIESLINSKI, H. *et al.* Identification and molecular modeling of a novel lipase from an Antarctic soil metagenomic library. **Polish journal of microbiology**, v. 58, n. 3, p. 199–204, 2009.

DINKLA, I.J.T., GABOR, E.M., JANSSEN, D.B. Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67,p.3406–3412, 2001.

ELEND, C.; SCHMISSER, C.; LEGGEWIE, C.; BABIAK, P.; CARBALLEIRA, J. D.; STEELE, H. L.; REYMOND, J. –L.; JAEGER, K. –E.; STREIT, W. R. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3637-3645, 2006.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186- 194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FERRER, M.; MARTINEZ-ABARCA, F. ; GOLYSHIN, P. N. Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. **Current Opinion Biotechnology**, v. 16, p. 588–593, 2005.

GANDHI, N. N.; *J. Applications of lipases* **Journal of the American Oil Chemists' Society** v. 74,p. 621. 1997.

GAO, B.; SU, E.; LIN, J.; JIANG, Z.; MA, Y.; WEI, D. Development of recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from *Proteus* sp. for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v. 139, p. 169-175, 2009.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S. E.; WILKINS, M. R.;APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASyServer. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**: Humana Press,. p. 571-607, 2005.

GHOTRA, B. S.; DYAL, S. D.; NARINE, S. C.; **Food Research International**. v.35, p.1015,2002.

GILLESPIE, D. E.; BRADY, S. F.; BETTERMANN, A. D.; CIANCOTTO, N. P.; LILES, M. R.; RONDON, M. R.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Isolation of antibiotics Turbomycin A and B from a Metagenomic Library of Soil Microbial DNA. **Applied and Environmental Microbiology** v. 68, n. 9, p. 4301–4306, 2002.

GLOGAUER, A., MARTINI, V. P., FAORO, H., COUTO, G., SANTOS, M.M., MONTEIRO, R.A., MITCHELL, D.A., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., KRIEGER, N.; Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories** 10:54, 2011.

HAKI G.D., RAKSHIT S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**. v.89, p.17–34, 2003.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** n.41, p.95-98, 1999.

HANDELSMAN, J., RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, p. 245-249, 1998.

HARDEMAN, F.; SJOLING, S.; Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, p. 524-534, 2007.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235–251, 2006.

HENNE, A.; SCHMITZ, R. A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3113-3116, 2000.

HIGASHIOKA, Y.; KOJIMA, H.; SATO, S.; FUKUI, M. Microbial community analysis at crude oil-contaminated soils targeting the 16S ribosomal RNA, xylM, C23O, and bcr genes. **J. Appl. Microbiol.** v.105, p.1364-5072, 2009.

HU, Y.; FU, C.; HUANG, Y.; YIN, Y.; CHENG, G.; LEI, F.; LU, N.; LI, J.; ASHFORTH, E. J.; ZHANG, L.; ZHU, B. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 72, p. 228-237, 2010.

HU, Y.; ZHANG, G.; LI, A.; CHEN, J.; MA, L. Cloning and enzymatic characterization of a xylanase gene from soil derived metagenomic library with an efficient approach. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 80, p. 823-830, 2008.

JAEGER, K. E. & EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology** v. 13, p. 390–397, 2002.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipase. **Annual Review Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K-E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W.; **FEMS Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.15,p. 29,1994.

JAEGER, K-E.; REETZ, M. T.; Microbial lipases form versatile tools for biotechnology **TIBTECH** v.16, p.396, 1998.

JEON, J. H.; KIM, J. T.; KANG, S. G.; LEE, J. H.; KIM, S. J. Characterization and its potential application of two esterases derived from the arctic sediment metagenome. **Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 307–316, 2009.

JEON, J. H. *et al.* Identification of a new subfamily of salt-tolerant esterases from a metagenomic library of tidal flat sediment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 623–31, 2012.

JIANG C, WU L-L, ZHAO G-C, SHEN P-H, JIN K, HAO Z-Y, LI S-X, MA G-F, LUO F-F, HU G-Q, KANG W-L, QIN X-M, BI Y-L, TANG X-L, WU B. Identification and characterization of a novel fumarase gene by metagenome expression cloning from marine microorganisms. **Microbial Cell Factories** v.9, p.91, 2010.

KIM, E. Y.; OH, K. H.; LEE, M. H.; KANG, C. H.; OH, T. K.; YOON, J. H. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 257-260, 2009.

KNIGHT, J. C.; KEATING, B. J.; ROCKETT, K. A. ; KWIATKOWSKI, D. P. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. **Nature Genetics**, v. 33, p. 469-475, 2003.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 287-292, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; Sant'Anna Jr., G. L.; **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p.175. 2002.

LEE, S.W.; WON, K.; LIM, H. K.; KIM, J. C.; CHOI, G. J.; CHO, K. Y. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology Journal**, v.6, p. 720–726, 2004.

LEE, M. H.; LEE, C. H.; OH, T. K.; SONG, J. K.; YOON, J. H. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: Evidence for a new family of bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7406-7409, 2006.

LEOW TC, RAHMAN RNZRA, BASRI M et. al.A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp.T1. **Extremophiles** v.11, p.527–535, 2007.

LI, A. et al. A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 3-15 , 2013.

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.

LIAW, R. B.; CHENG, M. P.; WU, M. C. LEE, C. Y. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8323-8329, 2010.

LÓPEZ, O. L.; CERDÁN, M. E.; SISO, M. I. G. New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics **Current Protein and Peptide Science**, v. 15, p.445-455, 2014.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature**, v. 3, p. 510-516, 2005.

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J.; Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Current Opinion in Biotechnology**. Elsevier v. 13, p. 572-577, 2002.

MARTINI, V. P.; GLOGAUER, A.; IULEK, J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KRIEGER, N. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of LipC12, a true lipase isolated through a metagenomics approach. **Acta Crystallographica**. v.68, p. 175–177, 2012.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S.; Testing of alkaline and enzymatic pretreatment for fat particles in slaughterhouses wastewater **Bioresource Technology**, v.77, p.145, 2001.

NACKE, H. *et al.* Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. **FEMS microbiology ecology**, v. 78, n. 1, p. 188–201, 2011.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W.  $\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Current opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 732-737, 1999.

OBUEKWE, C.O.; AL-JADI, Z.K.; AL-SALEH, E.S. Comparative hydrocarbon utilization by hydrophobic and hydrophilic variants of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. appl. microbiol.** v.105, p.1876–1887, 2008.

OH, B.; KIM, H.; LEE, J.; KANG, S.; OH, T. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 385-392, 1999.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

PAIXÃO, D. A.; DIMITROV, M. R.; PEREIRA, R. M.; ACCORSINI, F. R.; VIDOTTI, M. B.; LEMOS, E. G. M. Análise molecular da diversidade bacteriana de um consórcio degradador de óleo diesel. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 773-781, 2010.

PEDRINHO, E. A. N.; LEMOS, E. G. M.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; SILVEIRA, É. L.; VAL-MORAES, S. P.; CARARETO-ALVES, L. M.; WICKERT, E.; VALARINI, M. J. Avaliação do impacto do lodo de esgoto na microbiota do solo utilizando o gene 16S rRNA. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 443-448, 2009.

PEREIRA, M. R. **Prospecção de genes codificadores de enzimas lipolíticas em biblioteca metagenômica de consórcio microbiano degradador de óleo diesel**. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo- São Paulo, 2011.

PIRÔLLO, P.S.; MARIANO, A.P.; LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.V.A.O.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site M. **Journal of Applied Microbiology**.v.105, p.1484–1490, 2008.

PRIYA, K.; CHADHA, A.; Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase **Enzyme and Microbial Technology**., v.32,p. 485, 2003.

RANJAN R.; GROVER, A.; KAPARDAR, R. K.; SHARMA, R. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 335, p. 57-65, 2005.

RAJENDHRAN, J. ; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Journal Biotechnology Advances**, v. 26, p. 576-590, 2008.

RAO, L. *et al.* A novel alkaliphilic bacillus esterase belongs to the 13(th) bacterial lipolytic enzyme family. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. e60645, 2013.

REETZ, M. T.; Lipases as practical biocatalysts, **Current Opinion in Chemical Biology**. v.6, p.145, 2002.

ROBE, P.; NALIN, R. ; CAPELLANO, C. ; VOGEL, T. M. ; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, p. 183-190, 2003.

ROH, C.; VILLATTE, F. Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. **Journal of Applied Microbiology**, n. 105, p. 116-123, 2008.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2541–2547, 2000.

SAITOU, N & NEI, M. The *neighbor-joining* method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v.4, p.406-425, 1987.

SALI, A, BLUNDELL, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J Mol Biol.** v.5, p.779-815,1993.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W.. **Molecular Cloning**. 3 edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2003.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C.; Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**,v. 19, p.627,2001.

SILVEIRA, E. L.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomics analyses: past and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology Journal** v.77, p. 1153–1161, 2011.

SINGH, B. K. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. **Trends Biotechnology Journal**, v. xxx, n. x, p. 1-6, 2009.

STEELE, H.L; JAEGER, K.E., DANIEL, R., STREIT, W.R. Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. **J Mol Microbiol Biotechnol.**v.16, p.25–37, 2009.

SUMNER C., KRAUSE S., SABOT A., TURNER K., MCNEIL C.J. Biosensor based on enzyme-catalysed degradation of thin polymer films. **Biosensors & Bioelectronics Journal.** v.16, p.9-12, 2001.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TELES, F. R. R.; CABRAL, J. M. S.; SANTOS, J. A. L.; Enzymatic degreasing a solid waste from the leather industry by lipases **Biotechnology Letters.** v.23, p.1159. 2001.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 296: p. 1064-1066, 2002.

TUFFIN, M.; ANDERSON. D.; HEATH, C.; COWAN, D. A. Metagenomic gene discovery: how far have we moved into novel sequence space? **Biotechnology Journal**, v.4, p. 1671-1683, 2009.

VAKHLU,J.; KOUR,A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Journal of Biotechnology**, v.9, n.1, p.69-85, 2006.

WHEELER D, CHURCH DM, FEDERHEN S, LASH AE, MADDEN TL, PONTIUS JU, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology. **Nucleic Acids Res.** n.31, p.28–33, 2003.

WHITMAN, W. B. *et al.* Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America**, Washington, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WHYTE, L.G.,; BOURBONNIERE, L.; GREER, C.W.; Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic Pseudomonas Strains Possessing Both Alkane (alk) and Naphthalene (nah) Catabolic Pathways. **Appl. Environ. Microbiol.**v. 63,p.3719-3723,1997.

WU, C.; SUN, B. Identification of novel esterase from metagenomic library of Yangtze River. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 187-193, 2009.

WUNSCH, L.; BRÜGGEMANN, L.; BABEL, W. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.17, p.295-305, 1995.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.; Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions **Enzyme Microbiology Technoogy.**, v.23, p.438,1998.

YUSTE, L.; CORBELLA, M.E.; TURIGANO, M.J.; KARLSON, U.; PUYET, A.; ROJOA,F. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.32, p.69-75, 2000.

ZHANG, A. et al. Discovery of a novel esterase subfamily sharing an identified arm sequence (ArmEst) by gene-specific metagenomic PCR. **Biotechnology letters**, 2013.