

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ARNALDO GLOGAUER

**ISOLAMENTO DE CLONES COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO
METAGENOMA DE SOLO CONTAMINADO COM GORDURA ANIMAL E
CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA E EFICIENTE LIPASE**

**CURITIBA
2011**

ARNALDO GLOGAUER

**ISOLAMENTO DE CLONES COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO
METAGENOMA DE SOLO CONTAMINADO COM GORDURA ANIMAL E
CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA E EFICIENTE LIPASE**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do grau de Doutor em
Ciências – Bioquímica.**

Orientadora: Prof.^a Nadia Krieger

Coorientador: Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa

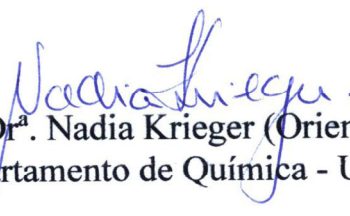
**CURITIBA
2011**

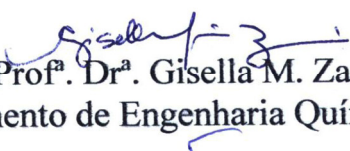
TERMO DE APROVAÇÃO

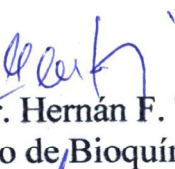
ARNALDO GLOGAUER


ISOLAMENTO DE CLONES COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO METAGENOMA DE SOLO CONTAMINADO COM GORDURA ANIMAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA E EFICIENTE LIPASE


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. Nadia Krieger (Orientadora)
Departamento de Química - UFPR


Prof.^a. Dr.^a. Gisella M. Zanin
Departamento de Engenharia Química - UEM


Prof. Dr. Hernán F. Terenzi
Departamento de Bioquímica - UFSC


Prof. Dr. Jorge L. Ninow
Departamento de Engenharia Química - UFSC


Prof. Dr. David A. Mitchell
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Curitiba, 27 de abril de 2011.

Aos meus pais, Anna Maria e
Bernhard, pelo amor e dedicação.
À minha esposa Liliane pelo amor
e apoio durante todos estes anos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Aos meus orientadores Professora Nadia Krieger e Professor Fábio de Oliveira Pedrosa pelo apoio e orientação.

Ao Professor Emanuel Maltempi de Souza pelas valiosas sugestões.

Aos Professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN) pelo auxílio e ensinamentos ao longo de todo o trabalho.

À Roseli Prado, Julieta Pie, Marilza Doroti Lamour e Valter Antônio de Baura pelo suporte técnico.

À coordenação do curso de pós-graduação em Ciências – Bioquímica, em especial aos Professores Leda Satie Chubatsu e Miguel Daniel Nosedá pelo empenho à frente da coordenação do curso durante o período.

Ao Professor Luciano Huergo pelo auxílio nas análises de MALDI/TOF e ao Professor Hernán Terenzi (UFSC) e Jean Borges Bertoldo (UFSC) pelas análises de dicroísmo circular e fluorescência total.

À Viviane Paula Martini pela modelagem molecular da proteína LipC12.

Ao Helisson Faoro pelo auxílio em várias etapas do trabalho e ao Marco Antônio Kadowaki pelo auxílio na purificação da proteína LipC12.

Aos colegas do NFN e do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB).

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida e ao INCT-FBN/CNPq/MCT, CAPES, Institutos do Milênio/CNPq/MCT e PRONEX/Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

O que sabemos é uma gota, o que
ignoramos é um oceano.

Isaac Newton

RESUMO

Um gene de uma nova lipase foi identificado a partir de uma biblioteca metagenômica de 500.000 clones construída com a fração majoritariamente procariótica do DNA de um solo contaminado com gordura animal, proveniente de uma estação de tratamento de efluentes. Na triagem inicial feita em ágar contendo 1% de tributirina, 2661 dos 500.000 clones da biblioteca metagenômica apresentaram atividade. Destes, 127 apresentaram atividade em ágar contendo 1% de tricaprilina, enquanto que 32 se mostraram produtores de lipases verdadeiras pela triagem em ágar contendo 1% de trioléina. O clone com o maior halo de hidrólise foi caracterizado. O gene da lipase apresentou 72% de identidade com as lipases putativas CBY26912 de *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleoartica* Y11 e YE1842 da *Yersinia enterocolitica* subsp. *Enterocolitica* 8081. A lipase, denominada LipC12, apresenta uma cadeia polipeptídica de 293 aminoácidos e massa molecular de 31,2 KDa. A análise da sequência de LipC12 revelou que ela pertence à família I.1 das lipases bacterianas e que possui um sítio de ligação ao íon Ca^{2+} formado pelos resíduos Asp²¹⁷ e Asp²⁶². Este íon foi essencial para a atividade catalítica. Uma vez que LipC12 apresenta somente uma cisteína em sua estrutura (Cys⁸⁹), ela não apresenta pontes dissulfeto intramoleculares. Através de um modelo tri-dimensional gerado por modelagem molecular, foi possível identificar o dobramento α/β das hidrolases, o sítio de ligação ao cálcio e a presença da tampa hidrofóbica (*lid*) encobrindo o sítio catalítico. Após clonagem no vetor pET28a(+), a enzima foi superexpressa em *E. coli* BL21(DE3), purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e sua identidade foi confirmada por MALDI-TOF/MS. Análises de estabilidade e atividade lipolítica foram efetuadas através dos métodos espectrométricos e titulométricos empregando ésteres de *p*-nitrofenol e triacilgliceróis, como substratos, respectivamente. Ensaio de estabilidade térmica, dicroísmo circular e fluorescência total demonstraram que o íon cálcio exerce ação protetora contra desnaturação e agregação da enzima. LipC12 é estável em concentrações de até 3,7M de NaCl e entre 20 e 50°C, com máxima atividade a 30°C em 1 h de incubação. A enzima purificada tem atividade específica de 1722 U/mg e 1767 U/mg contra óleo de oliva e gordura de porco, respectivamente. É estável na faixa de pH de 6 a 11 e tem atividade entre os pHs 4,5 e 10, com elevada atividade em pHs alcalinos. Além disso, é altamente estável em solventes orgânicos nas concentrações de 15 e 30% (v/v). Essas características sugerem que esta lipase tem potencial para ter um bom desempenho em processos biocatalíticos, como reações de hidrólise e síntese envolvendo triacilgliceróis e ésteres de ácido graxo de cadeia longa.

Palavras-chave: Lipase. Esterase. Metagenômica. Metagenoma. Enzima.

ABSTRACT

A novel lipase gene was identified from a fosmid metagenomic library of 500,000 clones constructed with the “prokaryotic-enriched” DNA from a fat contaminated soil collected from a wastewater treatment plant. In preliminary screening on agar containing 1% tributyrin, 2661 of the approximately 500,000 clones in the metagenomic library showed activity. Of these, 127 showed activity on agar containing 1% tricapylin, while 32 were shown to be true lipase producers through screening on agar containing 1% triolein. The clone with the largest halo was further characterized. Its lipase gene showed 72% identity to putative lipases CBY26912 of *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleoartica* Y11 and YE1842 of *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081. The lipase, named LipC12, has a polypeptide chain of 293 amino acids and molecular mass of 31.2 kDa. Analysis of the sequence of LipC12 showed that it belongs to family I.1 of bacterial lipases and has a Ca²⁺ ion binding site formed by Asp²¹⁷ and Asp²⁶². This ion was essential for catalytic activity. Since LipC12 has only one cysteine in its structure (Cys⁸⁹) it has no intramolecular disulfide bonds. Through a three-dimensional model generated by molecular modeling, it was possible to identify the α/β -hydrolase fold, the calcium binding site and the presence of a hydrophobic lid covering the catalytic site. After cloning into vector pET28a (+), the enzyme was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) cells, purified by nickel affinity column chromatography and its identity was confirmed by MALDI-TOF/MS. Stability and lipolytic activity analyses were performed using the spectrometric and titrimetric methods, using *p*-nitrophenol esters and triacylglycerols as substrates, respectively. Thermal stability, circular dichroism and total fluorescence assays showed that the calcium ion exerts protective action against enzyme denaturation and aggregation. LipC12 showed greater activity against triacylglycerols compared with monoacylestes, with preference for long chain fatty acid esters. LipC12 is stable up to 3.7 M NaCl and from 20 to 50°C, with maximum activity at 30°C over a 1 h incubation. The pure enzyme has specific activities of 1722 U/mg and 1767 U/mg against olive oil and pig fat, respectively. It is stable from pH 6 to 11 and has activity from pH 4.5 to 10, with higher activities at alkaline pH values. Moreover, it is highly stable in organic solvents at 15% and 30% (v/v). These characteristics suggest that this lipase has potential to perform well in biocatalytic processes, such as for hydrolysis and synthesis reactions involving long-chain triacylglycerols and fatty acid esters.

Keywords: Lipase. Esterase. Metagenomics. Metagenome. Enzyme.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE E SÍNTESE DE ÉSTERES DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	19
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MOTIVO ESTRUTURAL CONSERVADO EM ENZIMAS DA FAMÍLIA α/β HIDROLASE	21
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA EM 3D DA LIPASE DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	21
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR EM 3D DA LIPASE DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	22
FIGURA 5 – REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES	25
FIGURA 6 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PALMITATO DE <i>p</i> -NITROFENILA (<i>p</i> NPP)	39
FIGURA 7 – CURVA DE ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE <i>p</i> NP	40
FIGURA 8 – ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES	45
FIGURA 9 – DETALHES DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES	46
FIGURA 10 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA AMBIENTAL EXTRAÍDO	47
FIGURA 11 – PROSPECÇÃO FUNCIONAL DE CLONES ATIVOS	48
FIGURA 12 – RESTRIÇÃO DOS FOSMÍDEOS COM ATIVIDADE LIPÁSICA	49
FIGURA 13 – RESTRIÇÃO DOS SUBCLONES POSITIVOS	50
FIGURA 14 – HALOS DE HIDRÓLISE EM MEIO SELETIVO COM TRIOLEÍNA 1%	50
FIGURA 15 – GEL DE AGAROSE DO GENE DA ENZIMA LipC12 AMPLIFICADO	51
FIGURA 16 – GEL SDS-PAGE DO TESTE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA LipC12	52
FIGURA 17 – SDS-PAGE DAS FRAÇÕES OBTIDAS NO TESTE DE SOLUBILIDADE	52
FIGURA 18 – PURIFICAÇÃO E ZIMOGRAMA DA ENZIMA LipC12	53
FIGURA 19 – LOCALIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS NA SEQUÊNCIA DE LipC12	54

FIGURA 20 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DA LIPASE LipC12	56
FIGURA 21 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA LIPASE LipC12 COM OUTRAS LIPASES DAS SUBFAMÍLIAS I.1 E I.2.....	58
FIGURA 22 – SOBREPOSIÇÃO DA ESTRUTURA MODELADA POR HOMOLOGIA DA LIPASE LipC12 E DAS LIPASES 1EX9 DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> E 1YS1 DE <i>Burkholderia cepacia</i>	60
FIGURA 23 – CARACTERÍSTICAS DO MODELO MOLECULAR DA LIPASE LipC12	61
FIGURA 24 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA LIPASE LipC12 COM OUTRAS LIPASES DE ESTRUTURA CONHECIDA DAS SUBFAMÍLIAS I.1 E I.2	62
FIGURA 25 – ESPECIFICIDADE DA LIPASE LipC12	66
FIGURA 26 – EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DE LipC12	72
FIGURA 27 – ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LipC12 CONTRA DIVERSOS TRIACILGLICERÓIS.....	74
FIGURA 28 – EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DE LipC12	75
FIGURA 29 – ATIVIDADE DE LipC12 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl	76
FIGURA 30 – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE LipC12	77
FIGURA 31 – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE LipC12 EM DIFERENTES TEMPERATURAS	78
FIGURA 32 – PERCENTUAL DE DESNATURAÇÃO DE LipC12 EM DIFERENTES TEMPERATURAS	79
FIGURA 33 – ANÁLISE DO GRAU DE AGREGAÇÃO DE LipC12 COM A TEMPERATURA.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS EM BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS (2000 - 2010)	30
TABELA 2 – IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DA LIPASE LipC12 PELA ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF/MS)	54
TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DE LipC12 E OUTRAS LIPASES BACTERIANAS DAS SUBFAMÍLIAS I.1 E I.2	57
TABELA 4 – EFEITO DE CÁTIOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	64
TABELA 5 – EFEITO DE ÂNIOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	65
TABELA 6 – EFEITO DE DETERGENTES, INIBIDORES E GOMA ARÁBICA	67
TABELA 7 – EFEITO DA AÇÃO DE SOLVENTES ORGÂNICOS SOBRE A ESTABILIDADE	68
TABELA 8 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE A ATIVIDADE	69
TABELA 9 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE A ESTABILIDADE ...	70
TABELA 10 – EFEITO DO pH SOBRE A ESTABILIDADE DA LIPASE LipC12	71
TABELA 11 – EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DA LIPASE LipC12	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	– <i>Basic Local Alignment Sequence Tool</i>
BAC	– <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> (cromossomo artificial de bactéria)
BSA	– <i>Bovine Serum Albumin</i> (albumina de soro bovino)
CTAB	– brometo de hexadeciltrimetilamônio
DEPC	– dietilpirocarbonato
DMF	– dimetilformamida
DMSO	– dimetilsulfóxido
DNA	– ácido desoxirribonucléico
DO ₆₀₀	– densidade ótica a 600 nm de comprimento de onda
E.C.	– <i>Enzyme Commission</i>
EDTA	– ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	– ácido etilenoglicoltetracético
GenBank	– banco de sequências de genes e proteínas do <i>NCBI</i>
GPS	– <i>Global Positioning System</i> (sistema de posicionamento global)
IPTG	– isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
Kb	– mil pares de base
LB	– meio líquido Luria Bertani
LA	– meio LB ágar
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLS	– n-lauroil sarcosina
NP40	– Nonidet P-40
ORF	– <i>Open Reading Frame</i> (região codificadora de proteína)
pb	– pares de bases
PCR	– <i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PDB	– <i>Protein Data Bank</i>
pH	– potencial hidrogeniônico
pI	– ponto isoelétrico
PKN	– T4 polinucleotídeo quinase
PMSF	– fluoreto de fenilmetilsulfonil
pNP	– <i>p</i> -nitrofenol
pNPP	– palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
rpm	– rotações por minuto
SAP	– <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (fosfatase alcalina de camarão)
SDS	– dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	– Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
T4	– fago T4
TAE	– tris-acetato-EDTA
THF	– tetrahidrofurano
Tris	– tris hidróxi-metil-aminometano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Definição de lipases e esterases	19
3.2 Estrutura molecular e classificação das lipases e esterases bacterianas.....	20
3.3 Aplicações industriais e importância biotecnológica das lipases.....	24
3.4 Metagenômica e seu emprego na descoberta de novos biocatalisadores	27
3.5 Lipases, esterases e outras hidrolases obtidas através da metagenômica	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Estirpes de <i>E. coli</i> e vetores	31
4.2 Reagentes e enzimas	31
4.3 Coleta do solo e extração do DNA.....	31
4.4 Construção da biblioteca metagenômica e seleção de clones com atividade esterásica e lipásica.....	32
4.5 Subclonagem e sequenciamento	33
4.6 Análise da sequência da lipase LipC12 e construção da árvore filogenética.....	34
4.7 Clonagem do gene <i>lipC12</i>	34
4.8 Teste de indução da expressão com IPTG e avaliação da solubilidade de LipC12	35
4.9 Superexpressão e purificação da lipase LipC12	36
4.10 Determinação do teor de proteína, SDS-PAGE e zimograma	36
4.11 Análise de MALDI-TOF/MS	37
4.12 Análises de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência total	37
4.13 Modelagem estrutural por homologia	38
4.14 Determinação espectrofotométrica da atividade lipolítica utilizando ésteres de <i>p</i> -nitrofenil (<i>p</i> NP) como substrato	39
4.14.1 Ensaio padrão	39
4.14.2 Determinação da especificidade da enzima pelo substrato	40
4.14.3 Determinação da temperatura de máxima conversão do substrato pela enzima	40
4.14.4 Determinação do efeito da ação de cátions e ânions sobre a atividade enzimática	41

4.14.5 Determinação do efeito de inibidores, detergentes e goma arábica sobre a atividade enzimática	41
4.14.6 Determinação da termoestabilidade da enzima	42
4.14.7 Determinação da estabilidade da enzima em solventes orgânicos	42
4.14.8 Análise da estabilidade e atividade em diferentes concentrações de sal	43
4.14.9 Determinação da estabilidade da enzima em diferentes valores de pH	43
4.15 Determinação titulométrica da atividade lipolítica utilizando triacilgliceróis como substratos	43
4.15.1 Ensaio padrão	43
4.15.2 Avaliação da atividade enzimática em diferentes valores de pH	44
4.15.3 Avaliação da atividade enzimática em diferentes concentrações de NaCl	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Coleta da amostra de solo, construção da biblioteca metagenômica e seleção de clones ativos	45
5.2 Sequenciamento do gene <i>lipC12</i> e análise preliminar da sequência da lipase LipC12	49
5.3 Superexpressão e purificação da lipase LipC12	51
5.4 Zimograma e análise de espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS)	53
5.5 Análise da sequência da proteína purificada	54
5.6 Modelo estrutural da lipase LipC12 obtido por modelagem “in silico”	57
5.7 Determinação espectrofotométrica da atividade enzimática utilizando ésteres de <i>p</i> -nitrofenila	63
5.7.1 Efeito de agentes quelantes e íons metálicos sobre a atividade da lipase LipC12	63
5.7.2 Efeito de ânions sobre a atividade da lipase LipC12	63
5.7.3 Determinação da especificidade da lipase LipC12 contra ésteres de <i>p</i> -nitrofenila	65
5.7.4 Efeito da ação de detergentes, goma arábica e inibidores sobre a atividade da lipase LipC12	66
5.7.5 Efeito da ação de solventes orgânicos sobre a estabilidade da enzima	67
5.7.6 Efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre a atividade e estabilidade de LipC12	69
5.7.7 Efeito do pH sobre a estabilidade de LipC12	70
5.7.8 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima LipC12	71
5.8 Determinação titulométrica da atividade de LipC12 utilizando triacilgliceróis	72
5.8.1 Determinação da especificidade da lipase LipC12 contra triacilgliceróis	72
5.8.2 Efeito do pH sobre a atividade de LipC12	75
5.8.3 Avaliação da atividade enzimática em diferentes concentrações de NaCl	76

5.9 Análises de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência total	76
6 DISCUSSÃO	80
6.1 Construção da biblioteca metagenômica e seleção de clones com atividade lipolítica	80
6.2 Lipase LipC12	81
7 CONCLUSÕES	82
8 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
9 PUBLICAÇÕES	86
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise ou a síntese de ligações éster, dependendo da quantidade de água no meio reacional (JAEGER *et al.*, 1999; JAEGER e EGGERT, 2002; GUPTA *et al.*, 2004). São biocatalisadores importantes para várias aplicações biotecnológicas devido às suas características úteis, tais como estabilidade em solventes orgânicos, diversidade de substratos, estereosseletividade e regioseletividade (HASAN *et al.*, 2006).

Lipases podem ser obtidas de plantas, animais e microrganismos. As lipases microbianas têm sido amplamente pesquisadas e empregadas na indústria, pois possuem características importantes tais como baixo custo de produção, atividade catalítica diversificada e estabilidade em solventes orgânicos (SHU *et al.*, 2010). Embora diversas lipases tenham sido descobertas e comercializadas (HASAN *et al.*, 2006), novas lipases com características melhoradas ainda são necessárias e vários estudos têm sido conduzidos com objetivo de identificar e/ou selecionar lipases com alta atividade e estabilidade em meios não aquosos (XIAO *et al.*, 2009; BAJAJ *et al.*, 2010; BISEN *et al.*, 2010), regioespecificidade para modificação de óleos e gorduras (XU, 2000; HAYES, 2004) e estabilidade em meios alcalinos e na presença de surfactantes (HASAN *et al.*, 2010).

As lipases atualmente utilizadas industrialmente foram isoladas de microrganismos cultiváveis (HOUDE *et al.*, 2004), no entanto a obtenção de diferentes e novas lipases por este método se tornou difícil. Para superar esta limitação, estratégias baseadas em biologia molecular e engenharia de proteínas têm sido empregadas, tais como evolução dirigida (JAEGER *et al.*, 2001), desenho racional de proteínas (LIU *et al.*, 2010; SYREN *et al.*, 2010) e metagenômica (HENNE *et al.*, 2000; RONDON *et al.*, 2000; LÄMMLE *et al.*, 2007; STEELE *et al.*, 2009).

A abordagem metagenômica, que consiste na aplicação de técnicas de genômica molecular para estudar os consórcios de microrganismos não cultiváveis, tem impacto substancial na busca de novas enzimas para aplicações industriais, tais como esterases e lipases, devido à grande diversidade do material genético analisado (LORENZ e ECK, 2005; KAKIRDE *et al.*, 2010). A vantagem da metagenômica pode ser resumida em termos numéricos pois é estimado que mais de 99% das bactérias existentes no planeta não são cultiváveis (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Isso ocorre devido ao desconhecimento das

condições requeridas para cultivo destes microrganismos ou a necessidade em crescer somente em um consórcio microbiano.

Apesar de várias esterases e lipases terem sido isoladas através da abordagem metagenômica ao longo da última década (SIMON e DANIEL, 2009; UCHIYAMA e MIYAZAKI, 2009), relativamente poucos estudos reportam a descoberta de novas lipases com atividade hidrolítica contra óleos vegetais ou gorduras animais (JIANG *et al.*, 2006; LEE, M. H. *et al.*, 2006; ELEND *et al.*, 2007; JEON, KIM, KIM, *et al.*, 2009; LIU, K. *et al.*, 2009; MEILLEUR *et al.*, 2009). Um motivo para isto é que nem todas as lipases têm atividade contra triacilgliceróis que contenham ácidos graxos de cadeia longa, mesmo que apresentem alta atividade contra acilésteres de cadeia longa. Por exemplo, a lipase PLP, isolada através da metagenômica (TIRAWONGSAROJ *et al.*, 2008) e a lipase de *Sulfolobus acidocaldarius* (ARPIGNY *et al.*, 1998) hidrolisam o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) mas não o trioleoilglicerol.

Nesse sentido, para preencher esta lacuna, este trabalho tem como objetivo o isolamento, a expressão e a purificação de uma lipase verdadeira, com elevada atividade contra triacilgliceróis contendo longas cadeias de ácido graxo. Com a finalidade de aumentar as chances de encontrar estas enzimas em uma biblioteca metagenômica, neste trabalho foram empregados três procedimentos. Em primeiro lugar, foi utilizado um solo contaminado com gordura animal proveniente de uma estação de tratamento de efluentes de uma indústria de processamento de carnes e leite, situada na cidade de Carambeí/PR. Este solo contaminado provavelmente contém um conjunto de genes codificadores de proteínas lipolíticas e, conseqüentemente, aumentam as chances de se identificar clones produtores de lipases (LIAW *et al.*, 2010). Em seguida, foi utilizada uma técnica para enriquecer o DNA ambiental do solo com DNA procariótico (HÅRDEMAN e SJÖLING, 2007), uma vez que a expressão gênica em *E. coli* é na maioria das vezes limitada aos genes destes organismos (GABOR *et al.*, 2004). Finalmente, com o objetivo de identificar todos os genes com atividade lipolítica, tanto lipases quanto esterases, e selecionar uma lipase verdadeira dentre estes genes, foi aplicada uma estratégia de seleção em três etapas na qual primeiramente todos os genes com atividade esterásica foram selecionados e, em seguida, foram identificados entre estes últimos aqueles com maior atividade contra triacilgliceróis com ácido graxo de cadeia longa, que são os substratos preferenciais das lipases verdadeiras.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Bioprospecção funcional de novas enzimas lipolíticas no metagenoma de um solo contaminado com gordura animal.

2.2 *Objetivos específicos*

2.2.1 Extrair DNA de um solo contaminado com gordura animal pelo método de extração indireta e construir uma biblioteca metagenômica com o DNA extraído, tendo a bactéria *Escherichia coli* como hospedeiro e o vetor pCC2FOS como vetor de clonagem;

2.2.2 Fazer uma triagem funcional por lipases e esterases entre os clones da biblioteca metagenômica gerada, em três etapas consecutivas, com os substratos tributirina, tricaprilina e trioleína;

2.2.3 Selecionar um clone com atividade em trioleína dentre os clones com atividade lipolítica, identificar o gene ativo e clonar o mesmo em um vetor de expressão;

2.2.4 Expressar, purificar e analisar a lipase em diferentes condições reacionais e com diferentes substratos, por métodos espectrofotométricos e titulométricos, para determinar as condições ótimas de reação e fazer uma avaliação preliminar do seu potencial biotecnológico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Definição de lipases e esterases

Triacilglicerol lipases ou simplesmente lipases (E.C. 3.1.1.3) e carboxilesterases ou simplesmente esterases (E.C. 3.1.1.1) pertencem à classe das hidrolases (E.C. 3) que atuam sobre as ligações éster (E.C. 3.1), mais precisamente sobre as ligações éster de ácidos carboxílicos (E.C. 3.1.1), conforme ilustrado na FIGURA 1. Comumente o termo “enzimas lipolíticas” tem sido empregado na literatura em referência a lipases e esterases (ARPIGNY e JAEGER, 1999).

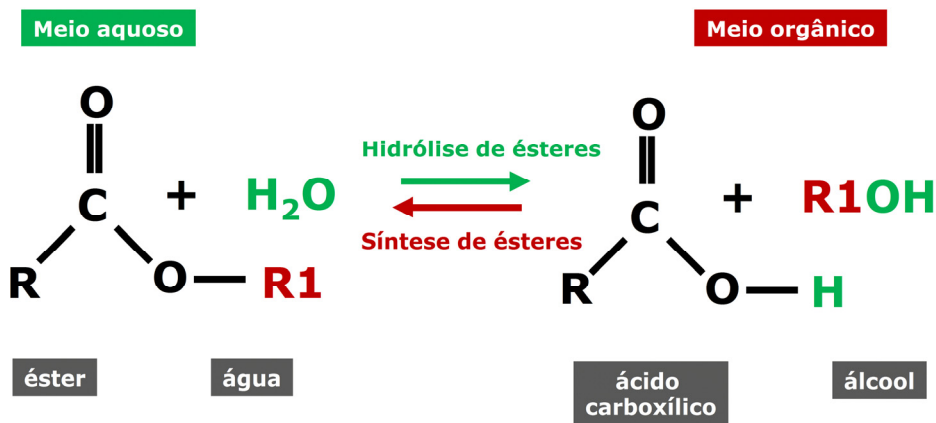


FIGURA 1 – ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE E SÍNTESE DE ÉSTERES DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

Em meio aquoso as lipases são capazes de hidrolisar ésteres, gerando ácido carboxílico e álcool como produto de reação. Porém, na ausência de água como ocorre em meio orgânico, as lipases catalisam a reação inversa, sintetizando ésteres de ácido graxo a partir de alcoóis e ácidos carboxílicos.

A característica utilizada para diferenciar lipases (E.C. 3.1.1.3) de esterases (E.C. 3.1.1.1) tem variado ao longo dos anos. O fenômeno da ativação interfacial (SARDA e DESNUELLE, 1958) e a presença de uma “tampa” hidrofóbica, chamada *lid*, recobrendo o sítio catalítico (BRZOWSKI *et al.*, 1991; DEREWENDA *et al.*, 1992; VAN TILBEURGH *et al.*, 1993) já serviram de parâmetros para diferenciar lipases de esterases, mas o fato de nem todas as lipases possuírem *lid* ou apresentarem o fenômeno da ativação interfacial (VERGER, 1997) exigiu que outras características fossem utilizadas. Assim, lipases têm sido definidas simplesmente como carboxilesterases que catalisam a hidrólise (e síntese) de acilésteres de cadeia longa (JAEGER *et al.*, 1994; VERGER, 1997; JAEGER *et al.*, 1999; KANG *et al.*, 2006). Não existe uma definição estrita a respeito do número de carbonos contidos no

grupamento acila de acilésteres de “cadeia longa”, mas acilésteres com um grupamento acila maior ou igual a 10 átomos de carbono têm sido considerados como substratos de lipases. Por sua vez, as esterases possuem como substratos acilésteres com um grupamento acila menor que 10 átomos de carbono. Lipases são capazes de hidrolisar os substratos das esterases (ésteres com grupamento acila menor que 10 átomos de carbono), mas esterases não podem hidrolisar os substratos das lipases (JAEGER *et al.*, 1999).

Todavia, mesmo que uma lipase tenha alta atividade contra acilésteres de cadeia longa (≥ 10 átomos de carbono), como o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), ela pode não hidrolisar triacilgliceróis que contenham ácidos graxos de cadeia longa, como a trioleína (ARPIGNY *et al.*, 1998; TIRAWONGSAROJ *et al.*, 2008). Por isso, atualmente tem sido usado o termo “lipase verdadeira” para definir lipases que exibem máxima atividade contra triacilgliceróis insolúveis que contenham ácidos graxos de cadeia longa (ARPIGNY e JAEGER, 1999).

A especificidade é uma característica importante das lipases. De forma geral, quatro tipos de especificidades podem ser definidas. A primeira é a especificidade em relação à classe de lipídeos. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo, tri-, di- ou monoacilgliceróis, colesterol éster, metil éster etc. A segunda é a regioespecificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. O terceiro tipo é a especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a lipase é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença de dupla ligação nesta cadeia. Finalmente, merece referência a estereoespecificidade, ou seja, algumas lipases catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um dos estereoisômeros (JENSEN *et al.*, 1983).

3.2 Estrutura molecular e classificação das lipases e esterases bacterianas

Lipases e esterases microbianas possuem massa molecular entre 20 e 60 kDa e uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp). O resíduo aspartato é em alguns casos substituído pelo glutamato (Glu), como ocorre com a lipase de *Geotrichum candidum* (MALA e TAKEUCHI, 2008). O sítio catalítico é freqüentemente protegido pela *lid*, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional e expõe o sítio ativo. Lipases e esterases pertencem à família das

α/β hidrolases (OLLIS *et al.*, 1992), com um motivo estrutural conservado composto por folhas- β e α -hélices intercaladas (FIGURA 2), com as folhas- β circundadas pelas α -hélices (FIGURA 3 e 4). O resíduo serina da tríade catalítica se encontra em um pentapeptídeo Gly – X – Ser – X – Gly altamente conservado (FIGURAS 2 e 4) , com “X” representando um resíduo qualquer (JAEGER *et al.*, 1999; BORNSCHEUER, 2002).

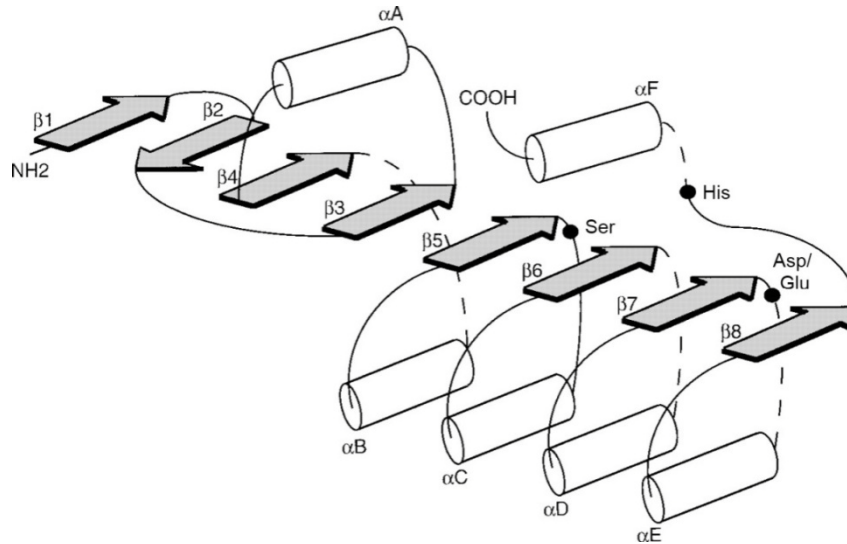


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MOTIVO ESTRUTURAL CONSERVADO EM ENZIMAS DA FAMÍLIA α/β HIDROLASE

As folhas- β (1-8) estão indicadas pelas setas e as α -hélices (A-F) estão indicadas pelos cilindros. As posições dos aminoácidos da tríade catalítica estão indicadas pelos círculos preenchidos.

FONTE: JAEGER *et al.*, 1999.

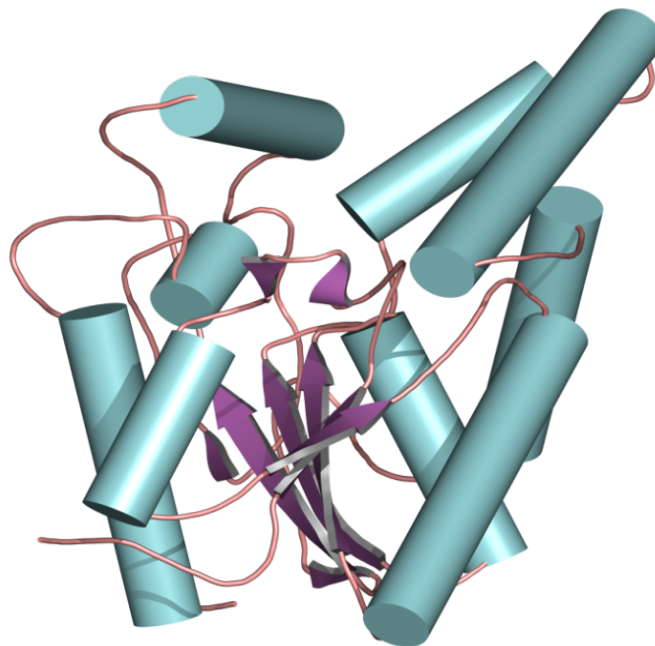


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA EM 3D DA LIPASE DE *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Nessa representação é possível observar as folhas- β circundadas pelas regiões em α -hélices.

FONTE: Adaptado de NARDINI *et al.*, 2000.

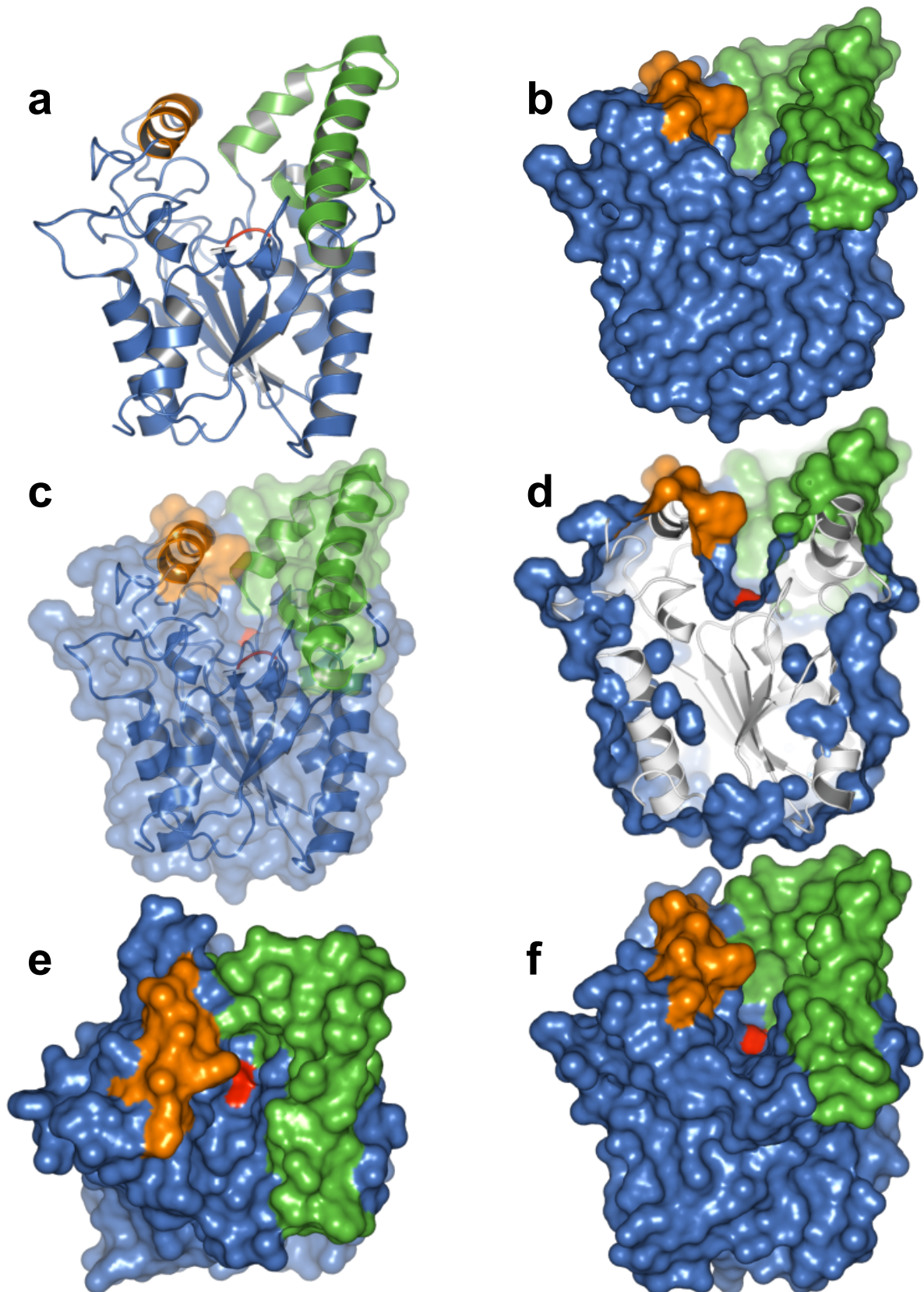


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR EM 3D DA LIPASE DE *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Nessa figura, diferentes perspectivas da estrutura molecular em 3D da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 são mostradas. A lid foi destacada em verde e laranja. (a) representação das conformações α e β . (b) representação da superfície molecular. (c) sobreposição das figuras (a) e (b). (d) corte da estrutura (c) evidenciando o contorno e a profundidade do sítio catalítico. (e) e (f) sítio catalítico visto de cima, com a serina catalítica em vermelho.

FONTE: Adaptado de NARDINI *et al.*, 2000. O programa PyMOL foi utilizado para gerar as figuras.

Arpigny e Jaeger (1999) propuseram um sistema de classificação para as lipases bacterianas baseado na similaridade de sequências. De acordo com este sistema, sequências de lipases de origem bacteriana foram classificadas em oito famílias (I a VIII), sendo a família I a maior delas e subdividida em seis subfamílias (1 a 6), em função da similaridade entre as sequências. A família I.1 inclui as enzimas das bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas wisconsinensis* e *Proteus vulgaris*, todas com massa molecular entre 30 a 32 kDa. A subfamília I.2 é constituída por lipases das bactérias *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas sp.* e *Chromobacterium viscosum*, com massa molecular um pouco maior em relação às lipases da subfamília I.1, em torno de 33 kDa em função da inserção de uma folha- β pregueada. Algumas lipases destas subfamílias dependem de uma chaperona chamada Lif (*lipase-specific foldase*), podem ligar íons Ca^{2+} através de dois resíduos conservados de aspartato e ainda podem conter uma ponte dissulfeto formada por duas cisteínas. A subfamília I.3 é formada por duas enzimas de duas espécies distintas, *Pseudomonas fluorescens* (50 kDa) e *Serratia marcescens* (65 kDa) e compartilham em comum a ausência de um peptídeo sinal no domínio N-terminal e a ausência de resíduos de cisteína. A subfamília I.4 agrupa as menores lipases conhecidas, com massa molecular por volta de 20 kDa, das espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*. A família I.5 é representada por lipases de outras espécies de *Bacillus* e do gênero *Staphylococcus*, apresentando como característica comum a substituição da primeira glicina do pentapeptídeo conservado por alanina. Por último, as lipases de *Propionibacterium acnes* e *Streptomyces cinnamoneus* possuem uma similaridade de 50% entre si (39% de identidade) e fazem parte da subfamília I.6 (ARPIGNY e JAEGER, 1999; JAEGER *et al.*, 1999).

As enzimas agrupadas na família II (GDSL) apresentam o motivo G-D-S-L ao invés do pentapeptídeo G-X-S-X-G, sendo que a serina se encontra mais próxima da extremidade N-terminal do que em outras enzimas lipolíticas. A família III é formada por lipases extracelulares de *Streptomyces sp.* e *Moraxella sp.*, enquanto a família IV possui lipases adaptadas a baixas temperaturas e apresentam similaridade com a lipase hormônio-sensível de mamíferos (HSL, do inglês *Hormone Sensitive Lipase*). Membros da família V têm semelhanças com várias enzimas bacterianas não lipolíticas, como dehalogenases, haloperoxidasas e epóxido hidrolases. Na família VI encontram-se algumas das esterases de menor massa molecular, formadas por dímeros de subunidades do tipo α/β hidrolase e tríade catalítica Ser-Asp-His, com similaridade com as lisofosfolipases de mamíferos. A família VII é formada por esterases bacterianas relativamente grandes (55 kDa) que compartilham ~40%

de similaridade e ~30% de identidade com as acetilcolinesterases eucarióticas (E.C. 3.1.1.7). Na família VIII se encontram três esterases de aproximadamente 380 aminoácidos que apresentam uma similaridade com várias β -lactamases da classe C. Diferentemente do que ocorre nas outras famílias, onde o resíduo serina do sítio ativo encontra-se nos motivos conservados G-X-S-X-G ou G-D-S-L, na família VIII o resíduo de serina se encontra no motivo S-X-X-K (ARPIGNY e JAEGER, 1999; JAEGER *et al.*, 1999).

Com o advento da metagenômica, já é possível encontrar na literatura novas sequências de lipases e esterases bacterianas que não agrupam em nenhuma destas famílias, o que indica a necessidade da criação de novas famílias e subfamílias (LEE, M. H. *et al.*, 2006; BAYER *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009; WU e SUN, 2009; BAYER *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2010).

3.3 Aplicações industriais e importância biotecnológica das lipases

Plantas industriais baseadas em reações enzimáticas podem ser construídas e operadas com custos menores, especialmente com energia, em comparação com as plantas não enzimáticas. Além disso, devido à especificidade das enzimas, produtos indesejáveis provenientes de reações paralelas, os quais são geralmente produzidos nas reações não enzimáticas, são reduzidos ou totalmente eliminados, elevando o rendimento da reação e facilitando a purificação do produto desejado (HASAN *et al.*, 2006).

Lipídeos constituem uma parte considerável da biomassa do planeta e as lipases são essenciais para o aproveitamento desses materiais. Lipases constituem o terceiro maior grupo em volume de vendas de enzimas, sendo precedido pelas proteases e carbohidrases. A utilização comercial das lipases representa um mercado de bilhões de dólares que engloba uma ampla variedade de diferentes aplicações (SCHMIDT-DANNERT *et al.*, 1998; JAEGER *et al.*, 1999; HOUDE *et al.*, 2004; HASAN *et al.*, 2006).

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, possuem a capacidade de catalisar esterificações, transesterificações (interesterificação, acidólises e alcoólises), aminólise (síntese de amidas), tiotransesterificação e lactonização (FIGURA 5). O sentido da reação (direto - hidrólise ou inverso - síntese) é

controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (JAEGER e EGGERT, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005; VERMA *et al.*, 2008).

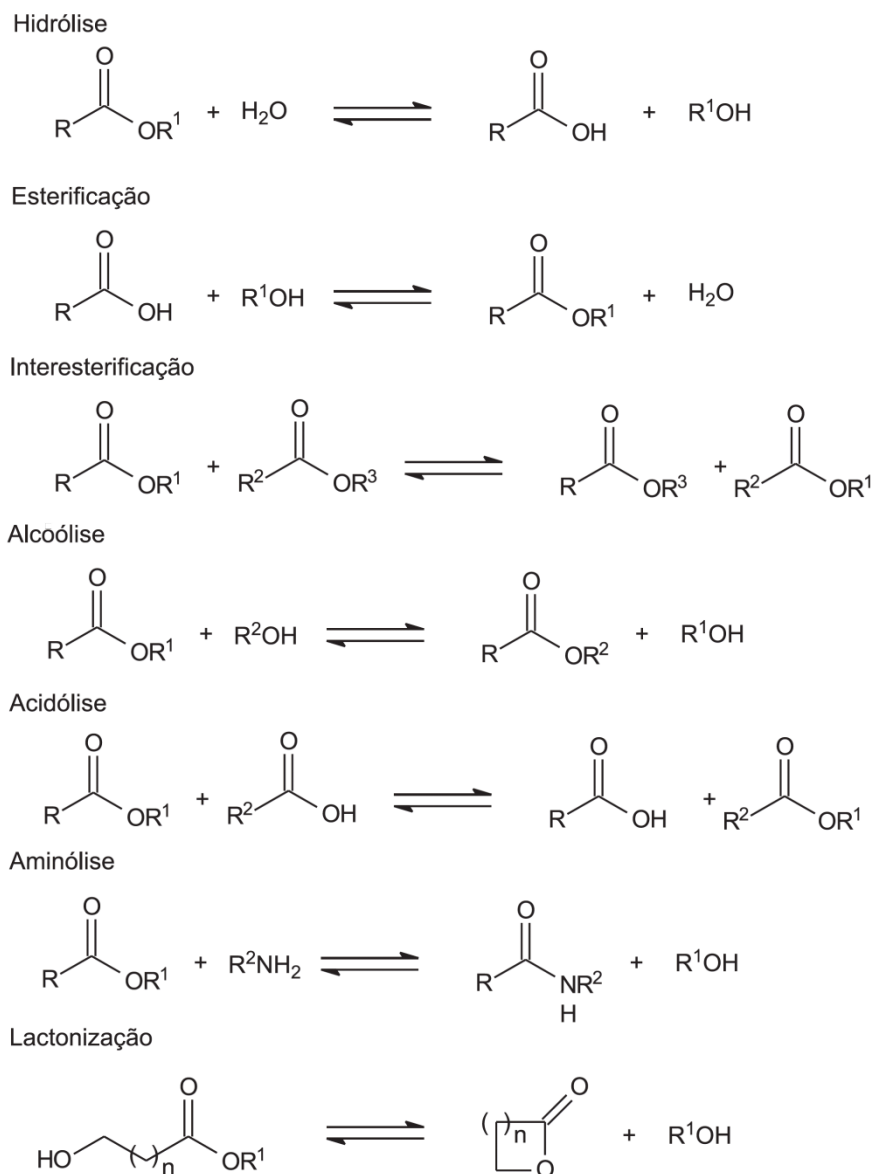


FIGURA 5 – REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

O sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional.

Uma aplicação de destaque é a utilização de lipases na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois as lipases são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica. É conhecido que alguns fármacos são produzidos e comercializados na sua forma racêmica, mas normalmente apenas um dos isômeros (*R* ou *S*)

apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico (LONG *et al.*, 2007). Na grande maioria dos casos, os fármacos administrados sob a forma racêmica possuem características biológicas muito inferiores aos seus enantiômeros puros. Um processo já tradicional é a obtenção de um precursor do Diltiazem, um dos dez fármacos mais vendidos no mundo, prescrito para o tratamento de hipertensão arterial. Em uma das etapas, é realizada a resolução do éster metil-3-(4-metoxifenilglicidato) racêmico, empregando-se uma lipase de *Serratia marcescens* (MATSUMAE *et al.*, 1993).

Uma área que ganhou relevância nos últimos anos é o emprego de lipases na produção de biodiesel, através da transesterificação de triacilgliceróis com alcoóis de cadeia curta. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa produzidos na reação podem ser empregados como combustível, com a vantagem de não ocorrer a geração de óxidos de enxofre e de particulados (ISO *et al.*, 2001).

Na indústria de laticínios, as lipases são muito utilizadas na hidrólise da gordura do leite, na aceleração dos processos de maturação de queijos e no desenvolvimento de aromas e sabores (KHEADR *et al.*, 2003). A adição de lipases ao leite de vaca gera um sabor semelhante ao leite de cabra e, com este leite, são fabricados os chamados queijos modificados enzimaticamente (SAXENA *et al.*, 1999).

A termoestabilidade das lipases varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica e, quando imobilizadas, podem ser utilizadas em reatores a temperaturas de 70°C por períodos prolongados (JAEGER e REETZ, 1998; HASAN *et al.*, 2006). Enzimas estáveis a elevadas temperaturas e a ambientes quimicamente diversos são especialmente vantajosas para aplicações industriais (JAEGER e REETZ, 1998; SCHMIDT-DANNERT *et al.*, 1998; HOUDE *et al.*, 2004; HASAN *et al.*, 2006). Todavia, sempre que possível, a utilização da biocatálise nas condições ambiente de temperatura e pressão é mais vantajosa e as lipases apresentam atividade nestas condições, fato de grande importância para os processos industriais, pois o gasto de energia requerido para conduzir as reações a elevadas pressões e temperaturas é eliminado. Uma outra vantagem da utilização da biocatálise na condição de temperatura ambiente é a redução na degradação de reagentes e produtos instáveis (HASAN *et al.*, 2006).

Enzimas microbianas são freqüentemente mais práticas do que enzimas derivadas de plantas e animais devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, à facilidade

de manipulação genética, ao fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais, à facilidade de produção em massa devido ao rápido crescimento dos microrganismos em meios baratos. Além disso, podem ser mais estáveis que as suas correspondentes enzimas animais e vegetais e sua produção é mais conveniente e segura (WISEMAN, 1995; SAXENA *et al.*, 2003; HASAN *et al.*, 2006). De modo geral, a maioria das enzimas de uso industrial corrente é de origem microbiana e são produzidas em cultivo aeróbio convencional, em muitos casos através da tecnologia do DNA recombinante (HASAN *et al.*, 2006; SHU *et al.*, 2010).

3.4 Metagenômica e seu emprego na descoberta de novos biocatalisadores

Tradicionalmente, as enzimas microbianas têm sido acessadas na natureza por métodos convencionais de isolamento e cultivo dos organismos a partir de amostras ambientais. Tal abordagem ainda é utilizada atualmente, no entanto, a alta taxa de redescoberta de enzimas e biomoléculas a partir de microrganismos cultiváveis tem mostrado que novas alternativas precisam ser adotadas. Diante deste panorama, metodologias moleculares foram criadas e adaptadas para superar a limitação imposta pela necessidade de cultivo dos microrganismos. Esses estudos têm sido realizados com a utilização da metagenômica, uma técnica de análise molecular do DNA ambiental independente de cultivo (HANDELSMAN *et al.*, 1998; RONDON *et al.*, 2000; TORSVIK e OVREAS, 2002), aliada aos importantes avanços da bioinformática e das novas tecnologias de seqüenciamento de DNA (ANSORGE, 2009; LAPIDUS e MOSELIO, 2009; MACLEAN *et al.*, 2009; PETROSINO *et al.*, 2009; JONES, 2010).

Apenas uma pequena porcentagem destas espécies bacterianas existentes pode ser acessada por técnicas tradicionais dependentes de cultivo. A maior parte (mais de 99%) das bactérias existentes não é cultivável (TORSVIK *et al.*, 1990; HANDELSMAN *et al.*, 1998). O termo metagenômica foi primeiramente usado por Jo Handelsman e atualmente é definido como “a aplicação de técnicas de genômica moderna para o estudo de comunidades de microrganismos diretamente em seus ambientes naturais, sem a necessidade de isolamento e cultivo, em laboratório, das espécies individuais” (HANDELSMAN *et al.*, 1998).

Na técnica metagenômica de análise, um ambiente é selecionado e uma amostra de poucos gramas é coletada. A coleção dos genes presentes na amostra é clonada, gerando um banco de metagenomas. A coleção dos clones que se obtém por este método é denominada

biblioteca metagenômica (KAKIRDE *et al.*, 2010). A prospecção das bibliotecas metagenômicas pode ser prospecção funcional ou prospecção baseada na sequência. Existe também um novo método baseado em expressão denominado prospecção baseada na expressão gênica induzida pelo substrato (UCHIYAMA e WATANABE, 2008).

i) Prospecção funcional (“function-based screening”). Neste processo as colônias são selecionadas com base em uma atividade, como degradação de lipídeos, proteínas, atividade antimicrobiana, resistência a antibióticos, produção de compostos coloridos, bioativos ou atividade antibiótica. Estes ensaios geralmente são feitos em meios de cultura sólidos (LB ágar) suplementados com substratos específicos (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003; KIMURA, 2006; VAKHLU *et al.*, 2008).

ii) Prospecção baseada na sequência (“sequence-based screening”). Neste caso, o que se busca é uma sequência codificadora da proteína de interesse e a busca pode ser executada de duas formas diferentes, embora comumente ambas sejam utilizadas ao mesmo tempo. Estas formas são: (a) o DNA ambiental é extraído e diretamente seqüenciado com seqüenciadores de nova geração (454, SOLiD etc.). As seqüências geradas são agrupadas, formando bancos de seqüências de metagenomas, e uma busca *in silico* com ferramentas de bioinformática é realizada para localizar domínios conservados e similaridades com os genes de interesse que tenham seqüências depositadas em bancos públicos. Quando um domínio ou gene é identificado, iniciadores da PCR (*primers*) ou sondas de hibridização são desenhados para recuperação da seqüência de DNA correspondente; (b) o mesmo DNA ambiental extraído é usado para construção de uma ou mais bibliotecas metagenômicas e os clones são seqüenciados (KIMURA, 2006; VAKHLU *et al.*, 2008).

iii) Prospecção baseada na expressão gênica induzida pelo substrato - SIGEX (“substrate-induced gene expression”). Esta técnica foi desenvolvida para detecção de atividade catabólica em bibliotecas metagenômicas. É utilizado um vetor que permite a clonagem do DNA metagenômico ao gene da proteína GFP (*green fluorescent protein*), sem promotor. Assim, a GFP é expressa quando o gene clonado é induzido pelo substrato correspondente e os clones positivos são identificados por emissão de fluorescência (UCHIYAMA e WATANABE, 2008).

A enorme diversidade biológica e molecular que agora se torna acessível é verdadeiramente surpreendente. Um grama de solo de floresta contém 40 milhões de células

procarióticas, podendo chegar a 2 bilhões em solos cultivados, sendo o número de genomas procarióticos distintos estimado entre 2000 e 18000 por grama de solo (YAN *et al.*, 2006; MOCALI e BENEDETTI, 2010). Estes números podem estar subestimados, pois genomas que representam espécies raras e desconhecidas provavelmente foram excluídos das análises (DANIEL, 2005). Todavia, o número de espécies procarióticas presentes em apenas um grama de solo pode exceder o número de espécies de procariotos atualmente conhecidos.

3.5 Lipases, esterases e outras hidrolases obtidas através da metagenômica

Novas hidrolases têm sido descobertas através da prospecção metagenômica (VOGET *et al.*, 2003; EGGERT *et al.*, 2004; STREIT *et al.*, 2004). A TABELA 1 apresenta algumas das publicações relacionadas com prospecção metagenômica de lipases e esterases. A natureza do ambiente de onde o DNA é extraído pode ser bastante variável, mas existe uma tendência na utilização de fragmentos relativamente grandes de DNA, clonados em vetores do tipo cosmídeo, fosmídeo e BAC, para construção de bibliotecas metagenômicas. Embora vetores do tipo plasmídeo (fragmentos de DNA <10kb) tenham sido empregados com sucesso nesta abordagem, bibliotecas metagenômicas de vetores do tipo cosmídeo e fosmídeo têm sido mais amplamente utilizadas com a vantagem de abrangerem igual ou maior número de genes com menor número de clones (HÅRDEMAN e SJÖLING, 2007; SINGH *et al.*, 2009; KAKIRDE *et al.*, 2010).

Outros tipos de enzimas descobertas através da prospecção metagenômica funcional incluem, por exemplo, agarase (VOGET *et al.*, 2003), amidase (GABOR *et al.*, 2004), amilase (RONDON *et al.*, 2000), enzima de resistência a antibióticos (RIESENFELD, GOODMAN, *et al.*, 2004), quitinase (COTTRELL *et al.*, 1999), celulase (HEALY *et al.*, 1995), DNase (RONDON *et al.*, 2000), 4 – hidroxibutirato desidrogenase (HENNE *et al.*, 1999), álcool oxido-redutase (KNIETSCH *et al.*, 2003), oxigenase (VAN HELLEMOND *et al.*, 2007), degradação de compostos aromáticos (SUENAGA *et al.*, 2007), protease (GUPTA *et al.*, 2002) e xilanase (LEE, C. C. *et al.*, 2006). Os antibióticos e os compostos antimicrobianos também têm sido identificados através de prospecção funcional (BRADY e CLARDY, 2000; WANG *et al.*, 2000; BRADY *et al.*, 2001; MACNEIL *et al.*, 2001; GILLESPIE *et al.*, 2002; COURTOIS *et al.*, 2003).

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS EM BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS (2000 - 2010)

Ambiente	Clones positivos/Clones avaliados	Clones positivos (%)	Vetor	Referência
Solo	4/1.016.000	0,0004	Plasmídeo	(HENNE <i>et al.</i> , 2000)
Solo	2/3.648	0,05	BAC	(RONDON <i>et al.</i> , 2000)
Solo	2/1.532	0,1	Cosmídeo	(VOGET <i>et al.</i> , 2003)
Lago	3/40.000	0,008	Fagemídeo	(REES <i>et al.</i> , 2003)
Solo	8/33.700	0,02	Fosmídeo	(LEE <i>et al.</i> , 2004)
Fonte termal	4/2.000	0,2	Fosmídeo	(RHEE <i>et al.</i> , 2005)
Água do mar	5/7.000	0,07	Fagemídeo	(FERRER, GOLYSHINA, <i>et al.</i> , 2005)
Rúmen de bovino	12/14.000	0,006	Fagemídeo	(FERRER, REYES-DUARTE, <i>et al.</i> , 2005)
Água de lagoa	11/30.000	0,04	Plasmídeo	(RANJAN <i>et al.</i> , 2005)
Solo	1/60.000	0,002	Fosmídeo	(KIM <i>et al.</i> , 2006)
Sedimento marinho	4/386.400	0,001	Fosmídeo	(LEE, M. H. <i>et al.</i> , 2006)
Solo contaminado e água	1/2.500 e 1/1.600	0,04 e 0,06	Cosmídeo	(ELEND <i>et al.</i> , 2006)
Sedimento marinho	1/*	*	Fosmídeo	(PARK <i>et al.</i> , 2007)
Sedimento marinho	70/7.000	1,0	Fosmídeo	(HÅRDEMAN e SJÖLING, 2007)
Adubo orgânico	14/21.000	0,07	Plasmídeo	(LÄMMLE <i>et al.</i> , 2007)
Água do mar	4/20.000	0,02	BAC	(CHU <i>et al.</i> , 2008)
Solo	6/93.000	0,006	Plasmídeo	(LI <i>et al.</i> , 2008)
Fonte termal	2/36.000	0,006	Plasmídeo	(TIRAWONGSAROJ <i>et al.</i> , 2008)
Lodo ativado	1/100.000	0,001	Plasmídeo	(ROH e VILLATTE, 2008)
Biomassa	10/10.000	0,1	Cosmídeo	(MEILLEUR <i>et al.</i> , 2009)
Solo	2/800	0,07	Plasmídeo	(WEI <i>et al.</i> , 2009)
Água de rio	1/8.000	0,01	BAC	(WU e SUN, 2009)
Sedimento marinho	6/60.132	0,01	Fosmídeo	(JEON, KIM, KANG, <i>et al.</i> , 2009)
Rúmen bovino	18/15.360	0,1	BAC	(LIU, K. L. <i>et al.</i> , 2009)
Lodo ativado	12/3.818	0,3	Plasmídeo	(LIAW <i>et al.</i> , 2010)
Adubo orgânico	19/23.400	0,08	Fosmídeo	(KIM <i>et al.</i> , 2010)
Sedimento marinho	19/40.000	0,05	Fosmídeo	(HU <i>et al.</i> , 2010)

* dado não disponível.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Estirpes de E. coli e vetores*

Escherichia coli EPI300TM-T1^R e o vetor fosmidial pCC2FOS (CopyControl Fosmid Library Production Kit, Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) foram usados para a construção da biblioteca metagenômica. *E. coli* DH10B e os vetores pUC18 e pCR2.1 (Invitrogen Life Technologies, EUA) foram utilizados nas etapas de subclonagem. *E. coli* BL21(DE3) e o vetor pET-28a(+) (Novagen, Madison, WI, EUA) foram utilizados para expressão da proteína recombinante. Os meios de cultivo utilizados foram feitos conforme descrito na literatura (AUSUBEL *et al.*, 2003), com exceção dos meio seletivos usados para prospecção funcional.

4.2 *Reagentes e enzimas*

Para a amplificação do DNA por PCR, foi usada a enzima Fidelity PCR Master Mix (USB, Cleveland, OH, EUA), T4 DNA ligase. Para clonagem foram usadas as enzimas T4 DNA polimerase, fragmento de Klenow, T4 polinucleotídeo quinase (PKN) e fosfatase alcalina (SAP), adquiridas da Fermentas (Glen Burnie, MD, EUA). Os ensaios de cromatografia de afinidade foram feitos com uma coluna HiTrap Chelating HP de 5 mL (GE Life Sciences, Uppsala, Sweden). Com exceção dos triacilgliceróis naturais, que foram comprados no supermercado, os reagentes e substratos empregados nos testes de atividade foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

4.3 *Coleta do solo e extração do DNA*

As amostras foram coletadas das margens de uma lagoa anaeróbia da estação de tratamento de efluentes da Perdigão S/A, localizada na cidade de Carambeí/PR (coordenadas GPS: 24°56'11.11"S, 50°7'27.06"O). Amostras de solo coletadas entre a superfície e 3 cm de profundidade foram armazenadas por 24 horas à temperatura ambiente e submetidas à extração de DNA pelo método de lise indireta (HÅRDEMAN e SJÖLING, 2007). Cem gramas de solo e 100 mL de tampão TE-pirofosfato (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM de pirofosfato de sódio, pH 8,0) foram misturados e agitados lentamente por 30 min. Após

este período, 100 mL de tampão CTAB (50 mM de Tris-HCl, 20 mM de EDTA, 0,15 M de NaCl, 27 mM de CTAB, pH 8,0) foram adicionados e a mistura foi agitada com um mixer manual por 30 segundos na velocidade máxima. A amostra foi então dividida em duas partes e centrifugada a 500×g por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante contendo as células procarióticas foi separado e o precipitado foi ressuspensão em 200 mL de tampão CTAB. As etapas de agitação e centrifugação foram então repetidas mais duas vezes. Os sobrenadantes foram unidos e centrifugados a 10.000×g por 30 minutos a 10°C. O precipitado de células foi ressuspensão em 10 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Alíquotas de 750 µL de células ressuspensas foram incubadas com 30 µL de 10% SDS e 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) por 1 h a 37°C. Então, 100 µL de uma solução 5M de NaCl foram adicionados e a mistura foi agitada. Foram adicionados 80 µL de uma solução de CTAB/NaCl (10% CTAB, 0,7 M de NaCl) e a mistura foi agitada e incubada a 65°C por 10 min. O DNA foi então extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com etanol (AUSUBEL *et al.*, 2003).

4.4 Construção da biblioteca metagenômica e seleção de clones com atividade esterásica e lipásica

O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 0,7% em tampão TAE a 20 V/cm. As bandas de DNA entre 20-40 kb foram cortadas do gel e o DNA extraído pelo método do fenol (SAMBROOK *et al.*, 1989). A concentração do DNA foi medida em um fluorômetro Qubit com o kit de análise “Quant-iT dsDNA BR” (Invitrogen Life Technologies, USA). Uma amostra de DNA com aproximadamente 40 kb foi utilizada para construção da biblioteca metagenômica usando o kit “CopyControl Fosmid Library production”, de acordo com as recomendações do fabricante (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). Para seleção de clones com atividade, os transformantes foram diretamente plaqueados em placas de ágar contendo 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura, 13 g/L de ágar bacteriológico (RM026, HIMEDIA, Mumbai, Índia), 10 g/L de goma arábica, 12,5µg/mL de cloranfenicol e 1% (v/v) de tributirina (C4:0) como substrato. As células foram incubadas a 37°C por quatro dias e os transformantes ativos (que apresentaram halos de hidrólise ao redor das colônias) foram isolados como possíveis produtores de lipases ou esterases. Os clones selecionados foram armazenados a -24°C em placas de 96 poços com Terrific Broth/glicerol (3/1) e submetidos a uma segunda etapa de

seleção para atividade esterásica no mesmo meio mas contendo tricaprilina (C8:0) 1% (v/v). Os clones positivos em tricaprilina foram transferidos para placas de 96 poços e armazenados. Finalmente, para identificar os clones produtores de lipases entre os clones ativos contra tricaprilina, uma etapa de seleção em meio contendo trioleína (C18:1) 1% (v/v) foi realizada. Três clones que apresentaram os maiores halos de hidrólise (FosC12, FosE6 e FosH10) foram selecionados para a etapa de subclonagem e sequenciamento.

4.5 Subclonagem e sequenciamento

Os foscímicos FosC12, FosE6 e FosH10 foram purificados por miniprep (AUSUBEL *et al.*, 2003), retransformados em células *E. coli* EPI300TM-T1^R por eletroporação e os transformantes foram testados em meio contendo trioleína 1% (v/v) para eliminar possíveis clones falso positivos. A análise de restrição dos foscímicos foi feita com a enzimas *EcoRI*. O DNA fosmidial dos clones FosC12, FosE6 e FosH10 foi purificado com o kit NucleoBond Xtra Midi (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany), nebulizado, as pontas foram reparadas com as enzimas T4 DNA polimerase, fragmento de Klenow e T4 polinucleotídeo quinase (SAMBROOK *et al.*, 1989) e os fragmentos de aproximadamente 2 kb foram isolados por eletroforese em gel de agarose TAE a 0,7% (NucleoSpin Extract II kit, MACHEREY-NAGEL). Os fragmentos de DNA foram então ligados com a enzima T4 DNA ligase ao vetor pUC18, o qual foi previamente digerido com a enzima *SmaI* e desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina (SAP). A mistura de ligação foi eletroporada em células de *E. coli* DH10B, as colônias brancas foram dispostas em placas de 96 poços e os subclones com atividade lipolítica foram selecionados em meio ágar suplementado com 1% de trioleína e 100 µg/mL de ampicilina.

Após extração e purificação do DNA fosmidial (AUSUBEL *et al.*, 2003), os insertos dos subclones ativos foram sequenciados (ABI PRISM 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems, USA) a partir de ambas as extremidades com os iniciadores m13 reverso e universal e com o kit DYEnamic ET Dye Terminator (Amersham Biosciences, USA). A sequências foram montadas com o programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA) e as ORFs (*open reading frames*) foram identificadas com o programa *ORF Finder* (WHEELER *et al.*, 2008) acessado através do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequências de aminoácidos foram comparadas com a base de dados de sequências não-redundantes do NCBI através do algoritmo BLASTX (ALTSCHUL

et al., 1997). Os fósmeos FosC12, FosE6 e FosH10 possuíam o mesmo gene, que codifica para uma lipase. Dessa forma, nos passos seguintes foi utilizado o fósmeo FosC12 e a lipase foi denominada LipC12 (gene *lipC12*).

4.6 Análise da sequência da lipase LipC12 e construção da árvore filogenética

A predição de regiões transmembrana e de peptídeo sinal foram feitas com os programas TMHMM 2.0 (KROGH *et al.*, 2001) e SignalP 3.0 (BENDTSEN *et al.*, 2004), respectivamente. A análise teórica da solubilidade da proteína foi realizada com o programa SOSUI (HIROKAWA *et al.*, 1998). A ferramenta ProtParam foi utilizada para calcular os parâmetros teóricos da proteína (GASTEIGER *et al.*, 2005). Os alinhamentos de sequência foram realizados com o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) em combinação com o programa Geneious (Biomatters Ltd, Auckland, Nova Zelândia). A análise filogenética foi realizada com o método *neighbor-joining* através do programa MEGA versão 5 (TAMURA *et al.*, 2007). Os programas GeneDoc versão 2.7 (NICHOLAS *et al.*, 1997) e ALINE (BOND e SCHUTTELKOPF, 2009) foram utilizados para exibir os alinhamentos das sequências.

4.7 Clonagem do gene lipC12

O iniciador universal LipC12.L (5'CAACGTCAAAGAGGTTATTC3') e o iniciador reverso LipC12.R (5'CGAGTGCTATCGTTCATTTA3') foram utilizados na reação de PCR (PCR Master Mix Fidelity, USB, EUA) para a amplificação do fragmento de 966 pares de base que contém o gene da lipase LipC12. O gene amplificado foi clonado no vetor pCR2.1 (TA Cloning Kit, Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações técnicas do fabricante e os plasmídeos recombinantes foram transformados em células *E. coli* DH10B por eletroporação. As colônias brancas foram selecionadas, os plasmídeos purificados (AUSUBEL *et al.*, 2003) e os insertos seqüenciados com os iniciadores M13 reverso e universal para confirmar a ausência de mutações no gene *lipC12* e verificar a orientação da ligação. Um plasmídeo recombinante foi então digerido com as enzimas NdeI e BamHI, o inserto foi ligado no vetor pET28a(+), previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição e desfosforilado com SAP, gerando o plasmídeo pET28a-*lipC12*. A inserção do gene *lipC12* no vetor pET28a(+) foi verificada com iniciadores da região promotora e da região

terminadora do fago T7. O plasmídeo pET28a-*lipC12* foi então inserido em células *E. coli* BL21(DE3) para expressar a lipase recombinante LipC12.

4.8 Teste de indução da expressão com IPTG e avaliação da solubilidade de LipC12

Uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) com o plasmídeo pET28a-*lipC12* foi inoculada em 5 mL de LB com ampicilina (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e incubada por 12-16 h a 37°C em agitador orbital a 250 rpm. O inóculo foi diluído em (1/100) em 10 mL de LB com ampicilina (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e incubado a 37°C em agitador a 250 rpm até uma DO_{600} de 0,6. Uma alíquota de 400 μL foi retirada antes de indução com IPTG (tempo 0), centrifugada a $9.000\times g$ por 1 min, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensão em 110 μL de tampão de amostra 2X. A expressão foi induzida com IPTG (0,4 mM) e mais quatro alíquotas de 400 μL foram coletadas a cada uma hora (tempo 1-4), centrifugadas e ressuspensas em 110 μL de tampão de amostra 2X. As alíquotas foram aquecidas a 100°C por 5 min e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), aplicando-se 10 μL de amostra.

Para avaliação da solubilidade da enzima LipC12, células *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET28a-*lipC12* foram cultivadas em 30 mL de meio LB a 37°C até uma DO_{600} de 0,5 e induzidas pela adição de IPTG até uma concentração final de 0,5 mM. A cultura induzida foi então incubada por 16 horas a 20°C e as células foram coletadas por centrifugação ($10.000\times g$ por 5 min) a 4°C. O precipitado de células foi ressuspensão em 30 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM de imidazol, 10% (v/v) de glicerol, 0,25% (m/v) Nonidet P-40, 10 mM de β -mercaptoetanol) e as células foram lisadas por ultrassom em banho de gelo (10 ciclos de pulsos de 60s, 90 W, com intervalos de 30 s) com um sonicador (SONICATOR® XL 2020, Heat systems-Ultrasonics Inc., New Highway, Farmingdale, NY, EUA). Uma amostra de 400 μL foi coletada e o extrato bruto (EB) foi então centrifugado ($15.000\times g$ por 30 min) a 4°C para sedimentar os restos celulares. O sobrenadante foi separado e uma amostra de 400 μL foi coletada (SB). O precipitado foi ressuspensão em 30 mL de tampão de lise e uma amostra de 400 μL foi coletada (PPT). As amostras EB, SB e PPT foram misturadas ao tampão de amostra, aquecidas a 100°C por 5 min e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), aplicando-se 10 μL de amostra.

4.9 Superexpressão e purificação da lipase LipC12

Células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET28a-*lipC12* foram cultivadas em 200 mL de meio LB a 37°C até uma DO_{600} de 0,5 e induzidas pela adição de IPTG até uma concentração final de 0,5 mM. A cultura induzida foi então incubada por 16 horas a 20°C e as células foram coletadas por centrifugação (10.000×g por 5 min) a 4°C. O precipitado de células foi ressuspensão em 35 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM de imidazol, 10% (v/v) de glicerol, 0,25% (m/v) Nonidet P-40, 10 mM de β -mercaptoetanol) e as células foram lisadas por ultra-som em banho de gelo (10 ciclos de pulsos de 60s, 90 W, com intervalos de 30 s) com um sonicador (SONICATOR® XL 2020, Heat systems-Ultrasonics Inc., New Highway, Farmingdale, NY, EUA). O extrato bruto foi então centrifugado (15.000×g por 30 min) a 4°C para sedimentar os restos celulares. O sobrenadante contendo a proteína com cauda de histidina foi carregado em uma coluna HiTrap HP Chelating (GE Healthcare, EUA), previamente carregada com Ni^{2+} , utilizando um sistema de cromatografia ÄKTAbasic (GE Healthcare, EUA). A coluna foi lavada com cinco volumes de tampão de lise e ainda com cinco volumes de tampão de eluição (50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM de imidazol, 10% (v/v) de glicerol). A proteína foi eluída com um gradiente crescente de imidazol de até 500 mM no tampão de eluição. A eluição da proteína foi monitorada a 280 nm, as frações com a proteína de interesse foram selecionadas por SDS-PAGE, agrupadas e dialisadas a 4°C em tampão de armazenagem (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$) para eliminar o imidazol. Glicerol na concentração final de 50% (v/v) foi adicionado à solução tampão da proteína como um agente crioprotetor e a proteína foi armazenada a -24°C.

4.10 Determinação do teor de proteína, SDS-PAGE e zimograma

A concentração de proteína foi determinada com o kit “Pierce BCA Protein Assay” (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) tendo albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Eletroforese de proteína (SDS-PAGE) foi feita com gel de poliacrilamida a 12% (m/v) (LAEMMLI, 1970), os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorados com metanol/ácido acético/água (5/1/4 v/v/v). A análise densitométrica do gel corado foi realizada utilizando o programa LABWORKS “Image Acquisition and Analysis” na versão 4.0 (UVP BioImaging Systems, Upland, CA, EUA). A atividade lipolítica nas

bandas da proteína recombinante do gel de SDS-PAGE foi detectada usando tributirina e tricaprilina como substratos, conforme protocolo descrito na literatura (OH *et al.*, 1999), mas com as seguintes modificações: a amostra aplicada no gel não foi previamente fervida 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 isento de detergente. Posteriormente, o gel foi colocado sob uma emulsão de ágar com tributirina ou tricaprilina para detecção da atividade lipolítica e incubado a 30°C até o aparecimento dos halos de hidrólise. A emulsão de ágar com o substrato foi preparada com 1,3% (m/v) de ágar, 1% (v/v) de tributirina ou tricaprilina, 25 mM Tris-HCl pH 8 e 1 mM CaCl₂. Uma metade do gel de eletroforese foi utilizada para o zimograma enquanto a outra metade foi corada com Coomassie Brilliant Blue para localizar a banda da enzima.

4.11 Análise de MALDI-TOF/MS

Os espectros de massa MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization MALDI time-of-flight TOF mass spectra* MS) da proteína LipC12 foram adquiridos em um espectrômetro MALDI-TOF/TOF II Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), no modo refletor de íons positivos com uma voltagem de aceleração de 20 kV, tempo de atraso de 150 ns e range de aquisição de massa entre 800-3200 Da. A banda correspondente à proteína LipC12 foi cortada manualmente do gel e digerida com tripsina (Promega, Madison, EUA), conforme descrito na literatura (WESTERMEIER e NAVEN, 2002). A amostra foi dessalinizada usando uma microcoluna ZipTipC₁₈ (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) e eluída diretamente na placa de análise, utilizando uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila 50% (v/v) e TFA 0,1%. Os picos foram identificados por comparação das massas obtidas com a digestão *in silico* da sequência da proteína usando os programas PeptideCutter e MS-Digest (GASTEIGER *et al.*, 2005).

4.12 Análises de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência total

As amostras de proteína foram analisadas a 15 μ M em diferentes temperaturas (15°C – 95°C) em cubeta de quartzo de 1 mm. Os ensaios térmicos foram realizados em tampão fosfato e cloreto de sódio (20 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,4). Os espectros de DC e fluorescência total foram obtidos em espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Easton,

MD, EUA) equipado com unidade Peltier de controle de temperatura e acessório de detecção de fluorescência total. Cada espectro de DC representa a média de cinco varreduras na faixa de 195 - 280 nm, com velocidade de escaneamento de 50 nm/min e resolução de banda de 0,2 nm.

A estimativa do conteúdo de estrutura secundária foi feita através do servidor DICHROWEB pelo método CDSSTR (WHITMORE e WALLACE, 2008). A desnaturação térmica da proteína foi evidenciada pela redução do conteúdo de α -hélice, monitorada pela depleção do sinal de DC em 222 nm. Os cálculos foram efetuados assumindo o perfil de estrutura secundária da enzima a 15°C como nativo e sem desnaturação (WOODY, 1995).

Análises de espectroscopia de fluorescência total foram realizadas com comprimento de onda de excitação de 280 nm e varredura das emissões no range de 250-450 nm, correspondente à contribuição na emissão dos resíduos tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e triptofano (Trp). A formação do estado de agregação foi seguida pela razão das intensidades de emissão 280 nm/340 nm (INVERNIZZI *et al.*, 2009).

4.13 Modelagem estrutural por homologia

A modelagem por homologia foi realizada utilizando o programa MODELLER (ESWAR *et al.*, 2007). As sequências homólogas utilizadas como modelos estruturais foram selecionadas com o algoritmo MHOLline (GMMSB e FISBIO, 2010) e obtidas no banco de sequências *Protein Data Bank* (PDB). O íon cálcio foi posicionado no modelo com o programa Coot versão 0.6.1 (EMSLEY e COWTAN, 2004). A qualidade estereoquímica do modelo final foi avaliada pelos programas PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993), WHATCHECK (HOOFT *et al.*, 1996), ProSA-web (WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007) e QMEAN (BENKERT *et al.*, 2008). Superposições estruturais foram realizadas com o programa DaliLite (HOLM e PARK, 2000). As imagens das estruturas moleculares foram criadas com o programa PyMOL versão 1.3 (Schrödinger, Cambridge, MA).

4.14 Determinação espectrofotométrica da atividade lipolítica utilizando ésteres de *p*-nitrofenil (*pNP*) como substrato

4.14.1 Ensaio padrão

As atividades enzimáticas foram determinadas pela medida a 410 nm da quantidade de *p*-nitrofenol liberado do éster de *p*-nitrofenila (WINKLER e STUCKMANN, 1979), conforme reação ilustrada na FIGURA 6, por pelo menos 30 min a 30°C em um espectrofotômetro de microplacas (TECAN Infinite Series M200 microplate spectrophotometer, TECAN, Salzburg, Áustria). No ensaio padrão, a solução do substrato foi feita misturando-se uma solução estoque de 20 mM de palmitato de *p*-nitrofenila (*pNPP*) em acetonitrila/isopropanol (4/1 v/v) com um tampão de análise contendo Tris-HCl pH 7,5, CaCl₂ e Triton X-100. A mistura foi feita sob agitação e em banho-maria a 60 °C até que a solução se tornou transparente. Em seguida, 230 µL da solução do substrato foram pipetados em uma placa transparente de 96 poços (Greiner®) e a reação foi iniciada pela adição automática (com o módulo injetor do espectrofotômetro de microplacas) de 20 µL da solução enzimática (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM CaCl₂). O volume final da mistura de reação (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 1 mM CaCl₂, 0,3% (v/v) de Triton X-100, 5 nM de enzima, 1 mM *pNPP*, 4% (v/v) de isopropanol, 1% (v/v) acetonitrila) foi de 250 µL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, curvas de calibração para o *p*-nitrofenol (FIGURA 7) foram feitas para cada condição reacional e o efeito da hidrólise não enzimática dos substratos foi subtraído. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 µmol de *p*-nitrofenol produzido por minuto. Regressões lineares para determinação das velocidades iniciais de reação e os desvios padrão das médias foram feitos no programa Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA).

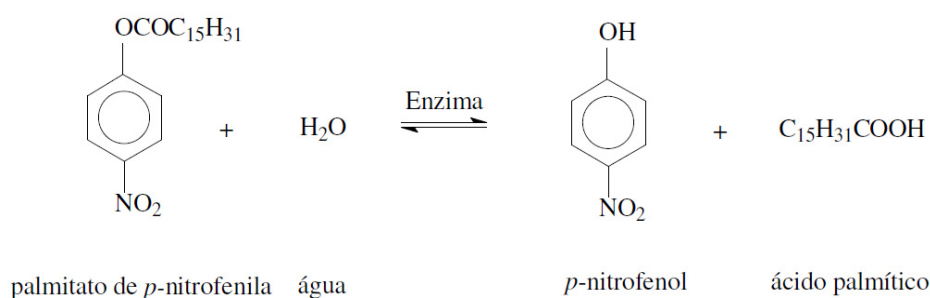


FIGURA 6 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PALMITATO DE *p*-NITROFENILA (*pNPP*)
 Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico.

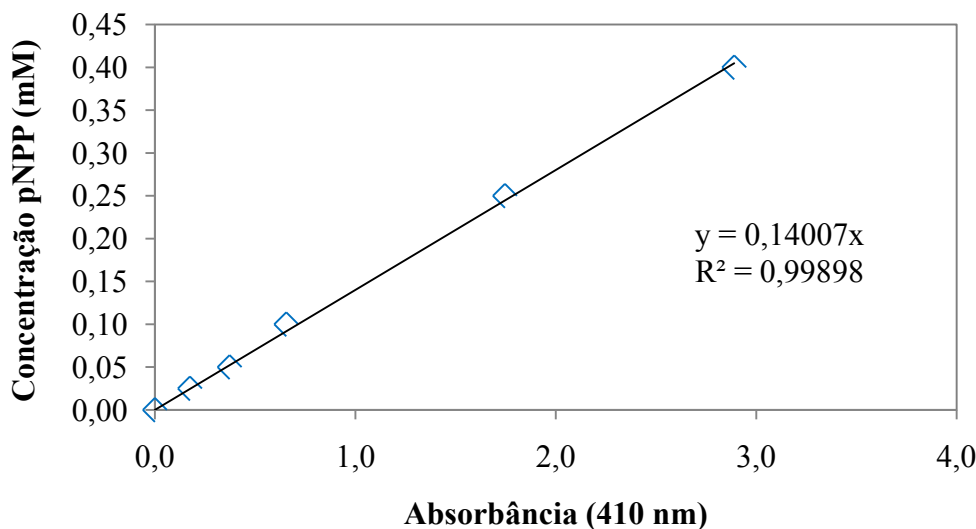


FIGURA 7 – CURVA DE ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE *p*NP

Curva de calibração utilizada para calcular a concentração do *p*-nitrofenol liberado durante as reações enzimáticas. Esta curva foi feita com diferentes concentrações de *p*-nitrofenol (0-0,4 mM) dissolvido na mesma solução utilizada no ensaio padrão (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 1 mM CaCl₂, 0,3% (v/v) de Triton X-100, 4% (v/v) de isopropanol, 1% (v/v) acetonitrila).

4.14.2 Determinação da especificidade da enzima pelo substrato

A especificidade pelo substrato foi determinada utilizando os substratos acetato de *p*-nitrofenila (C2:0), butirato de *p*-nitrofenila (C4:0), valerato de *p*-nitrofenila (C5:0), caproato de *p*-nitrofenila (C6:0), decanoato de *p*-nitrofenila (C10:0), dodecanoato de *p*-nitrofenila (C12:0), miristato de *p*-nitrofenila (C14:0) e palmitato de *p*-nitrofenila (C16:0) no ensaio padrão de determinação da atividade.

4.14.3 Determinação da temperatura de máxima conversão do substrato pela enzima

A temperatura de máxima conversão do substrato para um tempo de reação de 1 h foi determinada pela incubação da enzima por uma hora com éster de *p*-nitrofenila (2 nM de enzima, 10 mM butirato de *p*-nitrofenila, MES 50 mM pH 6,0, 1 mM CaCl₂, 0,3% (v/v) de Triton X-100, 4% (v/v) de isopropanol, 1% (v/v) acetonitrila) em um volume de reação de 50 µL em diversas temperaturas entre de 10°C e 60°C. Em relação ao ensaio padrão, o butirato

de *p*-nitrofenila foi usado ao invés do *p*NPP para minimizar as variações de solubilidade do substrato com a temperatura de reação e o pH da reação foi diminuído de 7,5 para 6,0 para minimizar a autohidrólise do substrato. A reação foi realizada em placa de PCR de 96 poços em termociclador (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) configurado no modo gradiente de distribuição de temperatura. Após o término do tempo de incubação, a placa foi imediatamente colocada no gelo e a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 μ L de 0,1 M HCl. Em seguida, 125 μ L foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, completados para 250 μ L com água deionizada e a quantidade de *p*-nitrofenol liberado foi medida a 348 nm. A absorção do *p*-nitrofenol a 410 nm diminui à medida que o pH se torna mais ácido, devido a alterações no equilíbrio entre o *p*-nitrofenol e o *p*-nitrofenóxido. No comprimento de onda de 348 nm, ponto isobéstico para este sistema, a absorção independe do pH do meio (RHEE *et al.*, 2005).

4.14.4 Determinação do efeito da ação de cátions e ânions sobre a atividade enzimática

Para as análises envolvendo cátions, a enzima (250 nM) foi previamente incubada em uma solução de 1 mM EDTA/50 mM Tris-HCl pH 7,5, durante 1 h, para remoção de possíveis cátions ligados à estrutura da enzima. Após este período, foi adicionado nos poços da placa de 96 poços 20 μ L da solução enzimática, 25 μ L de uma solução com o cátion a ser analisado e 205 μ L de solução de substrato (com 0,5 mM de EDTA), resultando em 250 μ L de mistura de reação (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 1 mM do cátion a ser analisado, 0,3% (v/v) de Triton X-100, 20 nM de enzima, 1 mM *p*NPP, 0,45 mM EDTA, 4% (v/v) de isopropanol, 1% (v/v) acetonitrila) que foi monitorada a 410 nm, conforme descrito no ensaio padrão. O efeito dos cátions na atividade enzimática da enzima sem a prévia depleção de cátions com EDTA também foi verificado. Para as análises envolvendo os ânions, a depleção de cátions com EDTA não foi realizada. Todos os ânions adicionados estavam na forma de sais de sódio.

4.14.5 Determinação do efeito de inibidores, detergentes e goma arábica sobre a atividade enzimática

O efeito sobre a atividade enzimática dos seguintes reagentes foi investigado: EDTA, EGTA, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), dietilpirocarbonato (DEPC), Tween 20, Tween

40, Tween 80, Triton X-100, Nonidet P-40 (NP40), dodecil sulfato de sódio (SDS), N-lauroil sarcosina (NLS), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) e goma arábica. Para estes ensaios, a determinação da atividade enzimática foi feita conforme o ensaio padrão, exceto que os reagentes listados acima foram previamente adicionados na mistura de reação.

4.14.6 Determinação da termoestabilidade da enzima

A termoestabilidade foi determinada através da análise da atividade enzimática residual após incubação da enzima (250 nM de enzima, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, CaCl₂ 5 mM) em diferentes temperaturas na faixa de 0°C a 90°C durante 1 h. A incubação foi realizada em termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) operando em modo gradiente, em tubos de 200 µL preenchidos com um volume de 50 µL. Óleo mineral foi adicionado nos tubos para evitar evaporação. Após o término do tempo de incubação, os tubos foram resfriados em gelo e a atividade residual foi determinada com 10 nM de enzima na mistura de reação.

4.14.7 Determinação da estabilidade da enzima em solventes orgânicos

A estabilidade em solventes orgânicos foi determinada através da análise da atividade enzimática residual após incubação da enzima (500 nM) em soluções com 15% ou 30% (v/v) de solventes orgânicos em tampão Tris-HCl 200 mM pH 8, CaCl₂ 5 mM a 4°C por 48 h. Os seguintes solventes foram utilizados: metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, tetrahidrofurano (THF), dioxana, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e glicerol. A fim de equalizar as diferentes concentrações dos solventes na incubação para a análise da atividade residual, a concentração final da incubação a 15% (v/v) foi corrigida para 0,3% (v/v). A concentração de enzima no ensaio foi 5 nM (a enzima foi diluída 100 vezes antes da análise da atividade residual).

4.14.8 Análise da estabilidade e atividade em diferentes concentrações de sal

A enzima foi incubada na concentração de 785 nM (1 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) em diferentes concentrações de NaCl (concentração máxima de 3,7 M) por 24 h a 4°C. Para análise da atividade residual, as diferentes concentrações de sal foram equalizadas para 37 mM e a concentração de enzima no ensaio foi de 7,85 nM. A determinação da atividade em altas concentrações de NaCl foi feita conforme o ensaio padrão exceto pelo fato do NaCl ter sido adicionado no tampão de reação.

4.14.9 Determinação da estabilidade da enzima em diferentes valores de pH

A enzima foi incubada (500 nM) em diferentes tampões e valores de pH por 24 h a 4°C e a atividade residual da enzima foi então determinada. Para a faixa de valores de pH entre 3,0 e 11,0, os tampões utilizados foram: acetato de sódio 50 mM (pH 3,0 a 5,5), MES 50 mM (pH 5,5 a 7,0), HEPES 50 mM (pH 7,0 a 7,5) e glicina 50 mM (pH 7,5-11). A enzima foi diluída 100 vezes no tampão HEPES (50 mM, pH 7,5) para análise da atividade residual usando o ensaio padrão.

4.15 Determinação titulométrica da atividade lipolítica utilizando triacilgliceróis como substratos

4.15.1 Ensaio padrão

As emulsões empregadas nos ensaios consistiram do substrato (triacilgliceróis) 67 mM, goma arábica 3% (m/v), CaCl₂ 2 mM, Tris-HCl 2,5 mM e 150 mM NaCl, em água destilada (TISS *et al.*, 2001). A solução foi emulsionada com um mixer doméstico (400 Watts, Royal Philips Electronics) na máxima potência, inicialmente por 10 minutos e por mais 2 minutos imediatamente antes do uso. Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados automaticamente em um titulador Metrohm 718 STAT Titrimo (Metrohm, Herisau, Suíça), com 0,05 M de NaOH por 5 min. As reações foram feitas em um reator de vidro termostaticado a 30°C contendo 20 mL da emulsão do substrato e 6,68 µg da enzima purificada dissolvida em 200 µL da solução tampão (Tris-HCl 2,5 mM pH 8, CaCl₂ 5 mM).

Durante a titulação o pH foi mantido fixo em 8,5. Todas as medições foram realizadas em triplicata, a hidrólise química do substrato foi descontada e foram feitas correções para a dissociação parcial do graxo. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a liberação de um μmol de ácido graxo por minuto.

4.15.2 Avaliação da atividade enzimática em diferentes valores de pH

Neste ensaio a tributirina foi empregada como substrato (ELEND *et al.*, 2006), os demais parâmetros e condições foram os mesmos do ensaio padrão, exceto que o pH foi fixado em diferentes valores (pH 4 a 10). A hidrólise química do substrato foi descontada e foram feitas correções para a dissociação parcial do ácido butanóico assumindo um pK_a de 4,57 (EQUAÇÃO 1).

$$fc = \frac{1 + 10^{(pH - pK_a)}}{10^{(pH - pK_a)}}$$

EQUAÇÃO 1 – FATOR DE CORREÇÃO PARA A ATIVIDADE DA LIPASE

O fator de correção (fc) é utilizado para corrigir a atividade da lipase de acordo com o ácido graxo liberado. O fator de correção é uma função da constante de dissociação ácida (K_a), característica para cada ácido graxo, e do pH do meio reacional.

4.15.3 Avaliação da atividade enzimática em diferentes concentrações de NaCl

O NaCl foi pesado e diretamente adicionado na emulsão até a concentração de 5 M. Óleo de oliva foi utilizado como substrato e os demais parâmetros foram utilizados conforme o ensaio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Coleta da amostra de solo, construção da biblioteca metagenômica e seleção de clones ativos

As amostras foram coletadas nas margens de uma lagoa anaeróbia da estação de tratamento de efluentes de uma indústria de processamento e embalagem de carnes e laticínios localizada no interior do estado do Paraná (FIGURAS 8 e 9).



FIGURA 8 –ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES

Imagem via satélite da estação de tratamento de efluentes. As lagoas anaeróbias estão indicadas na figura. Acima das lagoas encontram-se dois reatores aeróbios (formato retangular) e dois decantadores (formato circular).

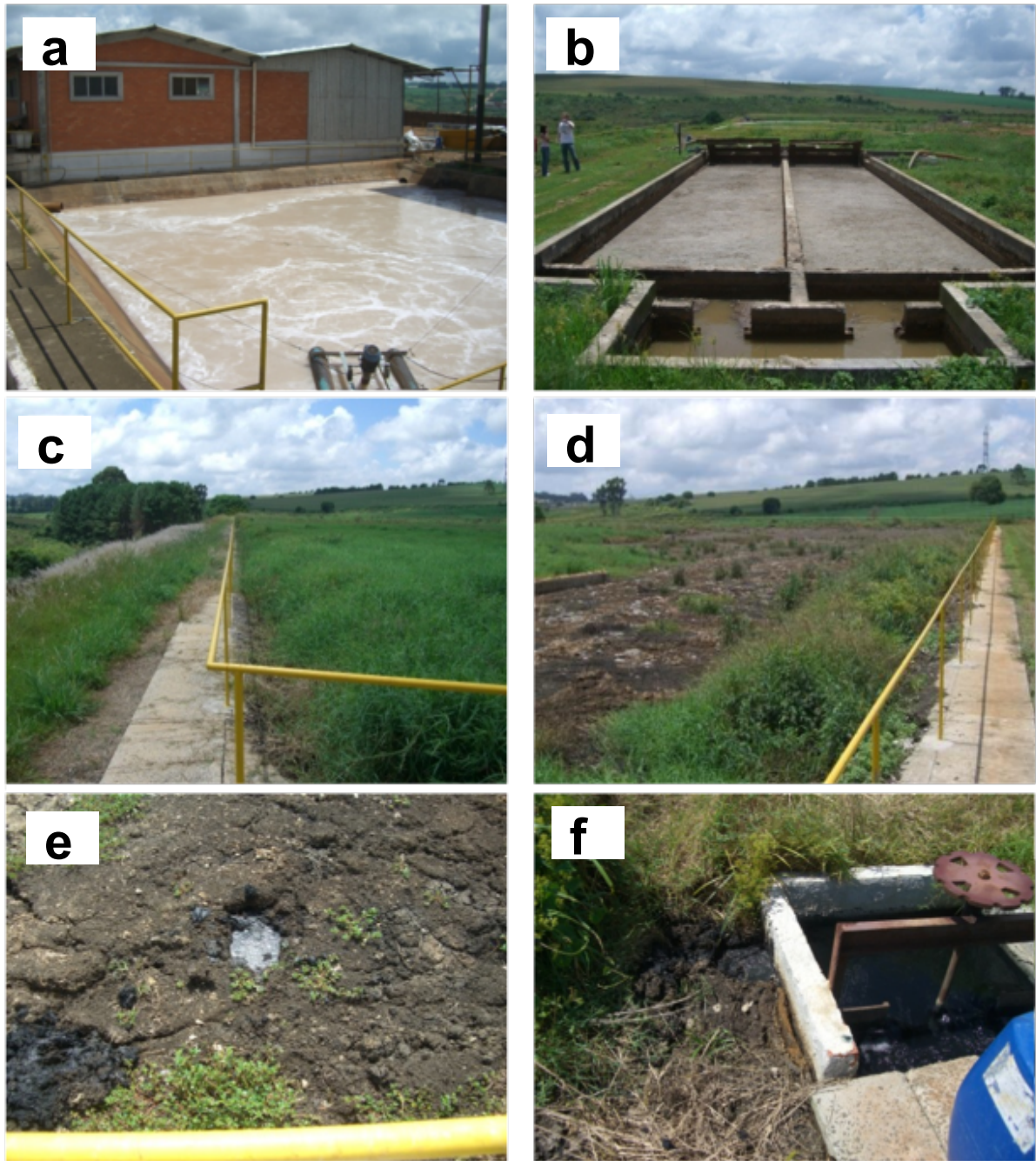


FIGURA 9 – DETALHES DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES

O efluente é recebido no tanque de mistura de efluentes (a), encaminhado para a caixa de gordura (b) e em seguida para a lagoa anaeróbia (c, d, e). Em (f), detalhe do ponto de saída do efluente de uma das lagoas anaeróbias.

O efluente processado na estação de tratamento de efluentes tem elevado teor de gordura animal o qual contamina o solo nas margens da lagoa anaeróbia provavelmente favorecendo o desenvolvimento de uma microbiota capaz de degradar a gordura existente.

O DNA extraído do solo pelo método de extração indireta apresentou massa molecular elevada o suficiente (em torno de 36 kb) para clonagem (FIGURA 10a). Após seleção de tamanho em gel de agarose, uma fração com massa molecular média por volta de 36 kb foi escolhida para clonagem no vetor pCC2FOS (trilha 2, FIGURA 10b).

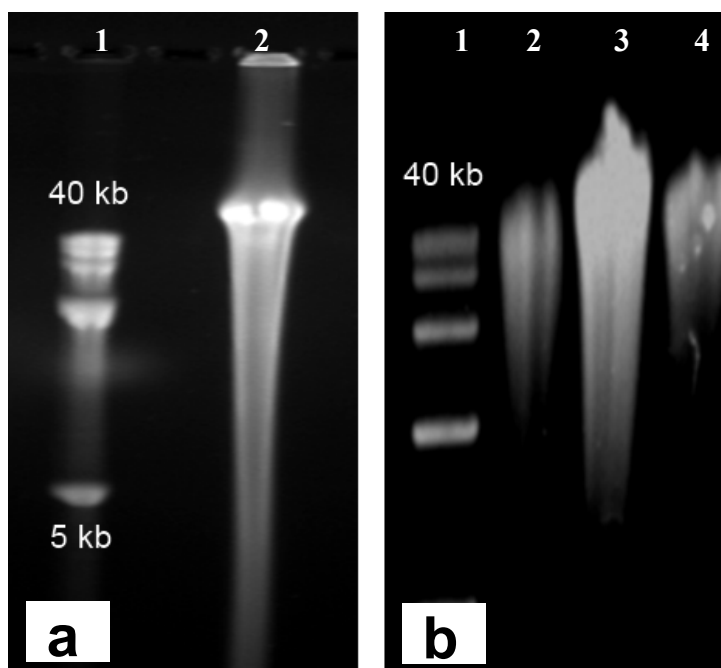


FIGURA 10 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA AMBIENTAL EXTRAÍDO

(a) DNA extraído pelo método indireto. Marcador molecular na trilha 1 e amostra do DNA extraído na trilha 2. (b) Perfil das frações obtidas (trilhas 2-4) após seleção de tamanho em gel de agarose 1%. O DNA da trilha 2 foi escolhido para clonagem no vetor pCC2FOS. Marcador molecular (5-40 kb) na trilha 1.

A biblioteca metagenômica gerada, denominada SCGA (Solo Contaminado com Gordura Animal), possui cerca de 500.000 clones. A seleção dos clones com atividade lipolítica foi feita em três etapas, sendo que em cada etapa um triacilglicerol diferente foi utilizado como substrato (HENNE *et al.*, 2000; ELEND *et al.*, 2006). No total, 2661 clones apresentaram atividade contra tributirina (FIGURA 11a) e foram testados em meio LB ágar contendo 1% (v/v) de tricaprilina (FIGURA 11b). Como resultado, 127 clones que apresentaram halos de hidrólise após 14 dias de incubação foram selecionados. Para identificar os clones com atividade contra triacilgliceróis com cadeia longa de ácido graxo, esses clones foram plaqueados em LB ágar contendo 1% (v/v) de trioleína, resultando em 32 clones com atividade após 14 dias de incubação (FIGURA 11c).

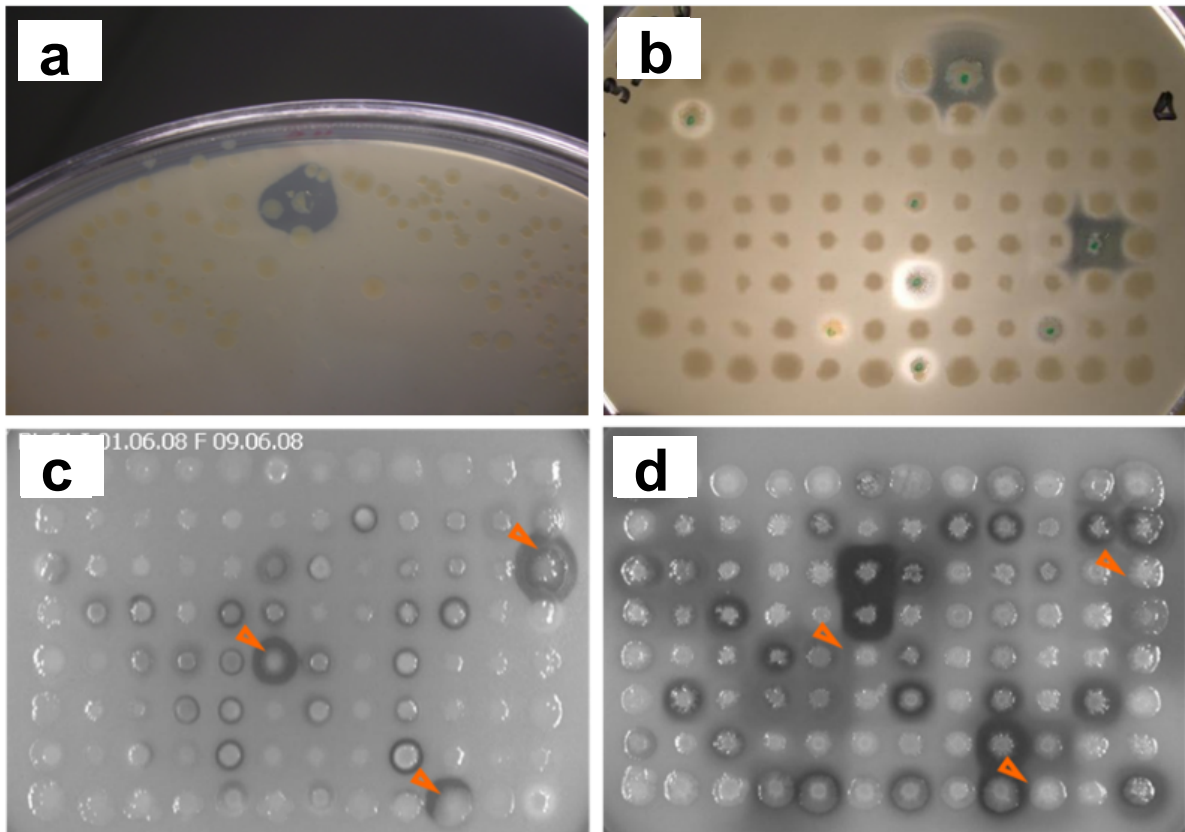


FIGURA 11 – PROSPECÇÃO FUNCIONAL DE CLONES ATIVOS

(a) Halo de hidrólise após 4 dias de incubação em meio seletivo com tributirina 1%. (b) Teste em placa com tricaprilina 1% após 14 dias de incubação. (c) Teste em placa com trioleína 1% após 8 dias de incubação. (d) Teste em placa de tricaprilina 1% após 8 dias de incubação (menor tempo de incubação em relação a (b)). As setas (em c e d) indicam os clones selecionados para as etapas de subclonagem e sequenciamento.

Os três clones (FosC12, FosE6 e FosH10) que apresentaram os maiores halos de hidrólise de trioleína foram selecionados para o sequenciamento, identificação e análise dos genes responsáveis pela atividade lipolítica. A FIGURA 11d mostra o teste em tricaprilina 1% dos 127 clones com atividade em tricaprilina anteriormente selecionados. Nem todos os clones apresentam halo de hidrólise devido ao menor tempo de incubação em relação ao teste original mas é possível observar que os clones selecionados, indicados pelas setas, possuem menor halo de hidrólise em tricaprilina do que em trioleína, após o mesmo tempo de incubação.

5.2 Sequenciamento do gene *lipC12* e análise preliminar da sequência da lipase *LipC12*

Os fasmídeos FosC12, FosE6 e FosH10 foram purificados por miniprep e digeridos com a enzima *EcoRI* (FIGURA 12). O padrão de digestão dos fasmídeos com *EcoRI* mostra que ambos não são idênticos, isto é, não são cópias um do outro. Assim, os insertos dos três fasmídeos foram subclonados e seqüenciados.

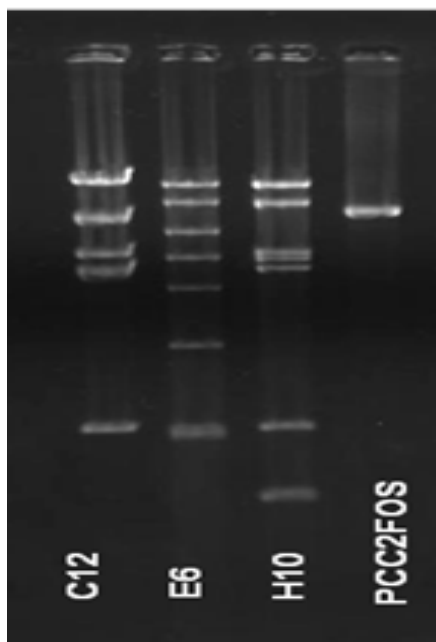


FIGURA 12 – RESTRIÇÃO DOS FOSMÍDEOS COM ATIVIDADE LIPÁSICA

Restrição com a enzima *EcoRI*. As trilhas representam da esquerda para a direita: FosC12, FosE6, FosH10 e vetor pCC2FOS. A comparação dos padrões de restrição indica que os três fasmídeos são diferentes entre si.

Os fasmídeos FosC12, FosE6 e FosH10 foram fragmentados por nebulização e os fragmentos de DNA obtidos foram inseridos no vetor pUC18, produzindo três sub-bibliotecas de 670, 760 e 1344 subclones, respectivamente, com insertos de aproximadamente 2 kb (FIGURA 13). No total, 34 subclones apresentaram halos de hidrólise em meio ágar com 1% de trioleína (FIGURA 14), sendo 6 subclones do fasmídeo FosC12, 13 do fasmídeo FosE6 e 15 do fasmídeo FosH10. Todos esses subclones foram seqüenciados a partir da extremidade do vetor pUC18 e as seqüências resultantes foram combinadas em contigs. A comparação dos contigs obtidos revelou que os três fasmídeos continham o mesmo gene de uma lipase. O gene da lipase do fasmídeo FosC12, denominado *lipC12*, foi então selecionado para caracterização. Uma ORF de 882 pb que codifica para uma lipase de 293 aminoácidos

(31232,55 Da) foi identificada com os programas BLASTN, BLASTX e ORF-FINDER (NCBI).

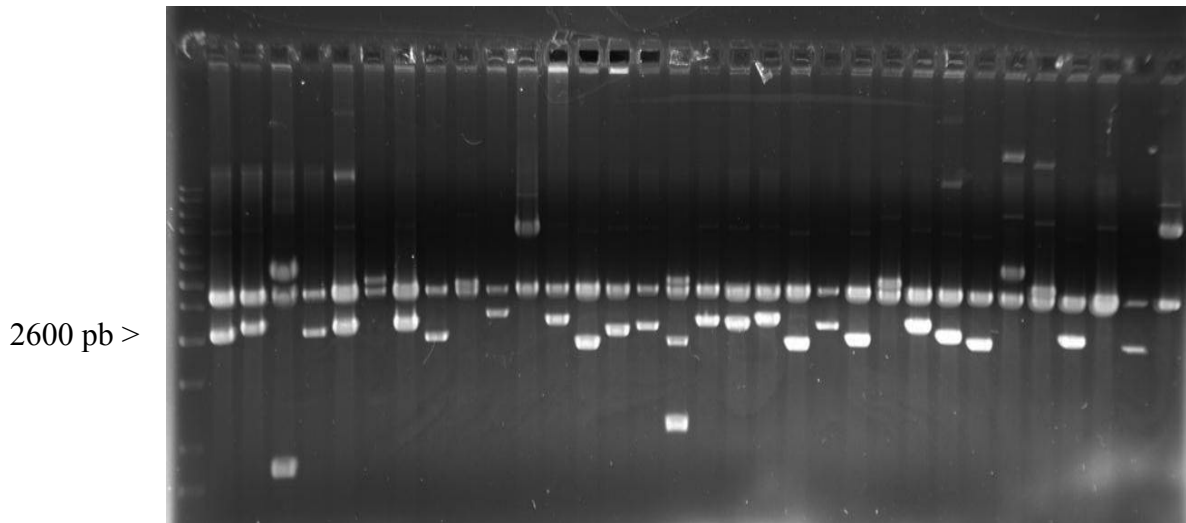


FIGURA 13 – RESTRIÇÃO DOS SUBCLONES POSITIVOS

Da esquerda para a direita, a primeira trilha do gel corresponde ao marcador de massa molecular e as demais trilhas são o produto de restrição de cada um dos subclones obtidos com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. As bandas alinhadas (região de 2600 pb) correspondem ao vetor pUC18 enquanto que as bandas abaixo e acima desta linha correspondem aos insertos. Em média, os insertos possuem tamanho inferior a 2 KB.

O alinhamento da sequência da proteína codificada pelo gene *lipC12* com sequências depositadas no banco de dados do NCBI revelou uma identidade de 72% tanto com a lipase CBY26912 de *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleoartica* Y11 quanto com a lipase YE1842 de *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081.

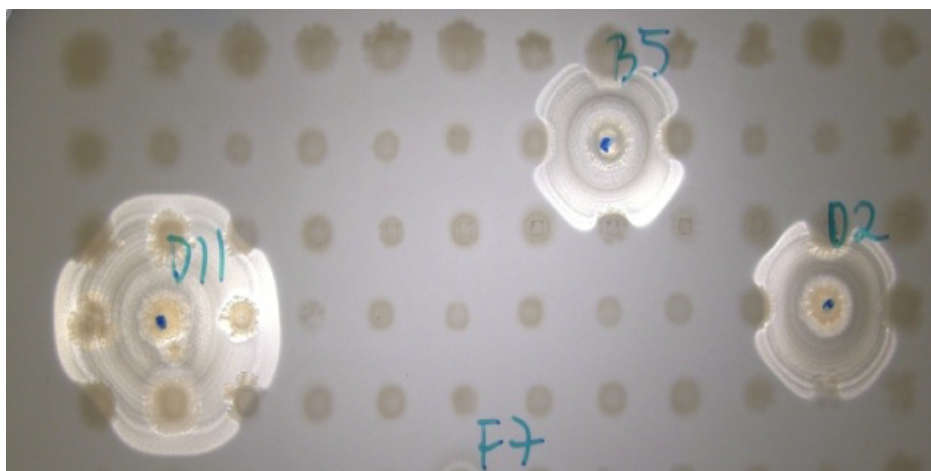


FIGURA 14 – HALOS DE HIDRÓLISE EM MEIO SELETIVO COM TRIOLEÍNA 1%

No total, 34 subclones apresentaram halo de hidrólise e tiveram seus plasmídeos (vetor pUC18) purificados para sequenciamento. A comparação das sequências obtidas revelou que os três fosmídeos continham o mesmo gene que codifica para uma lipase.

Nenhum domínio transmembrana ou peptídeo sinal foi identificado no gene da enzima e a proteína LipC12 é provavelmente uma proteína solúvel (os programas utilizados nestas análises estão listados na seção 4.6). Não foi localizado nenhum gene de chaperona próximo ao gene da lipase, sugerindo que LipC12 possui um enovelamento independente de Lif.

O gene *lipC12* foi amplificado (FIGURA 15), clonado no vetor pCR2.1 e o inserto totalmente seqüenciado. O inserto foi então clonado no vetor pET-28a(+), digerido com as enzimas *Bam*HI e *Nde*I para confirmação da clonagem e novamente seqüenciado. O plasmídeo pET28a-*lipC12* foi purificado de células *E. coli* DH10B e transformado na *E. coli* BL21(DE3) para expressão da lipase LipC12. Nenhuma mutação ocorreu no gene *lipC12* durante as etapas de amplificação e clonagem.

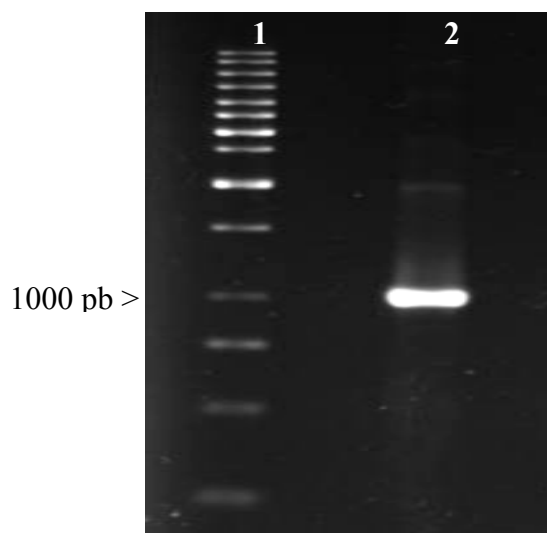


FIGURA 15 – GEL DE AGAROSE DO GENE DA ENZIMA LipC12 AMPLIFICADO

O marcador de massa molecular utilizado (Generuler™ 1 kb DNA ladder) se encontra na trilha 1 e o gene amplificado na trilha 2. O fragmento amplificado, de 966 pb, contém o gene da lipase LipC12 de 882 pb. O gene foi amplificado com o kit PCR Master Mix FidelityTaq (USB, EUA) e clonado no vetor pCR2.1.

5.3 Superexpressão e purificação da lipase LipC12

Células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a-*lipC12* foram induzidas e o extrato bruto total foi analisado por SDS-PAGE. O teste de expressão confirmou que a proteína LipC12, com cauda de histidina, foi devidamente expressa. A proteína recombinante tem massa molecular de 33,4 KDa (FIGURA 16) e se encontra majoritariamente na fração solúvel (FIGURA 17).

Para purificação da enzima, as células foram induzidas a 20°C durante 16 h para maximizar a produção de proteína. A proteína LipC12 foi purificada em uma única etapa de purificação por cromatografia de afinidade (FIGURA 18a). As frações eluídas contendo a proteína LipC12 foram combinadas e dialisadas em tampão Tris-HCl para eliminar o imidazol. Glicerol na concentração final de 50% (v/v) foi adicionado à solução tampão da proteína como um agente crioprotetor, resultando em uma solução estoque com 5,78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína e pureza de 97% (determinada por análise densitométrica do gel de SDS-PAGE).

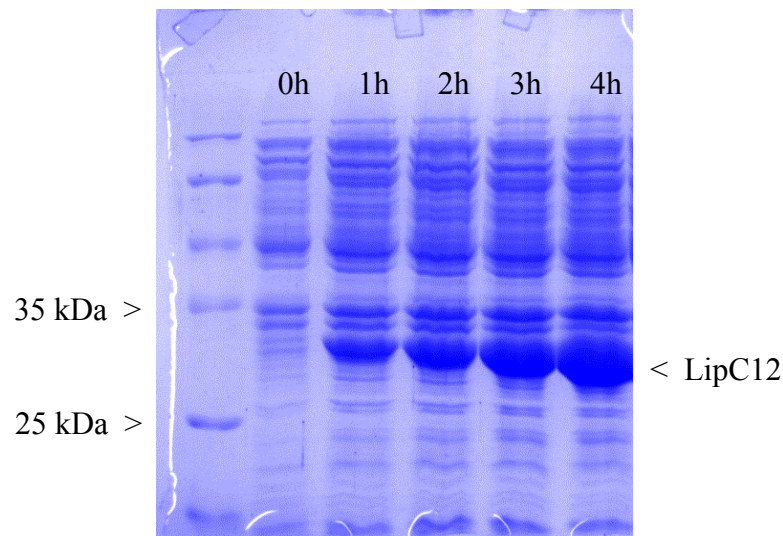


FIGURA 16 – GEL SDS-PAGE DO TESTE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA LipC12
Células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a-*lipC12* foram induzidas com IPTG a 37°C em meio LB. A primeira trilha do gel SDS-PAGE corresponde ao marcador de massa molecular e as demais trilhas correspondem ao extrato bruto das células nos tempos de indução indicados na figura.

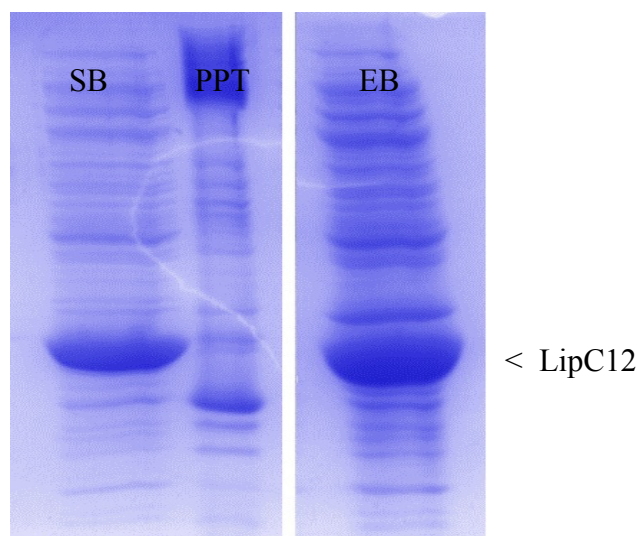


FIGURA 17 – SDS-PAGE DAS FRAÇÕES OBTIDAS NO TESTE DE SOLUBILIDADE
Uma cultura de células induzidas foi lisada, o extrato bruto obtido (EB) foi centrifugado, originando o sobrenadante (SB) e o precipitado insolúvel (PPT). A proteína LipC12 se encontra na fração solúvel (SB).

5.4 Zimograma e análise de espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS)

Um zimograma da lipase LipC12 utilizando os substratos tricaprilina e tributirina foi feito (FIGURA 18b). O aparecimento de halos de hidrólise na região de massa molecular correspondente à massa da lipase LipC12 revelou que a enzima se encontrava na forma ativa. O halo de hidrólise em tricaprilina foi maior do que em tributirina.

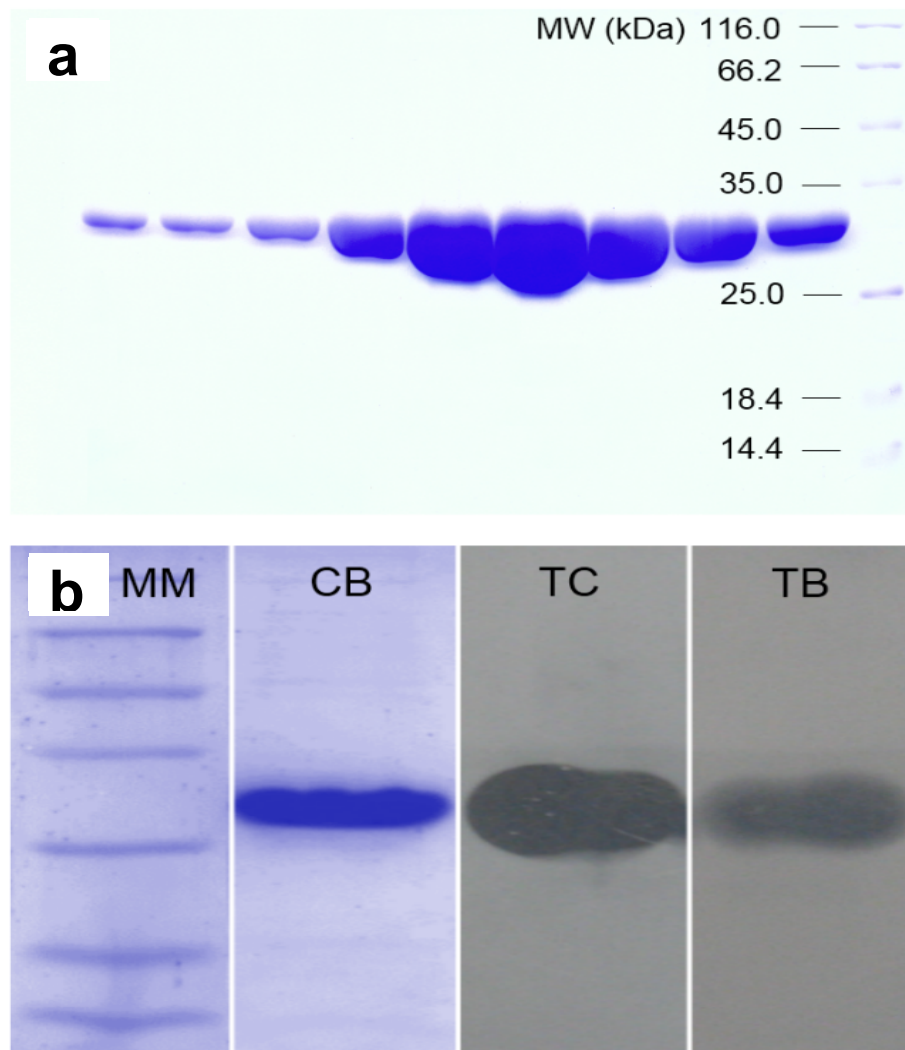


FIGURA 18 – PURIFICAÇÃO E ZIMOGRAMA DA ENZIMA LipC12

(a) SDS-PAGE das frações eluídas da coluna de cromatografia de afinidade. Em todas as trilhas do gel, apenas a banda correspondente à proteína LipC12 foi identificada. (b) SDS-PAGE e zimograma da lipase LipC12. As trilhas correspondem a: marcador molecular (MM), LipC12 detectada com o corante Coomassie blue (CB) e LipC12 detectada através da atividade enzimática em ágar suplementado com os substratos (emulsionados) tricaprilina (TC) e tributirina (TB). Foi aplicado 5 μ L da solução purificada de proteína em cada um dos poços correspondentes a CB, TC e TB.

A análise de MALDI-TOF/MS apresentou uma cobertura da sequência da proteína de 68,4% (TABELA 2 e FIGURA 19). Juntos, esses resultados confirmaram a identidade da proteína purificada.

TABELA 2 – IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DA LIPASE LIPC12 PELA ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF/MS)

m/z Predita	m/z Medida	Sequência
874,462	874,017	(K)VQAETGAAK(V)
1005,511	1005,441	(R)FQNDGLVGR(Y)
1021,143	1021,630	(R)GSHMSASSLK(F)
1090,589	1090,581	(R)GEQLLEFVR(K)
1219,435	1220,578	(R)GEQLLEFVRK(V)
1390,741	1390,741	(K)IGGIYPYFYGIK(E)
1464,774	1464,789	(K)VNLIGHSQGPLACR(Y)
1488,712	1488,720	(K)YPQGLPAEWGGEGK(E)
1554,904	1554,915	(K)FPIVLVHGLLGFDK(I)
1663,901	1663,917	(K)VYIATLSALNSNELR(G)
1768,849	1768,855	(-)MGSSHHHHHHSSGLVPR(G)
2359,214	2359,209	(R)LPQSGIEALEALTSEGVAAFNNK(Y)
2472,292	2472,237	(R)LPESIANAAMSAFGQLLSALAGSPR(L)
2735,473	2735,414	(K)VYIATLSALNSNELRGEQLLEFVR(K)
2926,627	2926,410	(K)FPIVLVHGLLGFDKIGGIYPYFYGIK(E)
3105,596	3105,589	(R)YVAATHPELIASVTSVNGVNHGSEVADLVR(L)
3180,720	3180,734	(R)LALTPGRLPESIANAAMSAFGQLLSALAGSPR(L)

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSASSLKFPPIVLVHGLLGFDKIGGIYPYFY
GIKEALEKAGAKVYIATLSALNSNELRGEQLLEFVRKVQAETGAAKVNLI
GHSQGPLACRYVAATHPELIASVTSVNGVNHGSEVADLVRALTPGRLPE
SIANAAMSAFGQLLSALAGSPRLPQSGIEALEALTSEGVAAFNNKYPQGL
PAEWGGEGKELVNGVYYYSWSGVIDYNPLHQGANNDPLHVAMLAFSILF
TNERFQNDGLVGRYSSHLGKVGSDYSMDHVDAINQLAGVVANNTDPVQL
FVEHVARLKSKGL

FIGURA 19 – LOCALIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS NA SEQUÊNCIA DE LipC12

Os resíduos destacados em amarelo correspondem aos resíduos dos peptídeos identificados na TABELA 2. Dentre os 313 resíduos de LipC12, 214 foram identificados (68,37%).

5.5 Análise da sequência da proteína purificada

LipC12 possui 293 aminoácidos e a análise filogenética mostrou que as enzimas mais semelhantes à LipC12 são as derivadas de enterobactérias, como *Yersinia sp.*, *Proteus*

sp. e *Arsenophonus sp.*, e pertencem à subfamília I.1 das lipases bacterianas (FIGURA 20). Entre as lipases com estrutura 3D conhecida, LipC12 possui 47%, 42% e 41% de identidade com lipases de *Pseudomonas aeruginosa* (Genbank nº 1EX9A), *Burkholderia glumae* (2ES4B, 1TAH, 1CVL) e *Burkholderia cepacia* (1OILA, 1YS1X, 4LIP, 2NW6, 1HQD), respectivamente (TABELA 3).

A tríade catalítica de LipC12 (FIGURA 21) é provavelmente formada pelos resíduos Asp²³⁸, Ser⁸³ e His²⁶⁰ sendo que o resíduo Ser⁸³ aparece no pentapeptídeo conservado Gly-X-Ser-Gly-X. Dois resíduos de aspartato (Asp²¹⁷ e Asp²⁶²) formam um sítio de ligação ao íon cálcio. Estes resíduos são conservados nas lipases pertencentes às subfamílias I.1 e I.2 (ARPIGNY e JAEGER, 1999; NARDINI *et al.*, 2000). LipC12 contém apenas um resíduo de cisteína, assim como as lipases das bactérias *Pseudomonas fragi*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia mollaretti* e, dessa forma, não forma uma ponte dissulfeto, a qual está presente nas lipases das bactérias *P. aeruginosa*, *B. glumae* e *B. cepacia* (TABELA 3).

A expressão das lipases pertencentes às subfamílias I.1 e I.2, na forma ativa, muitas vezes depende de uma chaperona chamada Lif (*lipase-specific foldase*), normalmente codificada no mesmo operon que a lipase (ARPIGNY e JAEGER, 1999; JAEGER *et al.*, 1999). Chaperonas e foldases são proteínas acessórias que assistem a maturação dos peptídeos nascentes em proteínas funcionais na célula. Nenhuma chaperona foi encontrada no operon da lipase LipC12, assim como também ainda não foram encontradas chaperonas para as lipases da subfamília I.1 com maior identidade com LipC12, como as lipases de *Y. enterocolitica*, *Y. mollaretti*, *P. vulgaris* e *P. fragi* (TABELA 3).

Assim, pela análise filogenética e pelas observações acima descritas, é possível concluir que a lipase LipC12 pertence à subfamília I.1 das lipases bacterianas.

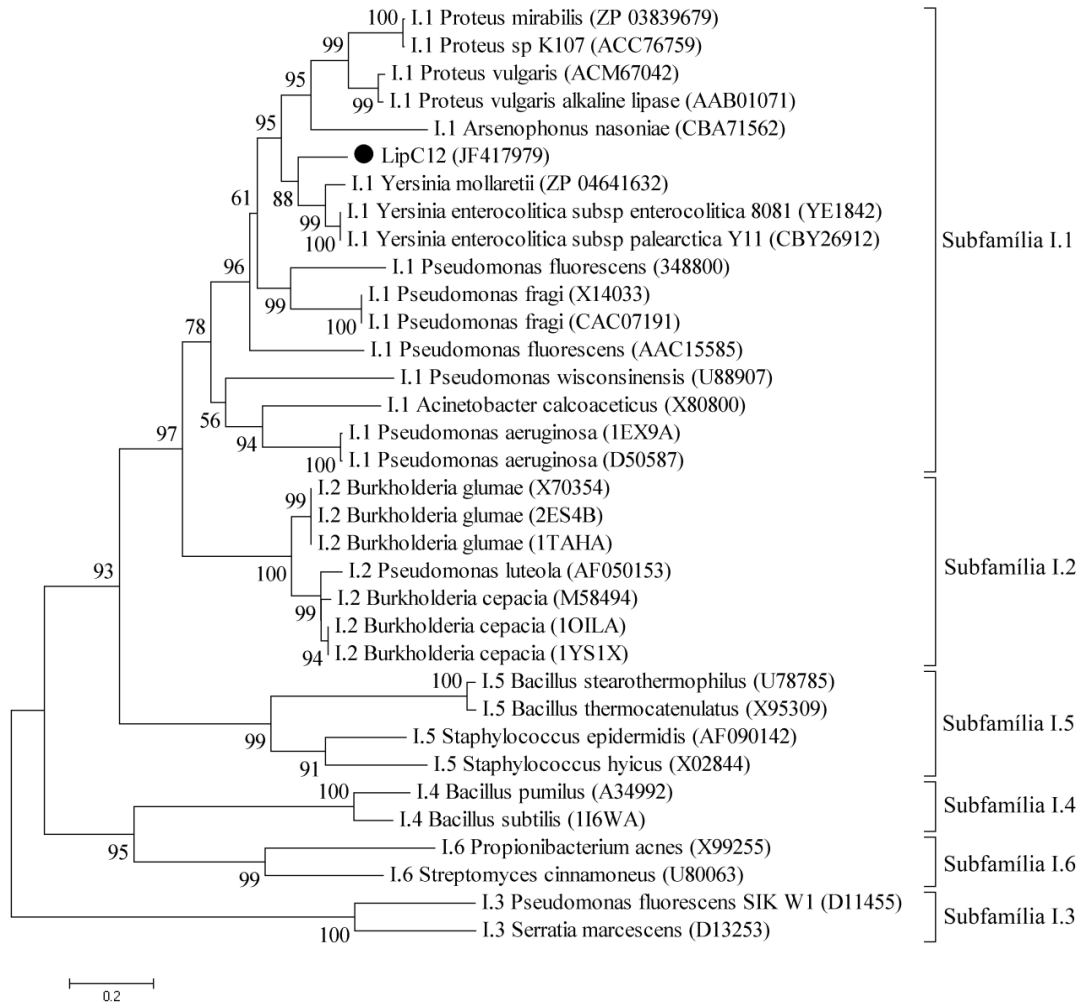


FIGURA 20 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DA LIPASE LipC12

As enzimas de maior semelhança com LipC12 são aquelas de enterobactérias, tais como *Yersinia sp.*, *Proteus sp.* e *Arsenophonus nasoniae*. Exceto para a lipase LipC12, todas as sequências foram retiradas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A árvore filogenética foi gerada usando o programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2007).

TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DE LipC12 E OUTRAS LIPASES BACTERIANAS DAS SUBFAMÍLIAS I.1 E I.2

Organismo/Lipase	Família bacteriana	Número de acesso ao Genbank ^a	Família (lipase)	Identidade (%) ^b	Tamanho da cadeia	MM (kDa) ^c	Ponte dissulfeto e cisteínas ^d	Presença ou necessidade de chaperona ^e	Ion Ca ²⁺ ligado a estrutura ^f
LipC12	Metagenoma	JF417979	I.1	100	293	31,2	Não, Cys 89	Não encontrado ^{h,i}	Asp 217, 262
<i>Yersinia enter. subs. enter.</i> 8081	Enterobacteriaceae	YE1842	I.1	72	294	32,0	Não, Cys 90	Não encontrado ^j	Asp 218, 263
<i>Yersinia enter. subs. paler.</i> Y11	Enterobacteriaceae	CBY26912	I.1	72	294	32,0	Não, Cys 90	Não encontrado ^j	Asp 218, 263
<i>Yersinia mollaretii</i>	Enterobacteriaceae	ZP_04641632	I.1	69	283	30,9	Não, Cys 79	Não encontrado ^j	Asp 207, 252
<i>Proteus vulgaris</i>	Enterobacteriaceae	AAB01071	I.1	60	290	31,7	Não, Cys 88	Não descrito ⁱ	Asp 216, 259
<i>Proteus vulgaris</i>	Enterobacteriaceae	ACM67042	I.1	58	287	31,2	Não, Cys 85	Não descrito ⁱ	Asp 213, 256
<i>Proteus sp. K107</i>	Enterobacteriaceae	ACC76759	I.1	53	287	31,6	Cys 85, 195	Não descrito ⁱ	Asp 213, 256
<i>Proteus mirabilis</i>	Enterobacteriaceae	ZP_03839679	I.1	53	287	31,7	Cys 85, 195	Não encontrado ^j	Asp 213, 256
<i>Arsenophonus nasoniae</i>	Enterobacteriaceae	CBA71562	I.1	51	288	31,9	Cys 24, 70, 248	Não encontrado ^j	Asp 213, 257
<i>Pseudomonas fragi</i>	Pseudomonadaceae	CAC07191	I.1	56	293	32,1	Não, Cys 39	Não descrito ⁱ	Asp 217, 262
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pseudomonadaceae	YP_348800	I.1	51	289	31,0	Cys 170, 191, 219	Não encontrado ^j	Asp 213, Arg 258
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pseudomonadaceae	AAC15585	I.1	48	296	32,3	Cys 226, 240	Não descrito ⁱ	Asp 220, 265
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	1EX9A	I.1	47	285	30,1	Sim ^g , Cys 183 - 235	Sim ^k	Sim, Asp 209, 253
<i>Burkholderia glumae</i>	Burkholderiaceae	2ES4B	I.2	42	316	33,1	Sim ^g , Cys 190 - 269	Sim ^l	Sim, Asp 241, 287
<i>Burkholderia cepacia</i>	Burkholderiaceae	1OILA	I.2	41	320	33,1	Sim ^g , Cys 190 - 270	Sim ^k	Sim, Asp 242, 288
<i>Bacillus Subtilis</i>	Bacillaceae	116WA	I.4	31	181	19,3	Não	Não encontrado ^j	Não descrito

^a Número de acesso da sequência no NCBI (GenBank). ^b A identidade foi obtida com a ferramenta BLASTX utilizando a sequência de LipC12 para a busca. ^c A massa molecular foi calculada com a ferramenta ProtParam. ^d Quando confirmada, a ponte dissulfeto é indicada pelo traço entre os resíduos de cisteína e todas as cisteínas presentes estão indicadas. ^e A chaperona (Lif) é usualmente encontrada no mesmo operon da lipase. ^f Quando presentes, os dois resíduos conservados de aspartato que ligam o íon cálcio são mostrados mas a ligação do íon cálcio somente pode ser confirmada pela elucidação da estrutura da lipase. ^g lipase com estrutura 3D conhecida. ^h O gene da chaperona não foi localizado próximo ao gene da lipase. ⁱ A expressão heteróloga da enzima foi feita sem chaperona. A literatura correspondente foi obtida através do NCBI com o número de acesso da sequência indicado na tabela. ^j Para este organismo, o gene que codifica a chaperona (lif) não foi encontrado na base de dados do NCB. ^k O gene da chaperona foi encontrado próximo ao gene da lipase. ^l A lipase foi cristalizada ligada a sua chaperona.

5.6 Modelo estrutural da lipase LipC12 obtido por modelagem “in silico”

Embora LipC12 possua 72% de identidade com a lipase de *Y. enterocolitica*, essa lipase ainda não foi isolada e caracterizada, de modo que não é possível realizar qualquer estudo comparativo. Por outro lado, LipC12 possui 47% e 41% de identidade com as lipases de *P. aeruginosa* (1EX9) e *B. cepacia* (1YS1, 1OIL, 4LIP, 1HQD, 2NW6), respectivamente, que tem estrutura cristalográfica conhecida. Essas estruturas foram utilizadas como modelos para construção da estrutura 3D da lipase LipC12 com o programa MODELLER. As lipases que apresentaram uma identidade com LipC12, mas cujas estruturas apresentam a tampa hidrofóbica fechada (2ES4, 1CVL, 1TAH, 1QGE, todas de *B. glumae*), não foram utilizadas como modelo.

```

I.1 LipC12 1 : -----MSA-----SSLKFPVIVHGLGFDKIGGI---YPYFYGLKEALEKAKARVYIATISALN : 52
I.1 Y. pal 1 : -----MSTN-----STLKYPVIVHGLGFDKIAGV---YPYFYGVEEPLKKAQAQVVFATISATN : 53
I.1 A. nas 1 : -----MPT-----KYPIILVHGLGFDKIAG---YPCFFATENRKKQYGVVFSPIISGVN : 48
I.1 P. vul 1 : -----MST-----TYPIVIVHGLGFDNVVG---YPYFYGTADAEKDKCHKVFTASISAFN : 48
I.1 P. fra 1 : -----MDDS-----VNTRYPIILLVHGLGFDRIGS---HHYFHGILQADNECCASVFPVPIISAAN : 52
I.1 A. cal 1 : ---MKFKLLFTLLLVLTQP-----VFATSPIONPTTSFVVISDYAKTKYPIVLSHGLGFDENKLGTEAFGLDYQTPQDLARNGANVWVTROSTAN : 88
I.1 P. aer 1 : ---MKKKSLLP-LGLAIGLA-----SLAASPLIQAST-----YTQTKYPIVIVHGLGFDNI---LGVDFYFQIPSAIARDQAQVYVTEVSQLD : 77
I.2 B. cep 1 : MARTMRSRVVAGAVACAMSIAPPAGTAVMTLATTHAAMAATAAPAAGYAATRYPIIIVHGLGFDKRYAG---VLEYWYGTQEDLQOQGATVYVANISGFQ : 99
I.2 P. lut 1 : ---MRSRVVAGAVACAMSVAPPAGSAAALMMAATTHVAMAATAAPADNYATRYPIIIVHGLGFDKRYAG---VLEYWYGTQEDLQOQGATVYVANISGFQ : 93
I.2 B. glu 1 : MVRSMRSRVAARAVAWALAVMPLAGAAGLTMAS-----PAAVAADTYAATRYPIVIVHGLGFDKRFAN---VVDYWYGTQSDLQSHGAKRYVANISGFQ : 92

I.1 LipC12 53 : SNE---LRGEQLLEFRKVAQETGAAKVNLIGHSGPLACRYVAATHPELIVASVTSVNGVNHGSEVADLVRRLALT--PGRLPESIANAAMSFAFQQLLSA- : 146
I.1 Y. pal 54 : SNE---VRGEQLLKFKVBMMAKTGAKKVNLIHSGPLACRYVAATHPELIVASVTSVNGVNHGSEIADIVRSALV--PGSLPEHIVNTIMSFAFVFSL- : 147
I.1 A. nas 49 : SNE---VNGEQWLWYEBELKRNIGCBKVNLIHSGPLACRYVAATHPELIVASVTSVNGVNHGSEIADIVRKLVI--PGKLTETVVVTAAEIFFTFISL- : 142
I.1 P. vul 49 : ANE---VRGEQLWGFQKYLKKEKAKKVNLIHSGPLACRYVAATHPELIVASVTSVNGVNHGSEIADIVRRIVR--KDSVPYIADAVMKAIIGTIT- : 142
I.1 P. fra 53 : DNE---ARGDQLLKQTHMRRQVGAQRVNLIHSGCALTARYVAATHPELIVASVTSVSGPNHGSELADRRLRAFV--PGRLGETAVALAATTSFSAFSLA- : 146
I.1 A. cal 89 : TSE---FRGEQLLAEQVDILAITGAQKVNLIHSHGSGQTVRYVAGVLPANIASVSTIGGPAKAPLADLTYKTL---AGTPLEAPIATIFNVAMNFIIG : 182
I.1 P. aer 78 : TSE---VRGEQLLQVVEEIVALSQKVNLIHSHGSGQTVRYVAVRPDLIASVTSVGPAPHKSDTADFLRQIP---PGSAGEAILSGLVNSLGLAISF- : 170
I.2 B. cep 98 : SDDGPNRGEQLLAYKKTVLAATGATKVNLIHSGGGLTSRYVAAVAPDLVASVTTIGTPHRCSEFADFVQDVLAYDPTGLSSSVIAAFVNVFGILTSS- : 196
I.2 P. lut 94 : SDDGPKRDEQLLAYKKTVLAATGATKVNLIHSGGGLTSRYVAAVAPDLVASVTTIGAADRCSEFADFVQDVLAYDPTGLSSSVIAAFVNVFGILTSS- : 192
I.2 B. glu 93 : SDDGPNRGEQLLAYKKTVLAATGATKVNLIHSGGGLTSRYVAAVAPDLVASVTTIGTPHRCSEFADFVQDVLKTDPTGLSSSVIAAFVNVFGILTSS- : 191

as

I.1 LipC12 147 : -LAGSPRLPQSGEALEADTSEGVAAFNNKYPQGLPAEWG---SEGKELVNG--VYYYSMSGVIDYNPLHQG-----ANNLDPLHVAM : 223
I.1 Y. pal 148 : -LSGKPLPQDFMESIDALTENVARFNTKYPQGLPETWG---EGKKEFDNG--VYYYSMSGVVLGYNPLIEG-----LNLDPLHHS- : 224
I.1 A. nas 143 : -ISSGTLKPQDGEALNSLTTEVVNBFNKYPQGLPKEW---EGDEVVNG--VHYYSMSGFIKSLINS- -INAFVSHSTL : 219
I.1 P. vul 143 : -FSGHRSPQDAVALEALTEENVTBFNKYPQGLPAIRG---EGKEVVNG--VYYYSMSGYIQGLVGEK-----GNLDPHTHAM : 219
I.1 P. fra 147 : -LSGHRLPQNALNALNALTDDGVAAFNRQYPQGLPDRWG---GMGPAQVNA--VHYYSMSGIIGKSRLAES-----LNLDPLHNL : 223
I.1 A. cal 183 : QFDDPKYPMNSVGAAYSSEEGAGRFNAIPAGVPTTA--C--QGESSVNG--VRYYSMS--GASPLT-----NPLDPSD-- : 251
I.1 P. aer 171 : -LSSGTGTQNSLGSLESENSEGAARFNAKYPQGVPTSA--C--GEGAYKVG--VSYYSMS--GSSPLT-----NPLDPSD-F : 240
I.2 B. cep 197 : ---SHNTQDQALALQTLTHARAATYNNQYPSAGLAPGSCQTCAPTETVGGNTHLHYSWAGTAIQPTLSVFGVTGATDSTLPLVDPANVLLSTLAL : 292
I.2 P. lut 193 : ---SNANQDALAGLKTHTAQAATYNNQ--PSAGLGRPGSCQTCAPTETVGGNTHLHYSWAGTAIQPTLSVFGVTGATDSTLPLVDPANVLLSTLAL : 287
I.2 B. glu 192 : ---SHNTQDQALALRTHLTHAQTATYNNRFPESAGLAPGSCQTCAPTETVGGSHLHYSWGGTAIQPTLSVFGVTGATDSTG-TLDPANVLLSTLAL : 286

db cb

I.1 LipC12 224 : LAFSILFTNE-RFQNDGLVGRYSNHLGKVI GSDTSMDHVDALINQLAGV-VANNTPVQLFVEHVARLKS KGL- : 293
I.1 Y. pal 225 : VALSLLFTKE-RNQNDGLVGRYSNHLGKVI GSDTSMDHVDALINQTAGM-VSKDIDPVQLFVNI ELLSKGL- : 294
I.1 A. nas 220 : LQLSFFSR--EKENDGLVGRYSNHLGKVI GSDTSMDHVDALINQIAGV-VSNQYDIPSIYVNHQMLAKKGL- : 288
I.1 P. vul 220 : RVLSAFFT---EHENDGLVGRYSNHLGKVI GSDTSMDHVDALINQVAGL-VGRGEDIVAIYTHANFLASKKL- : 287
I.1 P. fra 224 : RVFDSFFTRE-TRENDGMVGRFSNHLGKVI GSDTSMDHVDALINHMARG-SRRRINPEVLYIEHAKRLKEAGL- : 293
I.1 A. cal 252 : YGLSLSVFS--GKNDGLVGRYSNHLGKVI GSDTSMDHVDALINILGFDLFLHKTIPPYSLDNMPIVSKVIYN : 323
I.1 P. aer 241 : LGASSLTFKN--GTANDGLVGRYSNHLGKVI GSDTSMDHVDALINQVGLTSLFETS PVSVYRQHANRLKNASL- : 311
I.2 B. cep 293 : FGTGTVMINRSGQNDGLVGRYSNHLGKVI GSDTSMDHVDALINQLLGVRGAYAEEDPVAVIRTHANRLKLAGV- : 364
I.2 P. lut 288 : FGTGTVMINRSGQNDGLVGRYSNHLGKVI GSDTSMDHVDALINQLLGVRGAYAEEDPVAVIRTHANRLKLAGV- : 359
I.2 B. glu 287 : LATGAVMINRSGQNDGLVGRYSNHLGKVI GSDTSMDHVDALINQLLGVRGAYAEEDPVAVIRTHANRLKLAGV- : 358

as db as cb

```

FIGURA 21 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA LIPASE LipC12 COM OUTRAS LIPASES DAS SUBFAMÍLIAS I.1 E I.2

As regiões sombreadas indicam a existência de aminoácidos similares em todas as sequências. As anotações correspondem a: (db) cisteínas envolvidas na ponte dissulfeto; (cb) resíduos de aspartato envolvidos no domínio de ligação ao cálcio; (as) resíduos pertencentes a tríade catalítica. O número de acesso e o nome do organismo das sequências alinhadas são (de cima para baixo): JF417979, lipase LipC12; CBY26912, lipase de *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleartica* Y11; CBA71562, lipase de *Arsenophonus nasoniae*; ACM67042, lipase de *Proteus vulgaris*; CAC07191, lipase de *Pseudomonas fragi*; X80800, lipase de *Acinetobacter calcoaceticus*; D50587, lipase de *Pseudomonas aeruginosa*; M58494, lipase de *Burkholderia cepacia*; AF050153, lipase de *Pseudomonas luteola*; X70354, lipase de *Burkholderia glumae*. A figura foi gerada com o programa GeneDoc 2.7 (NICHOLAS *et al.*, 1997).

Lipases freqüentemente apresentam estruturas tridimensionais similares, apesar de uma baixa homologia entre as sequências (JAEGER *et al.*, 1999), de modo que a modelagem molecular por homologia pode ser empregada como ferramenta para analisar algumas possíveis características estruturais da lipase LipC12.

O modelo gerado da lipase LipC12 foi comparado com as estruturas 1EX9 e 1YS1 através da superposição das três estruturas. Conforme mostra a FIGURA 22, as três lipases possuem conformações similares, denotada pela superposição das folhas- β e α -hélices de suas estruturas. A superposição das sequências indicou a presença, na lipase LipC12, da tríade catalítica composta pelos resíduos Ser⁸³, His²⁶⁰ e Asp²³⁸ (FIGURA 23a), do sítio de ligação ao íon cálcio formado pelos resíduos de aspartato Asp²¹⁷ e Asp²⁶² (FIGURA 23b), o qual é conservado em todas as lipases das subfamílias I.1 e I.2 (NARDINI *et al.*, 2000), e a presença da tampa hidrofóbica, formada por 4 α -hélices, acima do sítio catalítico da enzima (FIGURAS 23c, 23d e 23e).

A FIGURA 24 apresenta o alinhamento das sequências e a comparação das estruturas secundárias da lipase LipC12 com algumas lipases das subfamílias I.1 e I.2.

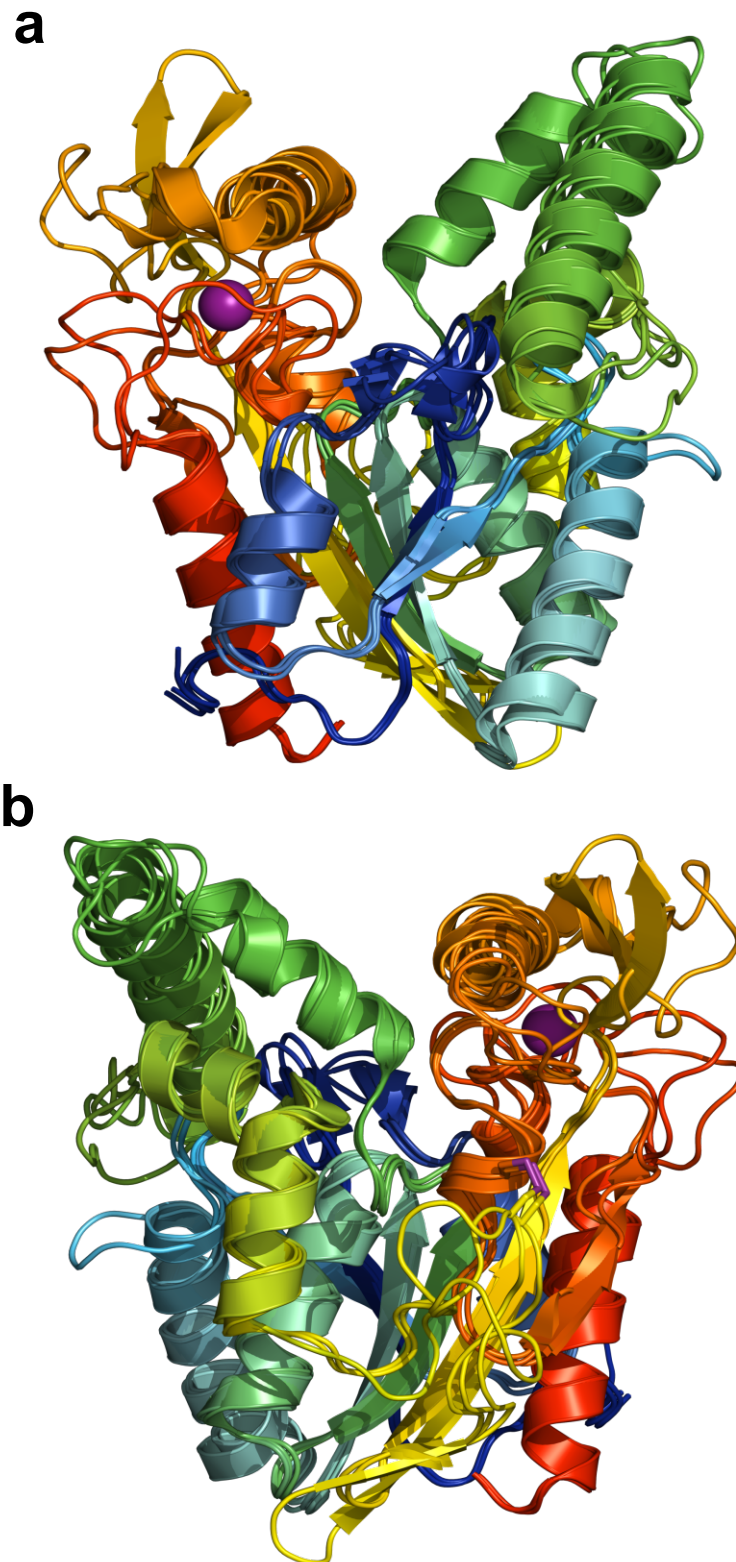


FIGURA 22 – SOBREPOSIÇÃO DA ESTRUTURA MODELADA POR HOMOLOGIA DA LIPASE LipC12 E DAS LIPASES 1EX9 DE *Pseudomonas aeruginosa* E 1YS1 DE *Burkholderia cepacia*

As três lipases apresentam elevada semelhança estrutural denotada pela sobreposição das folhas- β e α -hélices das três estruturas. (A) e (B) são apenas perspectivas diferentes. A esfera representa o cátion Ca^{2+} presente nas três lipases. A modelagem foi feita com o programa MODELLER e as figuras com o programa PyMOL. As sobreposições das três estruturas foram feitas com o programa DaliLite.

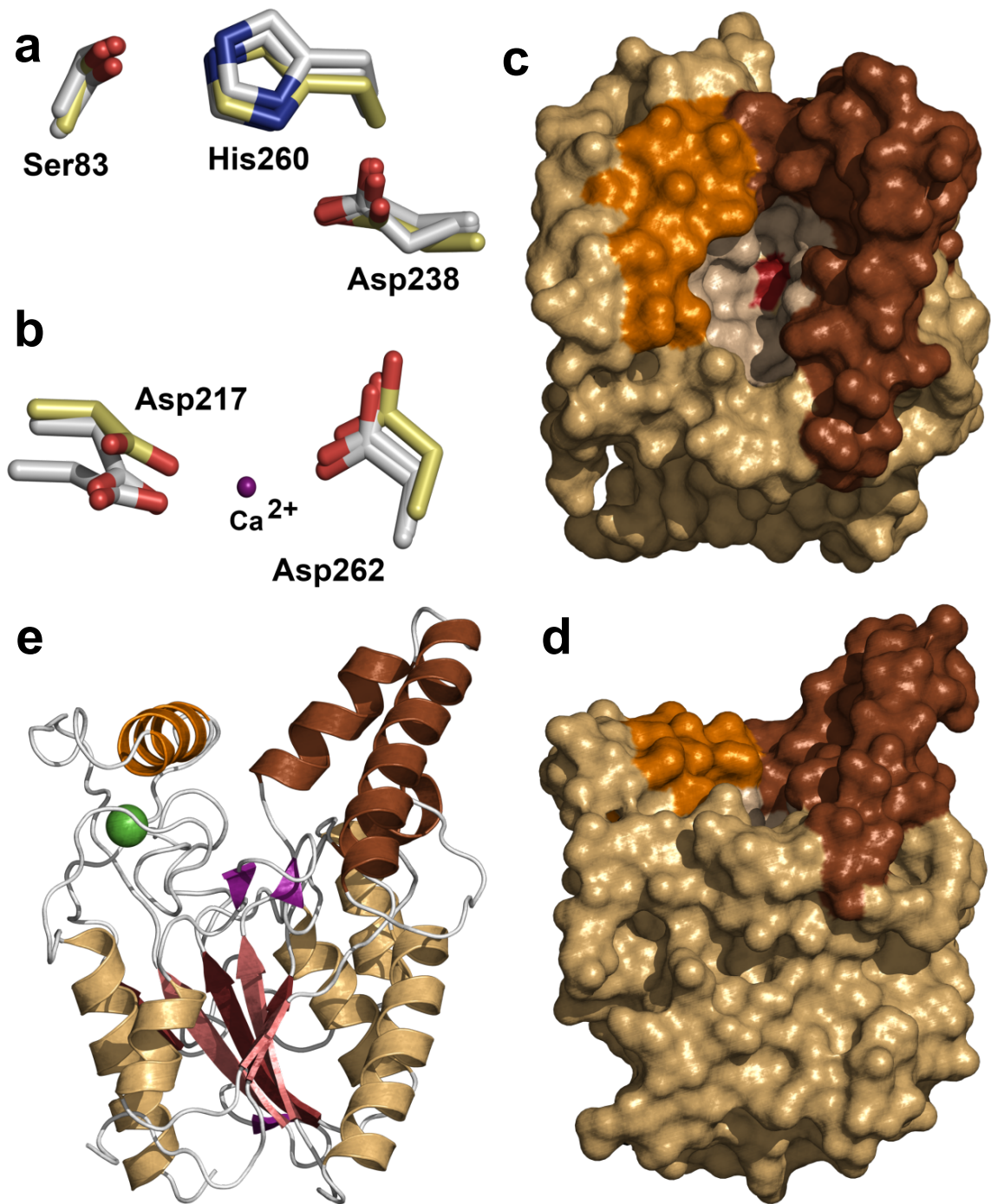


FIGURA 23 – CARACTERÍSTICAS DO MODELO MOLECULAR DA LIPASE LipC12 (a) superposição da tríade catalítica e (b) dos resíduos de aspartato das lipases LipC12, 1EX9 e 1YS1. Em (a) e (b) os resíduos da LipC12 estão destacados em amarelo. Em (c), (d) e (e) é possível notar a *lid* (marrom e laranja) no modelo molecular da lipase LipC12. Em (c), a serina catalítica está destacada em vermelho no fundo do túnel catalítico.

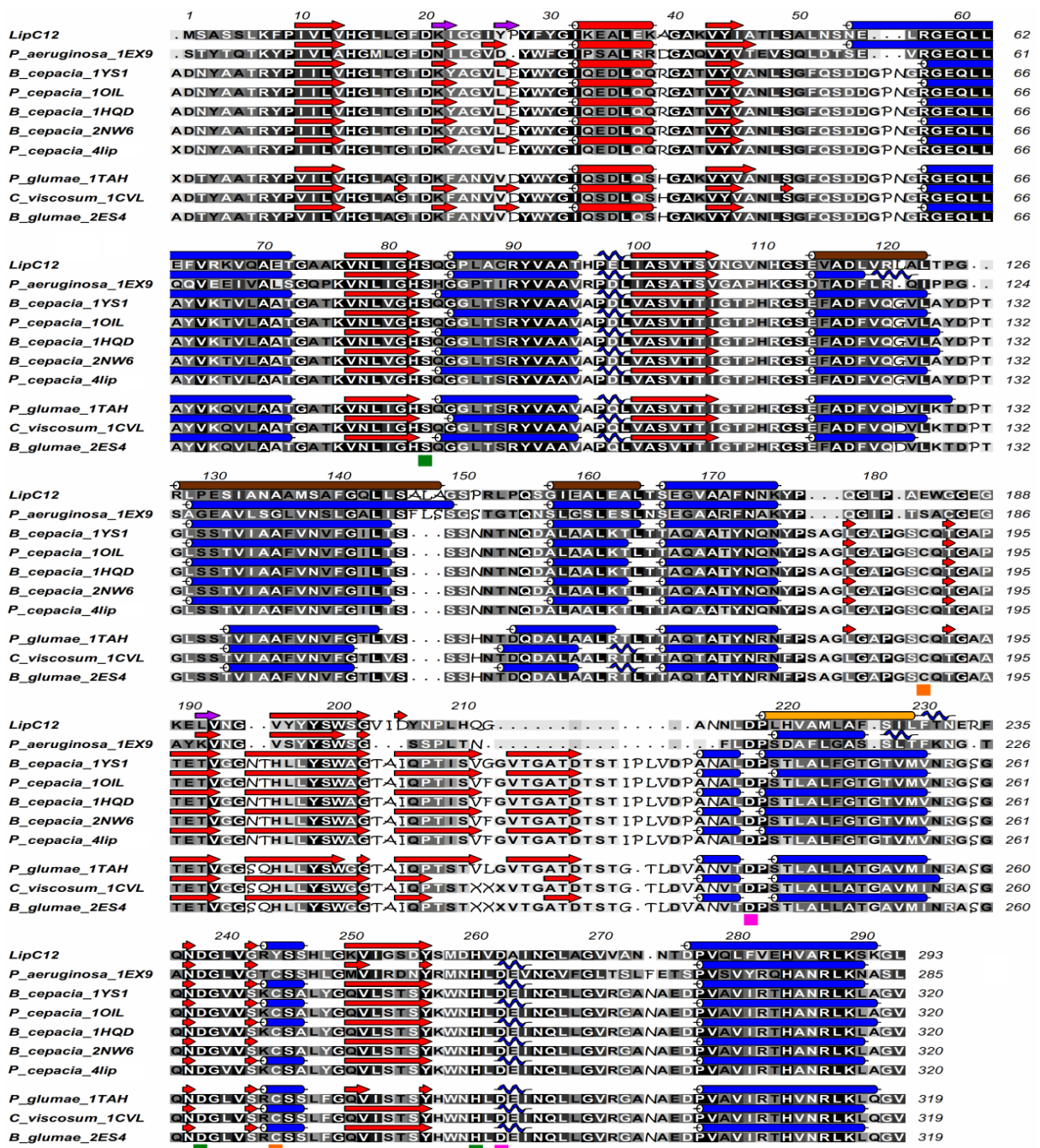


FIGURA 24 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA LIPASE LipC12 COM OUTRAS LIPASES DE ESTRUTURA CONHECIDA DAS SUBFAMÍLIAS I.1 E I.2

As anotações em forma de caixas coloridas abaixo das sequências indicam os resíduos pertencentes à tríade catalítica (verde), as cisteínas responsáveis pela ligação dissulfeto (laranja) e os resíduos de aspartato que formam o sítio de ligação ao cálcio (rosa). As estruturas LipC12, 1EX9, 1YS1, 1OIL, 1HQD, 2NW6 e 4LIP estão na conformação aberta e as estruturas 1TAH, 1CVL e 2ES4 na conformação fechada. Na LipC12 a lid foi colorida conforme a FIGURA 23e. A figura foi obtida com o programa ALINE.

5.7 Determinação espectrofotométrica da atividade enzimática utilizando ésteres de p - nitrofenila

5.7.1 Efeito de agentes quelantes e íons metálicos sobre a atividade da lipase LipC12

A atividade de LipC12 diminuiu 50% e 77,6% na presença de 10 mM de EDTA e EGTA, respectivamente. Para verificar se a lipase LipC12 realmente tem uma preferência para ligar o Ca^{2+} , foi feito um experimento para tentar remover todos os metais ligados à estrutura da enzima com EDTA (1 mM) e, em seguida, foram adicionados diferentes íons metálicos separadamente e a atividade enzimática foi medida (TABELA 4). A atividade máxima foi obtida na presença de Ca^{2+} , porém a atividade também foi restaurada, em níveis mais baixos, na presença de outros cátions divalentes, como o Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} e Ni^{2+} . Nos experimentos realizados sem a etapa prévia de quelação, no qual o sítio de ligação ao cálcio estava presumivelmente ocupado pelos íons cálcio, a presença de 1 mM de cátions monovalentes (Rb^+ , K^+ , Cs^+ , Na^+ ou Li^+) aumentou a atividade da enzima. A explicação mais provável para este efeito é que a presença destes cátions aumenta a solubilidade do *p*NPP na emulsão.

5.7.2 Efeito de ânions sobre a atividade da lipase LipC12

O efeito da presença de ânions sobre a atividade da lipase LipC12 também foi estudado. Todos os ânions testados foram adicionados na forma de sais de sódio e nenhum deles apresentou efeito significativo sobre a atividade da enzima a 1 mM (TABELA 5). No entanto, o ânion PO_4^{3-} , na concentração de 10 mM, reduziu a atividade da enzima em cerca de 30%, sugerindo que o ânion PO_4^{3-} esteja concorrendo com a enzima pela ligação ao íon Ca^{2+} , já que o fosfato de cálcio é um sal que apresenta baixa solubilidade.

TABELA 4 – EFEITO DE CÁTIONS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Cátion (1 mM)	Atividade Relativa (%)	Cátion (1 mM)	Atividade Relativa (%)
após quelação com EDTA ^a		sem quelação com EDTA	
Nenhum	< 0,5	Nenhum ^b	100,0 ± 3,4
CaCl ₂ ^b	100,0 ± 1,2	RbCl	128,4 ± 2,3
CuCl ₂	59,3 ± 0,3	KCl	121,8 ± 4,6
Al ₂ (SO ₄) ₃	59,2 ± 0,1	CsCl	104,1 ± 4,7
CoCl ₂	54,9 ± 0,6	NaCl	94,3 ± 4,4
MnCl ₂	54,9 ± 1,2	LiCl	92,7 ± 2,3
NiCl ₂	53,3 ± 0,6	Ba(Ac) ₂	85,4 ± 5,3
FeSO ₄	37,4 ± 0,9	CaCl ₂	73,4 ± 4,2
Pb(Ac) ₂	33,9 ± 0,2	SnCl ₂	67,6 ± 3,4
CdSO ₄	32,7 ± 0,3	NiCl ₂	66,0 ± 1,0
HgCl ₂	29,5 ± 0,9	MgCl ₂	64,5 ± 1,9
MgCl ₂	4,0 ± 0,1	HgCl ₂	62,3 ± 1,3
AgNO ₃	0,9 ± 0,2	CoCl ₂	53,8 ± 0,7
Ba(Ac) ₂	0,8 ± 0,1	CuCl ₂	52,4 ± 0,9
KCl	< 0,5	CdSO ₄	49,8 ± 2,3
ZnCl ₂	< 0,5	FeCl ₃	48,8 ± 5,3
SnCl ₂	< 0,5	MnCl ₂	47,1 ± 1,7
LiCl	< 0,5	ZnCl ₂	44,5 ± 2,9
RbCl	< 0,5	Al ₂ (SO ₄) ₃	44,8 ± 1,3
CsCl	< 0,5	FeSO ₄	33,4 ± 0,5
NaCl	< 0,5	Pb(Ac) ₂	26,9 ± 0,4
FeCl ₃	< 0,5	AgNO ₃	8,2 ± 0,4

^a Enzima incubada com 1 mM de EDTA para remoção de qualquer metal que possa estar ligado a sua estrutura. ^b Condição de referência: 100% de atividade.

A enzima na concentração de 250 nM foi previamente incubada em uma solução de 1 mM EDTA/50 mM Tris-HCl pH 7,5, durante 1 h, para remoção de possíveis cátions ligados à estrutura da enzima. Após este período, foi adicionado nos poços da placa de 96 poços 20 µL da solução enzimática, 25 µL de uma solução com o cátion a ser analisado e 205 µL de solução de substrato (com 0,5 mM de EDTA), resultando em 250 µL de mistura de reação (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 1 mM do cátion a ser analisado, 0,3% (v/v) de Triton X-100, 20 nM de enzima, 1 mM *p*NPP, 0,45 mM EDTA, 4% (v/v) de isopropanol, 1% (v/v) acetonitrila) que foi monitorada a 410 nm, conforme descrito no item 4.14.1. O efeito dos cátions na atividade enzimática da enzima sem a prévia depleção de cátions com EDTA também foi verificado.

TABELA 5 – EFEITO DE ÂNIONS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Ânion ^a (1 mM)	Atividade Relativa (%)	Ânion ^a (10 mM)	Atividade Relativa (%)
Nenhum ^b	100,0 ± 4,5	Nenhum ^b	100,0 ± 1,4
CH ₃ COO ⁻	108,4 ± 7,8	SO ₄ ²⁻	110,4 ± 0,9
NO ₃ ⁻	102,6 ± 2,6	SO ₃ ²⁻	109,1 ± 1,0
SO ₄ ²⁻	99,3 ± 3,4	CH ₃ COO ⁻	108,4 ± 2,2
Cl ⁻	97,4 ± 5,4	Cl ⁻	104,5 ± 0,8
SO ₃ ²⁻	96,9 ± 3,5	NO ₃ ⁻	102,2 ± 2,7
PO ₄ ³⁻	93,2 ± 6,2	PO ₄ ³⁻	68,0 ± 1,4

a Todos os ânions são de sais de sódio para evitar a interferência dos respectivos cátions.

b Condição de referência: 100% de atividade.

5.7.3 Determinação da especificidade da lipase LipC12 contra ésteres de *p*-nitrofenila

LipC12 apresentou maior atividade relativa, acima de 75%, contra ésteres de *p*-nitrofenila que possuem grupamentos acila entre 10 e 16 átomos de carbono (FIGURA 25), com máxima atividade contra o palmitato de *p*-nitrofenila (atividade absoluta de 196,5 U/mg e atividade relativa de 100%), indicando que LipC12 é de fato uma lipase e não uma esterase. Para ésteres cuja cadeia acila é pequena, entre 2 e 6 átomos de carbono, as atividades relativas foram inferiores a 35%. A preferência por ésteres com cadeia longa de ácido graxo é típico de lipases, sendo utilizado como critério para diferenciar lipases de esterases (JAEGER *et al.*, 1999).

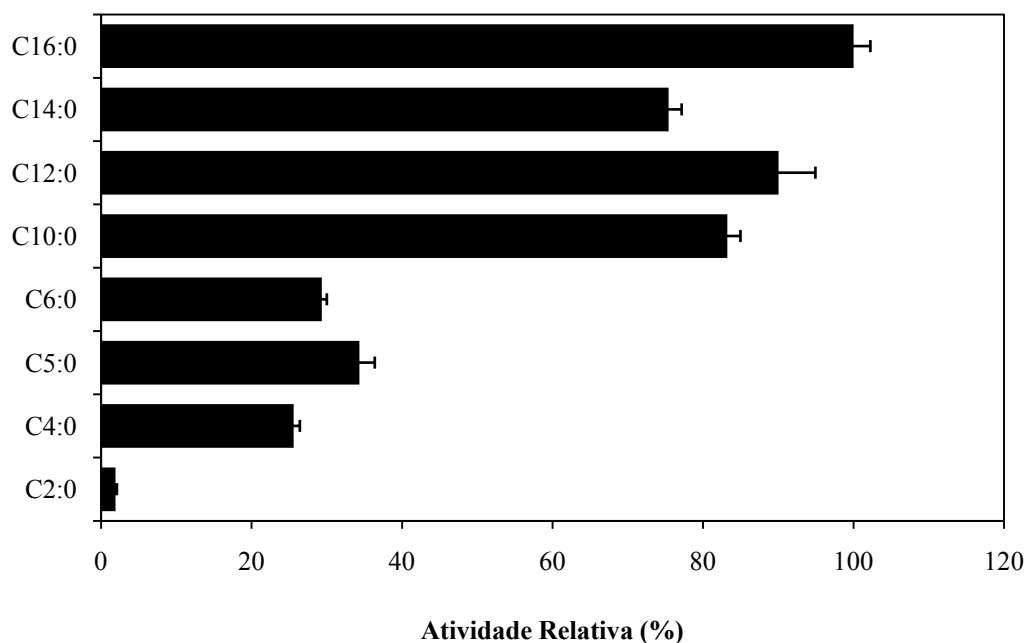


FIGURA 25 – ESPECIFICIDADE DA LIPASE LipC12

A especificidade ao substrato foi determinada utilizando os substratos acetato de *p*-nitrofenila (C2:0), butirato de *p*-nitrofenila (C4:0), valerato de *p*-nitrofenila (C5:0), caproato de *p*-nitrofenila (C6:0), decanoato de *p*-nitrofenila (C10:0), dodecanoato de *p*-nitrofenila (C12:0), miristato de *p*-nitrofenila (C14:0) e palmitato de *p*-nitrofenila (C16:0) no ensaio padrão de determinação da atividade.

5.7.4 Efeito da ação de detergentes, goma arábica e inibidores sobre a atividade da lipase LipC12

Detergentes são normalmente adicionados nas emulsões empregadas nos ensaios de atividade lipolítica para melhorar a qualidade de emulsão, aumentando a sua área superficial e tornando o substrato mais acessível. No entanto, dependendo da concentração utilizada, os detergentes também podem desnaturar enzimas. Na concentração de 0,1% (v/v), os detergentes CTAB, NLS e Triton X-100 aumentaram a atividade da enzima até 175% (TABELA 6). O detergente NP40 não afetou a atividade, já o SDS diminuiu a atividade enzimática em cerca de 50%. Apesar dos detergentes Tween 20, Tween 40 e Tween 60 serem detergentes não-iônicos, assim como o Triton X-100 e o NP40, eles inibiram a atividade enzimática tanto ou mais do que o SDS. Este efeito foi provavelmente devido ao fato que os detergentes da série Tween possuem a função éster com longos grupamentos acila, sendo, portanto, substratos para LipC12 e inibidores competitivos do *p*NPP. O detergente Tween 80 foi o maior inibidor da hidrólise do *p*NPP, sugerindo que LipC12 tem preferência por ésteres de ácido graxo C18 (Tween 80) em relação aos ésteres C16 (Tween 40) e C12 (Tween 20).

TABELA 6 – EFEITO DE DETERGENTES, INIBIDORES E GOMA ARÁBICA

Aditivo	Atividade Relativa (%)	Aditivo	Atividade Relativa (%)	Aditivo	Atividade Relativa (%)
Detergente (0,1%)		Detergente (1%)		Inibidor (1 mM)	
Nenhum ^a	100,0 ± 3,7	Nenhum ^a	100,0 ± 1,2	Nenhum ^a	100,0 ± 0,6
CTAB	175,0 ± 3,7	Triton X-100	34,3 ± 0,3	PMSF	13,1 ± 1,2
NLS	130,5 ± 0,1	NP40	29,0 ± 0,5	DEPC	35,4 ± 0,4
Triton X-100	114,1 ± 3,6	NLS	16,9 ± 0,4	Agente Emulsificante	
NP40	102,8 ± 2,6	Tween 40	15,4 ± 0,7	Nenhum ^a	100,0 ± 2,2
Tween 20	56,4 ± 1,8	Tween 20	15,4 ± 0,2	Goma arábica (0,5%)	186,5 ± 1,3
SDS	50,7 ± 2,4	Tween 80	12,9 ± 0,3		
Tween 40	38,6 ± 1,0	CTAB	12,0 ± 0,7		
Tween 80	32,6 ± 0,3	SDS	8,8 ± 0,2		

^a Condição de referência: 100% de atividade.

O efeito sobre a atividade enzimática dos seguintes reagentes foi investigado: fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), dietilpirocarbonato (DEPC), Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100, Nonidet P-40 (NP40), dodecil sulfato de sódio (SDS), N-lauroil sarcosina (NLS), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) e goma arábica. Para estes ensaios, a determinação da atividade enzimática foi feita conforme o ensaio padrão (item 4.14.1), exceto que os reagentes listados acima foram previamente adicionados na mistura de reação.

Na concentração de 1% (v/v), todos os detergentes testados diminuíram significativamente a atividade enzimática, sendo que LipC12 tolerou melhor os detergentes não-iônicos NP40 e Triton X-100.

A goma arábica é frequentemente adicionada como estabilizante nas emulsões para medida da atividade lipolítica (HASAN *et al.*, 2009). Na concentração de 0,5% (m/v) de goma arábica, a atividade relativa da enzima quase duplicou, atingindo 186%. Agentes inibidores de lipases, tais como o PMSF (inibidor específico das serina hidrolases) e DEPC (modificador de resíduos de histidina), na concentração de 1 mM, reduziram fortemente a atividade de LipC12. Este efeito confirma o fato de que os resíduos serina e histidina fazem parte da tríade catalítica desta lipase.

5.7.5 Efeito da ação de solventes orgânicos sobre a estabilidade da enzima

LipC12 foi incubada por 48 h a 4°C na presença de solventes orgânicos (TABELA 7) nas concentrações de 15% e 30% (v/v) antes da medida da atividade lipolítica (TABELA 7). Em todos os casos, a atividade da enzima LipC12 após incubação nos solventes orgânicos foi estimulada. Este fenômeno já foi descrito na literatura: a lipase de *Candida rugosa* foi ativada

pela incubação em solventes orgânicos, os quais mantêm a tampa hidrofóbica da enzima na conformação aberta, o que facilita o acesso do substrato ao sítio ativo (GROCHULSKI *et al.*, 1993; COLTON *et al.*, 1995).

TABELA 7 – EFEITO DA AÇÃO DE SOLVENTES ORGÂNICOS SOBRE A ESTABILIDADE

Solvente	Atividade Residual (%)	Solvente	Atividade Residual (%)
Nenhum ^a	100,0 ± 5,7	THF 15%	463,6 ± 139,4
Metanol 15%	1204,1 ± 20,6	THF 30%	1690,9 ± 29,0
Metanol 30%	1561,1 ± 72,4	Dioxana 15%	505,4 ± 22,8
Etanol 15%	587,6 ± 28,2	Dioxana 30%	509,7 ± 47,3
Etanol 30%	428,4 ± 39,1	DMSO 15%	263,7 ± 10,1
1-Propanol 15%	329,0 ± 15,0	DMSO 30%	770,1 ± 41,7
1-Propanol 30%	1161,9 ± 27,4	DMF 15%	223,1 ± 12,5
2-Propanol 15%	170,6 ± 3,3	DMF 30%	355,9 ± 2,8
2-Propanol 30%	696,2 ± 57,9	Glicerol 15%	167,8 ± 2,1
		Glicerol 30%	233,0 ± 6,4

^a Condição de referência: 100% de atividade.

A estabilidade em solventes orgânicos foi determinada através da análise da atividade enzimática residual após incubação da enzima (500 nM) em soluções com 15% ou 30% (v/v) de solventes orgânicos em tampão Tris-HCl 200 mM pH 8, CaCl₂ 5 mM a 4°C por 48 h. A fim de equalizar as diferentes concentrações dos solventes na incubação para a análise da atividade residual, a concentração final da incubação a 15% (v/v) foi corrigida para 0,3% (v/v). A concentração de enzima no ensaio foi 5 nM (a enzima foi diluída 100 vezes antes da análise da atividade residual).

5.7.6 Efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre a atividade e estabilidade de LipC12

A adição de NaCl na emulsão de *p*NPP até a concentração de 1,5 M aumentou a atividade de LipC12 em até 15 vezes (TABELA 8), porém, após este ponto, a atividade diminuiu consideravelmente. Na concentração de 3 M de sal, a emulsão ficou turva, indicando uma redução na solubilidade do substrato. O efeito de aumento e diminuição da atividade enzimática é provavelmente devido à maior ou menor solubilização do substrato, respectivamente, já que a enzima LipC12 é estável em concentrações de NaCl de até 3,7 M (TABELA 9).

TABELA 8 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE A ATIVIDADE

Concentração Molar	Atividade Relativa (%)
Nenhum ^a	100,0 ± 2,9
0,01 M	109,4 ± 4,5
0,05 M	121,8 ± 2,0
0,1 M	126,0 ± 3,2
0,2 M	148,8 ± 4,1
0,5 M	349,4 ± 26,1
1,0 M	1346,5 ± 38,2
1,5 M	1501,5 ± 74,6
2,0 M	1333,5 ± 95,4
2,5 M	37,2 ± 7,5
3,0 M	114,3 ± 1,6
3,5 M	164,4 ± 8,1
4,0 M	170,9 ± 1,7

^a Condição de referência: 100% de atividade.

A determinação da atividade em altas concentrações de NaCl foi feita conforme o ensaio padrão 4.14.1 exceto pelo fato do NaCl ter sido adicionado no tampão de reação.

TABELA 9 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE A ESTABILIDADE

Concentração Molar	Atividade Residual (%)
Nenhum ^a	100,0 ± 6,5
0,9 M	100,9 ± 8,5
1,9 M	102,2 ± 7,1
2,3 M	99,7 ± 5,0
2,8 M	109,0 ± 11,7
3,2 M	99,1 ± 7,7
3,7 M	111,8 ± 6,8

^a Condição de referência: 100% de atividade.

A enzima foi incubada na concentração de 785 nM (1 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) em diferentes concentrações de NaCl (concentração máxima de 3,7 M) por 24 h a 4°C. Para análise da atividade residual, as diferentes concentrações de sal foram equalizadas para 37 mM e a concentração de enzima no ensaio foi de 7,85 nM.

5.7.7 Efeito do pH sobre a estabilidade de LipC12

A análise da estabilidade das enzimas frente ao pH é importante para identificar quais valores de pH devem ser usados ou evitados nos tampões de purificação, armazenamento e durante as reações enzimáticas. LipC12 mostrou uma ampla tolerância ao pH, com mais de 90% de atividade residual após 1 h de incubação no intervalo de pH entre 6 e 11 (TABELA 10).

No pH 3 LipC12 perdeu completamente a atividade e no intervalo de pH entre 4 e 5,5 a atividade residual variou entre 71 e 84%. A enzima apresentou um mínimo de estabilidade local no pH 5,5, possivelmente devido ao fenômeno da precipitação isoelétrica, quando o pH do meio fica próximo do pI da proteína (SCOPES, 1987).

TABELA 10 – EFEITO DO pH SOBRE A ESTABILIDADE DA LIPASE LipC12

pH ^a	Atividade Residual (%)
AC 3	0
AC 4	83,9 ± 5,3
AC 5	85,7 ± 5,9
AC 5,5	70,5 ± 4,0
MES 5,5	77,9 ± 6,1
MES 6	92,4 ± 5,3
MES 7	95,5 ± 1,0
HEPES 7	95,7 ± 8,1
HEPES 7,5 ^b	100,0 ± 4,9
GLC 7,5	96,9 ± 5,1
GLC 8	94,8 ± 3,1
GLC 9	98,4 ± 10,6
GLC 10	99,0 ± 5,3
GLC 11	91,5 ± 6,3

^a LipC12 (500 nM) foi incubada por 24 h a 4°C nos tampões e valores de pH indicados e a atividade residual da enzima foi então determinada.

^b Condição de referência: 100% de atividade.

Para a faixa de valores de pH entre 3,0 e 11,0, os tampões utilizados foram: acetato de sódio 50 mM (pH 3,0 a 5,5), MES 50 mM (pH 5,5 a 7,0), HEPES 50 mM (pH 7,0 a 7,5) e glicina 50 mM (pH 7,5-11). A enzima foi diluída 100 vezes no tampão HEPES (50 mM, pH 7,5) para análise da atividade residual usando o ensaio padrão.

5.7.8 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima LipC12

Nos processos enzimáticos é necessário empregar uma temperatura de reação que permita ao mesmo tempo uma velocidade de reação razoavelmente elevada e mantenha a taxa de desnaturação da enzima em um nível razoavelmente baixo. A lipase LipC12 apresentou máxima atividade a 30°C (FIGURA 26), durante uma hora de reação enzimática. Além disso, após um período de incubação de uma hora, na ausência de substrato, a atividade não foi afetada temperatura de 50°C (TABELA 11). Após o período de incubação de uma hora a 70°C, a enzima reteve cerca de 65% da sua atividade original.

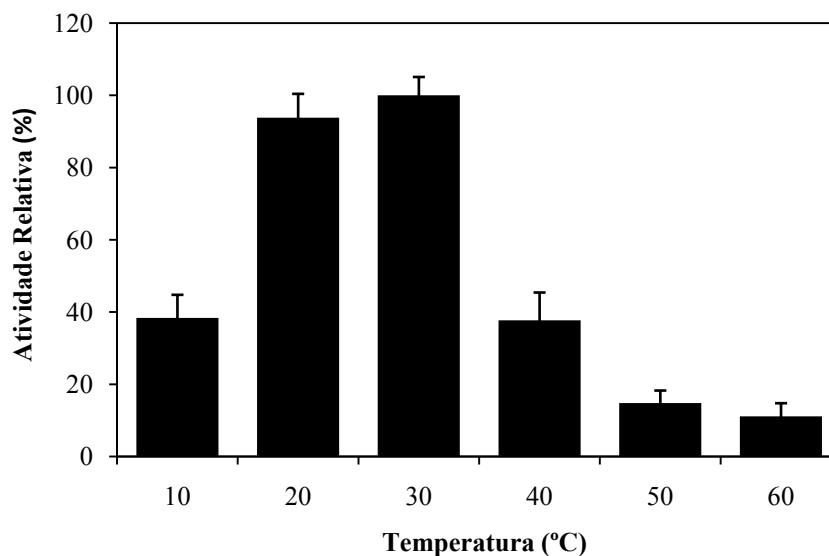


FIGURA 26 – EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DE LipC12

A temperatura de máxima conversão do substrato para um tempo de reação de 1 h foi determinada pela medida do *p*-nitrofenol liberado após uma hora de reação da enzima com éster de *p*-nitrofenila (2 nM de enzima, 10 mM butirato de *p*-nitrofenila, MES 50 mM pH 6,0, 1 mM CaCl₂, 0,3% (v/v) de Triton X-100, 4% (v/v) de isopropanol, 1% (v/v) acetonitrila) em um volume de reação de 50 µL em diversas temperaturas entre 10°C e 60°C.

5.8 Determinação titulométrica da atividade de LipC12 utilizando triacilgliceróis

5.8.1 Determinação da especificidade da lipase LipC12 contra triacilgliceróis

Como mostrado na FIGURA 27, LipC12 foi mais ativa contra tributirina (2187 U/mg), gordura de porco (1767 U/mg) e azeite de oliva (1722 U/mg) e apresentou menor atividade contra tripropionina (344 U/mg), óleo de mamona (215 U/mg) e triacetina (28 U/mg). Por outro lado, a análise zimográfica e os testes em meio seletivo indicaram uma maior atividade contra tricaprilina (C8) do que contra tributirina (C4). Além disso, nos ensaios contra ésteres de *p*-nitrofenila, LipC12 apresentou maior atividade contra os ésteres cuja cadeia acila possuía mais do que 10 átomos de carbono. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que a atividade não depende apenas do comprimento da cadeia acila, mas também é afetada por outros fatores como diferenças no conteúdo dos triacilgliceróis presentes nos óleos comerciais, presença ou ausência de insaturações ou grupos hidroxila na cadeia acila, solubilidade dos triacilgliceróis e qualidade da emulsão (maior ou menor área interfacial). Por exemplo, LipC12 apresentou baixa atividade contra óleo de mamona,

provavelmente devido à presença de um grupo hidroxila no décimo segundo carbono do ácido ricinoleico.

TABELA 11 – EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DA LIPASE LipC12

Temperatura ^a	Atividade Residual (%)
0°C ^b	100,0 ± 4,2
20°C	100,0 ± 1,0
30°C	96,2 ± 7,7
40°C	100,0 ± 4,2
50°C	94,0 ± 6,4
60°C	75,8 ± 4,0
70°C	64,9 ± 8,3
80°C	31,4 ± 0,7
90°C	6,4 ± 1,3

^a LipC12 foi incubada por 1 h nas temperaturas indicadas.

^b Condição de referência: 100% de atividade.

A termoestabilidade foi determinada através da análise da atividade enzimática residual após incubação da enzima (250 nM de enzima, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, CaCl₂ 5 mM) em diferentes temperaturas na faixa de 0°C a 90°C durante 1 h. Após o término do tempo de incubação, a atividade residual foi determinada com 10 nM de enzima na mistura de reação.

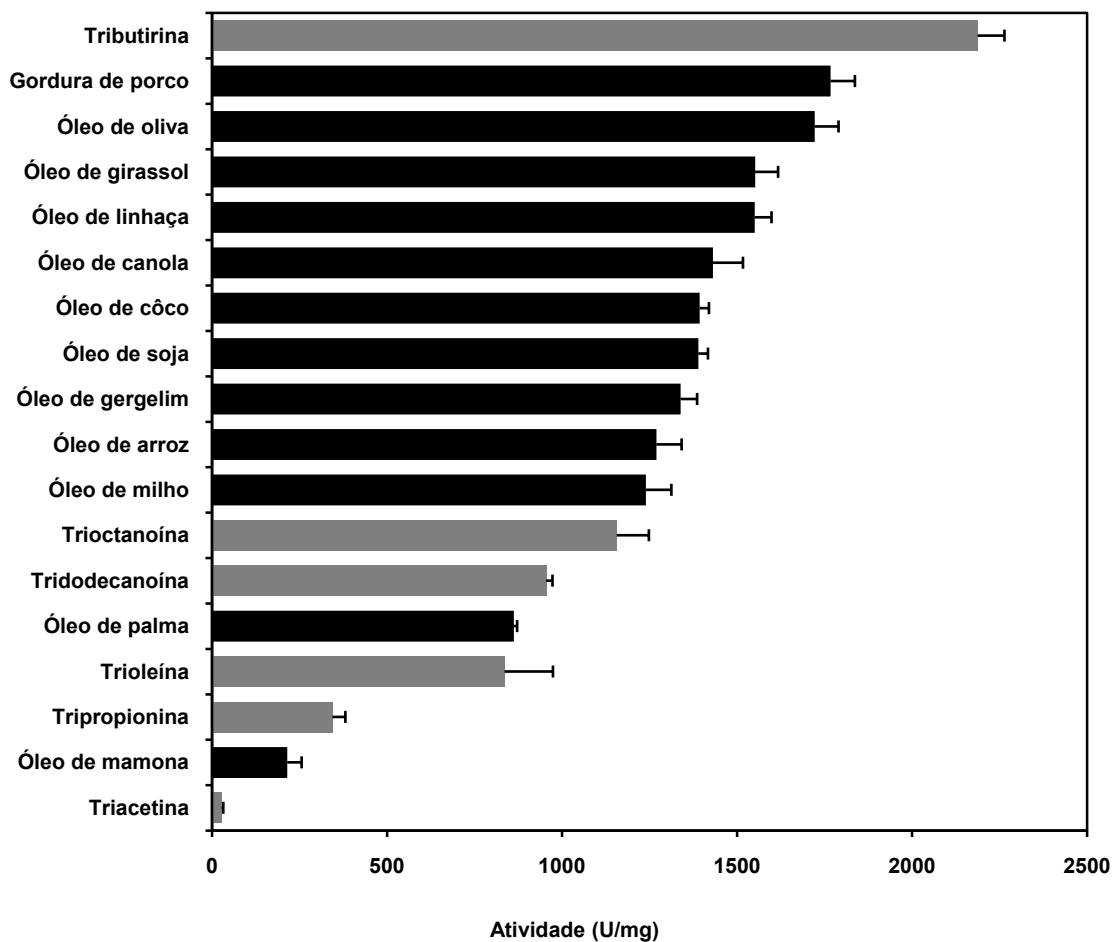


FIGURA 27 – ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LipC12 CONTRA DIVERSOS TRIACILGLICERÓIS

O tamanho do grupamento acila varia entre 2 e 18 átomos de carbono dependendo do triacilglicerol utilizado. As emulsões empregadas nos ensaios consistiram do substrato (triacilgliceróis) 67 mM, goma arábica 3% (m/v), CaCl_2 2 mM, Tris-HCl 2,5 mM e 150 mM NaCl, em água destilada (TISS *et al.*, 2001). Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados automaticamente em um titulador Metrohm 718 STAT Titrino (Metrohm, Herisau, Suíça), com 0,05 M de NaOH por 5 min. Durante a titulação o pH foi mantido fixo em 8,5. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a liberação de um μmol de ácido graxo por minuto.

5.8.2 Efeito do pH sobre a atividade de LipC12

O efeito do pH sobre a atividade foi estudado usando tributirina como substrato, pois a tributirina possui o menor fator de correção, em relação à tricaprilina e à trioleína, devido ao baixo pK_a do ácido butírico.

A atividade da enzima foi verificada no intervalo de pH 4-10. Para os valores de pH acima de 11 não foi possível medir a atividade enzimática de modo confiável, devido à hidrólise química da tributirina (FIGURA 28).

LipC12 exibiu valores mais elevados de atividade enzimática relativa ($\geq 90\%$) em valores de pH acima de 7 e a atividade máxima (100%) foi atingida em pH 10. Nenhuma atividade foi observada em valores de pH abaixo de 4,5. LipC12 demonstrou ser mais ativa em ambientes neutros e alcalinos. Lipases comumente exibem máxima atividade em valores de pH acima de 8 (FOJAN *et al.*, 2000).

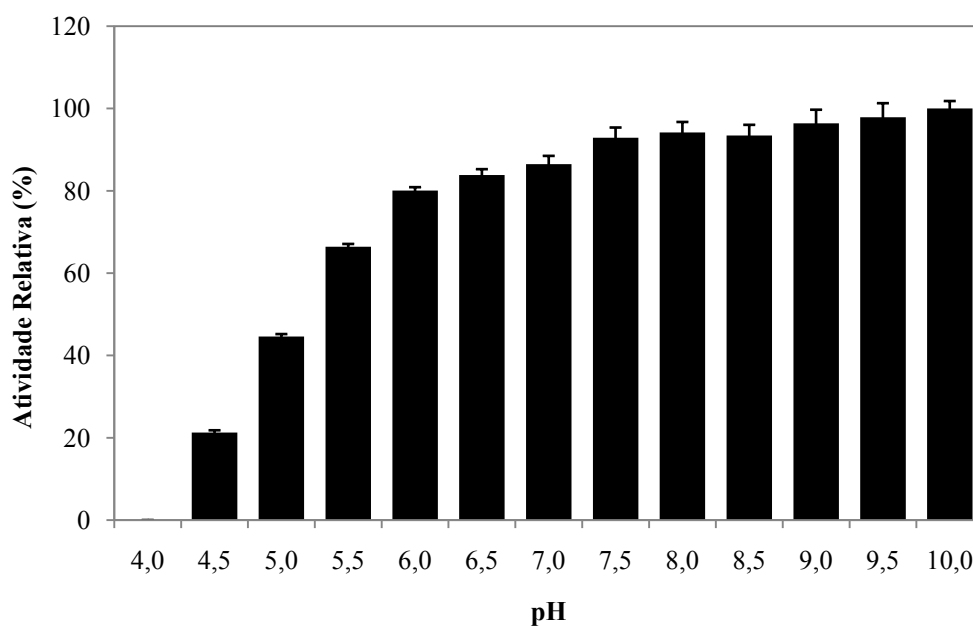


FIGURA 28 – EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DE LipC12

A tributirina foi utilizada como substrato devido ao menor pK_a do ácido butírico. Os demais parâmetros e condições foram os mesmos do ensaio padrão, exceto que o pH foi fixado em diferentes valores (pH 4 a 10). A hidrólise química do substrato foi descontada e foram feitas correções para a dissociação parcial do ácido butanóico assumindo um pK_a de 4,57.

5.8.3 Avaliação da atividade enzimática em diferentes concentrações de NaCl

A adição de NaCl na emulsão provocou um aumento na atividade enzimática, com máxima atividade em 315 mM de NaCl (FIGURA 29) e diminuição a partir deste ponto. Esse mesmo efeito, aumento e diminuição na atividade enzimática com a concentração de sal, também foi notado nos testes espectrométricos com os ésteres de *p*-nitrofenila. Porém, como o NaCl não afeta a estabilidade da enzima (TABELA 9), a explicação mais provável é que a alteração na atividade enzimática seja devido ao efeito do NaCl na solubilidade dos substratos, ao invés de agir diretamente sobre a enzima.

Durante o preparo das emulsões com NaCl foi observado que nas concentrações acima de 2 M, à medida que a concentração de NaCl aumentava na emulsão, aumentava o aparecimento de gotas de óleo de oliva na superfície, fato que sugere uma maior instabilidade da emulsão e, conseqüentemente, uma diminuição na área superficial da interface óleo/água.

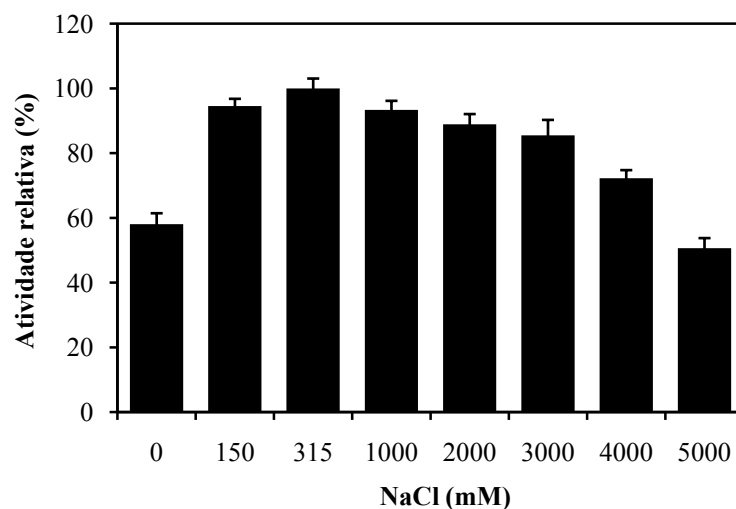


FIGURA 29 – ATIVIDADE DE LipC12 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl
O NaCl foi pesado e diretamente adicionado na emulsão até a concentração de 5 M. Óleo de oliva foi utilizado como substrato e os demais parâmetros foram utilizados conforme o ensaio padrão.

5.9 Análises de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência total

A análise da estrutura secundária da lipase LipC12 foi feita pelo método CDSSTR disponível no servidor DICHROWEB (WHITMORE e WALLACE, 2004; 2008), a partir do espectro de dicroísmo circular da FIGURA 30. O conteúdo estimado foi de 36% de α -hélices

e 18% de folhas- β , os quais são bem próximos dos conteúdos obtidos pela modelagem molecular *in silico*, estimados em 40,1% de α -hélices e 12,2% de folhas- β .

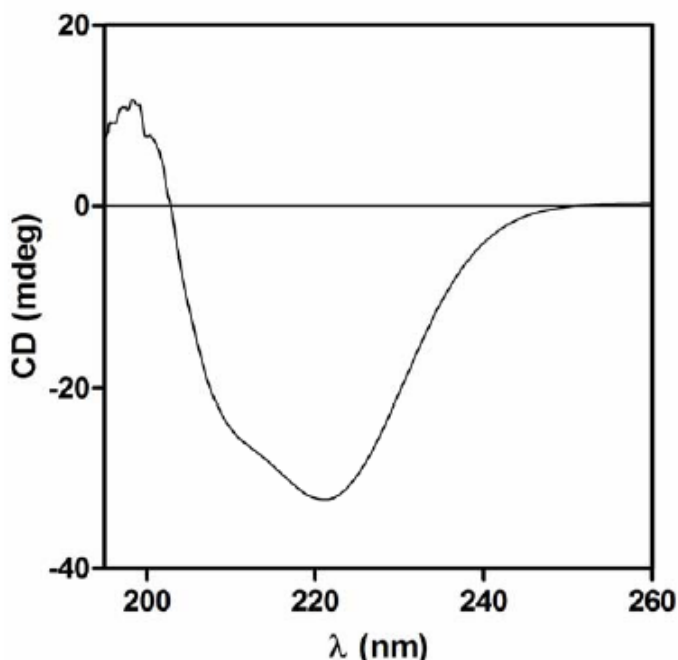


FIGURA 30 – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE LipC12

Espectro obtido com a enzima a 15 μ M em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 e NaCl 20 mM. A estrutura secundária de LipC12 foi estimada por este espectro, resultando em um conteúdo 36% de α -hélices e 18% de folhas- β .

Os fenômenos de desnaturação térmica (15-95°C) e agregação térmica (15-80°C) da lipase LipC12 foram analisados através de dicróismo circular e espectroscopia de fluorescência total, respectivamente. Estas análises foram realizadas na presença e na ausência de íons cálcio, a fim de verificar a provável existência do efeito protetor do Ca^{2+} sobre a estrutura da lipase LipC12, fenômeno que ocorre em outras lipases dependentes de cálcio (EL KHATTABI *et al.*, 2003; INVERNIZZI *et al.*, 2009). Os cálculos foram executados de acordo com Woody (1995), assumindo o perfil de estrutura secundária da enzima a 15°C como nativo e sem desnaturação.

As FIGURAS 31 e 32 confirmam que, de fato, o íon cálcio tem um efeito de proteção térmica sobre a estrutura da lipase LipC12. Na presença de Ca^{2+} (1 mM) o percentual de desnaturação a 80°C foi 18,6% menor do que na ausência de Ca^{2+} . Na presença

de Ca^{2+} , a desnaturação térmica da enzima passou a ser mais intensa a partir de 60°C , com um percentual de desnaturação de 6,3% e um máximo de 48,6% a 95°C (FIGURA 32).

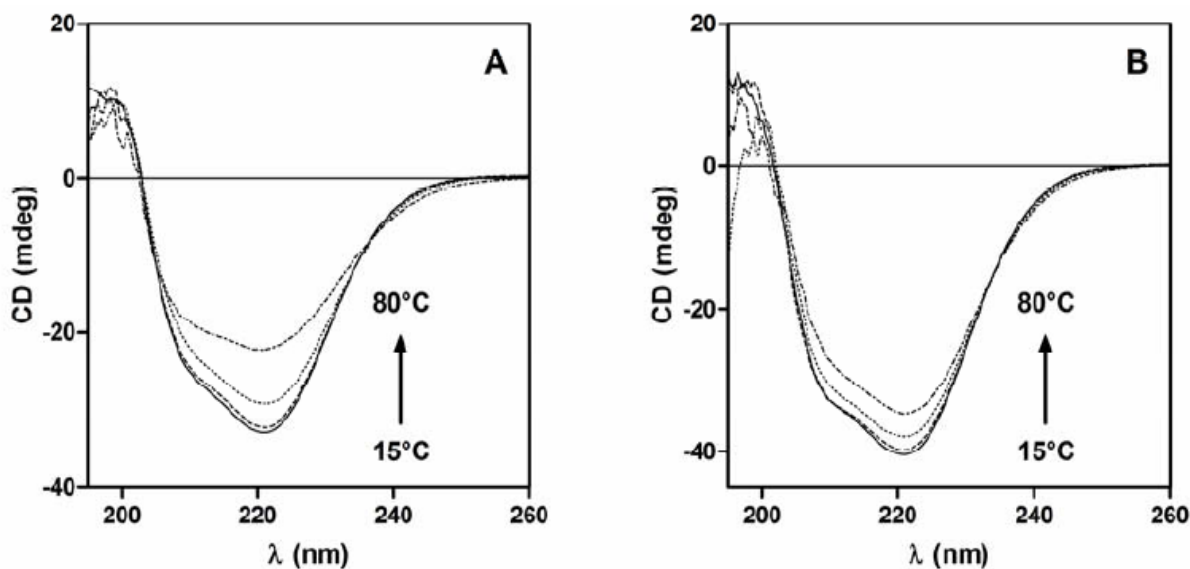


FIGURA 31 – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE LipC12 EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Os espectros foram obtidos na ausência (A) e na presença de cálcio (B) e nas temperaturas de 15, 30, 60 e 80°C .

Em concordância com estes resultados, a análise de espectroscopia de fluorescência total (FIGURA 33) revelou que a agregação da lipase LipC12 também foi mais expressiva a partir de 60°C , com uma forte ação protetora do íon cálcio (1 mM). A 80°C , a razão das intensidades das emissões nos comprimentos de onda 280 nm e 340 nm, a qual é proporcional ao grau de desnaturação, foi 10,6 vezes maior na ausência de Ca^{2+} do que na presença do íon. Quando a temperatura foi diminuída de 80°C para 25°C , ocorreu uma desagregação parcial da proteína.

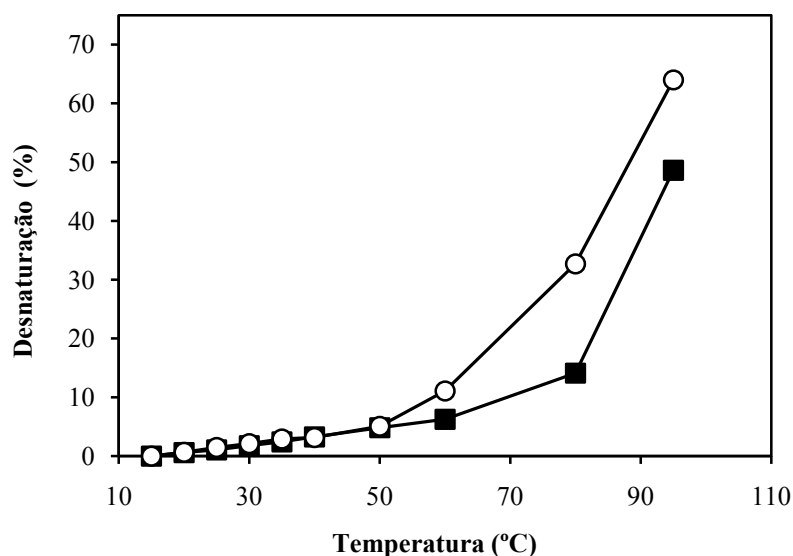


FIGURA 32 – PERCENTUAL DE DESNATURAÇÃO DE LipC12 EM DIFERENTES TEMPERATURAS

O percentual de desnaturação foi calculado a partir dos espectros de dicróismo circular obtidos na ausência (○) e na presença (■) de cálcio.

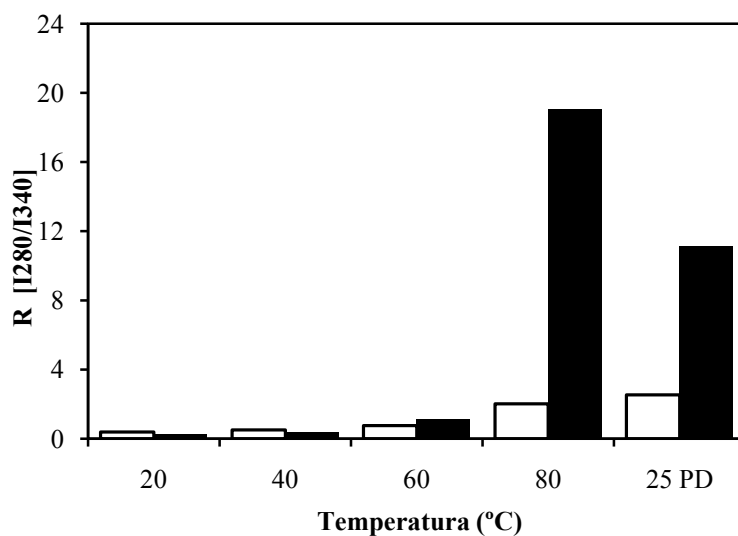


FIGURA 33 – ANÁLISE DO GRAU DE AGREGAÇÃO DE LipC12 COM A TEMPERATURA

Análises de espectroscopia de fluorescência total foram realizadas com comprimento de onda de excitação de 280 nm e varredura das emissões na faixa de 250-450 nm, correspondente à contribuição na emissão dos resíduos tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e triptofano (Trp), na presença (colunas brancas) e na ausência de cálcio (colunas pretas). O grau de agregação é proporcional à razão das intensidades das emissões nos comprimentos de 280 e 340 nm. Após ser resfriada até a temperatura de 25°C, ocorreu uma desagregação parcial da proteína (PD).

Com base nestes resultados, é possível afirmar que o íon cálcio, além de ser necessário para a atividade enzimática, tem ação protetora contra a desnaturação induzida pela temperatura, sendo, portanto, de fundamental importância para a lipase LipC12.

6 DISCUSSÃO

6.1 Construção da biblioteca metagenômica e seleção de clones com atividade lipolítica

A combinação de uma amostra de solo contaminado com alto teor de matéria orgânica, com um protocolo de extração indireta do DNA ambiental, foi, provavelmente, o fator responsável pela elevada porcentagem (0,53%) de clones com atividade lipolítica encontrados na biblioteca metagenômica. Até o presente momento, apenas dois outros trabalhos relataram a obtenção de taxas desta magnitude. Liaw et al. (2010) obtiveram uma porcentagem de clones com atividade lipolítica de 0,31% (12 positivos) em uma biblioteca metagenômica obtida a partir de uma amostra de lodo ativado de uma estação de tratamento de efluentes de uma indústria de beneficiamento de carne suína. Os autores atribuíram a alta porcentagem de clones positivos encontrada à natureza da amostra, a qual deve ter promovido uma etapa de enriquecimento de genes de lipases e esterases. Hardeman e Sjöling (2007), usando um protocolo de extração de DNA procariótico, obtiveram a porcentagem de 1% de clones com atividade lipolítica em uma biblioteca metagenômica (composta por 7000 fósmites) obtida a partir do sedimento do mar báltico.

Os trabalhos que não utilizaram amostras ambientais enriquecidas com microrganismos lipolíticos nem o método de extração do DNA procariótico obtiveram porcentagens mais baixas, variando entre 0,001% e 0,2% (RHEE *et al.*, 2005; LIAW *et al.*, 2010).

O procedimento de extração indireto do DNA utilizado neste projeto contorna dois problemas principais. Em primeiro lugar, é muito difícil extrair DNA de alta massa molecular, para clonagem em fósmites, de um solo com alto teor de matéria orgânica através da técnica de lise direta (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2008), na qual as células são diretamente lisadas no próprio solo. Em segundo lugar, mesmo que as células eucarióticas possam corresponder a apenas 0,1% do número total de células em uma amostra ambiental, elas podem ser responsáveis por cerca de 90% do DNA total extraído, devido ao maior

tamanho do genoma dos eucariotos em comparação com o dos procariotos. O DNA eucariótico aumenta o tamanho da biblioteca metagenômica e tende a ter uma baixa expressão em *E. coli*, dificultando a identificação de genes de interesse na etapa de seleção funcional (GABOR *et al.*, 2003).

Além da elevada porcentagem de clones ativos, o tamanho da biblioteca é um fator crítico para o sucesso de um projeto em metagenômica. Bibliotecas metagenômicas costumam ter um tamanho bem variado, de poucos milhares a alguns milhões de clones (RIESENFELD, SCHLOSS, *et al.*, 2004; DANIEL, 2005; KIMURA, 2006). No presente trabalho, a elevada porcentagem de clones com atividade lipolítica encontrada e o tamanho da biblioteca metagenômica, composta por 500.000 clones, permitiram a seleção de 2661 clones com atividade lipolítica, o maior número de clones ativos já relatados em uma única biblioteca metagenômica.

Além disso, a estratégia da seleção em três etapas possibilitou não só a seleção de clones produtores de lipases com atividade contra triacilgliceróis com ácido graxo de cadeia longa como também permitiu a seleção de um grande número de clones produtores de lipases e esterases, com atividade contra triacilgliceróis de cadeia média e curta.

6.2 Lipase LipC12

LipC12 apresentou uma atividade contra óleo de oliva (1722 U/mg) comparável às apresentadas pelas lipases dos fungos *Rhizopus oryzae* (1000 U/mg), *Rhizomucor miehei* (3300 U/mg) e *Thermomyces lanuginosus* (2900 U/mg), este último também conhecido como *Humicola lanuginosa* (NINI *et al.*, 2001). Estas lipases apresentam elevada atividade contra triacilgliceróis de cadeia longa e são usadas industrialmente (SHARMA *et al.*, 2001; HOUDE *et al.*, 2004; HASAN *et al.*, 2006).

Poucas lipases com atividade contra triacilgliceróis de cadeia longa foram encontradas até o presente momento através da abordagem metagenômica. Na literatura, dentre as lipases derivadas de bibliotecas metagenômicas, LipC12 apresentou as maiores atividades específicas reportadas contra triacilgliceróis de cadeia longa (1767 e 1722 U/mg contra gordura de porco e azeite de oliva, respectivamente). EML1, uma lipase de uma biblioteca metagenômica derivada de sedimentos marinhos, apresentou preferência por

triacilgliceróis de cadeia média, com uma atividade de 203 U/mg contra trilaurina (C12) (JEON, KIM, KIM, *et al.*, 2009); as lipases RlipE1 e RlipE2, isoladas de uma biblioteca metagenômica derivada de rúmen bovino, apresentaram atividades específicas contra trioleína (C18) de 346 e 232 U/mg, respectivamente (LIU, K. *et al.*, 2009); LipG apresentou uma atividade de 459 U/mg contra o *p*NPP e em relação aos triacilgliceróis apenas as atividades relativas foram apresentadas, com maior atividade contra trioleína (C18), seguida por tricaprilina (C8) e tributirina (C4) (LEE, M. H. *et al.*, 2006). Outros trabalhos reportam lipases derivadas de bibliotecas metagenômicas que apresentaram halos de hidrólise em meio seletivo com trioleína ou azeite de oliva, porém as atividades contra estes substratos não foram medidas (JIANG *et al.*, 2006; ELEND *et al.*, 2007; MEILLEUR *et al.*, 2009).

A produção de LipC12 em grandes quantidades, como em escala industrial, certamente deve ser facilitada pela sua elevada solubilidade, fácil purificação por cromatografia de afinidade e não necessidade de co-expressão de chaperona para o enovelamento correto da enzima.

Embora esta enzima tenha sido selecionada apenas pela sua elevada atividade contra trioleína, LipC12 apresentou outras características importantes para aplicação em processos industriais, como atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH, alta atividade e elevada termoestabilidade e estabilidade frente a solventes orgânicos e a elevadas concentrações de sal. Ainda, as características desta enzima podem ser melhoradas através de técnicas de engenharia de proteínas, uma vez que sua estrutura 3D seja elucidada, ou por evolução dirigida.

7 CONCLUSÕES

Uma nova lipase denominada LipC12 foi isolada dentre os 500.000 clones da biblioteca metagenômica SCGA. A utilização de um solo contaminado com gordura animal, a etapa de enriquecimento do DNA ambiental com DNA procariótico, a triagem de clones ativos em três etapas com diferentes substratos e a grande quantidade de clones obtida na biblioteca metagenômica foram certamente fatores que colaboraram para a obtenção de um número elevado de clones ativos. Uma avaliação preliminar do potencial biotecnológico da lipase LipC12 foi feita e os resultados sugerem que LipC12 tem potencial para aplicação em biocatálise, como a produção de biodiesel por transesterificação em meio orgânico.

As principais conclusões relacionadas a cada etapa do trabalho e a algumas características de LipC12 foram:

- (a) A biblioteca metagenômica SCGA, com 500.000 clones, pode ser considerada uma biblioteca metagenômica de grande porte, em comparação com outras bibliotecas descritas na literatura;
- (b) No total, 2661 clones apresentaram atividade esterásica (em tributirina), 127 apresentaram atividade lipolítica em tricaprilina (C8:0) e 32 apresentaram atividade lipásica em trioleína (C18:1). Mesmo considerando que o gene *lipC12* se encontrava presente em pelo menos três fósseos, sugerindo que outros clones podem ter genes idênticos e que o número de genes (que codificam para lipases ou esterases) distintos é menor do que o número de clones ativos, ainda assim o número de clones ativos distintos permanece elevado;
- (c) A elevada porcentagem (0,53%) de clones com atividade lipolítica encontrados na biblioteca metagenômica independe do tamanho da biblioteca ou da presença de clones redundantes e, até o presente momento, é a segunda maior porcentagem de clones com atividade lipolítica em uma biblioteca metagenômica em comparação com as bibliotecas reportadas na literatura;
- (d) O fato de LipC12 apresentar 72% de identidade com lipases de *Yersinia sp.* e, ao mesmo tempo, possuir uma elevada atividade contra óleos vegetais e gordura animal, coloca as lipases de *Yersinia sp.* em destaque, sugerindo que estas lipases podem também possuir características biotecnológicas interessantes, assim como LipC12. Até o presente momento as lipases de *Yersinia sp.* não foram caracterizadas ou avaliadas;
- (e) LipC12 apresentou identidades abaixo de 60% com lipases já caracterizadas, como as lipases de *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Burkholderia sp.*, confirmando o potencial da metagenômica para a descoberta de novos biocatalisadores e suprimindo as expectativas em relação ao presente trabalho;
- (f) LipC12 liga um íon cálcio em sua estrutura, conforme demonstrado indiretamente através de ensaios de atividade enzimática, dicroísmo circular,

espectroscopia de fluorescência total e pela análise da sequência da enzima (presença de um sítio de ligação ao íon cálcio formado por dois resíduos de aspartato). O íon cálcio não só é necessário para a atividade enzimática como também exerce ação protetora contra a desnaturação e agregação induzida pela temperatura;

- (g) O modelo estrutural de LipC12, obtido por modelagem *in silico*, indicou a presença da tampa hidrofóbica (*lid*) na estrutura da proteína, além do sítio de ligação ao íon cálcio. LipC12 não possui pontes dissulfeto em sua estrutura, pois possui apenas uma única cisteína, e seu enovelamento é independente de chaperona. Todas essas características já foram descritas para outras lipases da subfamília I.1 das lipases bacterianas, a qual LipC12 pertence;
- (h) Na qualidade de uma lipase verdadeira, LipC12 apresentou maior atividade para os ésteres de *p*-nitrofenila com grupamentos acila maior que 10 átomos de carbono, tendo máxima atividade contra o *p*NPP (C16:0). Dentre os triacilgliceróis, LipC12 apresentou elevada atividade contra óleos vegetais de modo geral, com destaque para o azeite de oliva e para a gordura de porco;
- (i) A atividade de LipC12 foi inibida por detergentes de modo geral (na concentração de 1%), PMSF, DEPC, EDTA e EGTA, PO_4^{3-} (10 mM), alguns metais como Zn^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} e Al^{3+} e $\text{pH} < 7,5$ (inibição total em $\text{pH} < 4,5$). O NaCl altera a qualidade da emulsão e possui ação indireta sobre a atividade de LipC12, podendo aumentar ou diminuir a atividade enzimática dependendo da sua concentração no meio reacional e do tipo de substrato utilizado;
- (j) Em geral, aditivos que aumentam a solubilidade do substrato (*p*NPP) no meio reacional, aumentam de forma indireta a atividade enzimática. LipC12 teve sua atividade aumentada na presença de alguns sais de metais alcalinos (dependendo da concentração) como RbCl, NaCl e KCl e na presença de alguns detergentes em baixas concentrações (0,1%), como CTAB, NLS e Triton X-100;
- (k) LipC12 teve sua atividade estimulada após incubação em solventes orgânicos nas concentrações de 15% e 30%, sugerindo uma possível conversão da *lid* da conformação fechada para a aberta na presença de solventes orgânicos (em

concordância com a estrutura 3D proposta para LipC12, que indica a existência de uma *lid*);

- (l) LipC12 é estável em soluções de elevada concentração de NaCl (3,7M), em pHs entre 6 e 11 e apresenta maior atividade em ambientes neutros e alcalinos (pH > 7,5). A enzima perdeu completamente a atividade após ser incubada em pH 3;
- (m) A enzima apresentou temperatura ótima (determinada para um tempo de reação de uma hora) de 30°C e estabilidade em temperaturas de até 50°C.

8 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em relação a biblioteca metagenômica SCGA e aos clones com atividade lipolítica isolados da mesma:

- (a) Prospecção funcional por outros tipos de biocatalisadores (proteases, quitinases, celulasas etc) e por genes de resistência a antibióticos na biblioteca metagenômica SCGA;
- (b) Sequenciamento dos 2658 clones com atividade lipolítica em sequenciadores de nova geração, provavelmente gerando o maior banco de sequências de lipases e esterases (selecionadas através de triagem funcional) obtido a partir de uma única biblioteca metagenômica e possibilitando a clonagem e caracterização de novas lipases e esterases. Alternativamente, novos genes podem ser obtidos pelo sequenciamento tradicional, assim como utilizado para sequenciamento do gene *lipC12*.

Em relação à LipC12:

- (b) Imobilização de LipC12 e caracterização da enzima imobilizada;
- (c) Avaliação do potencial de LipC12 imobilizada para a síntese de biodiesel;
- (d) Melhoramento de LipC12 através de técnicas de engenharia de proteínas, uma vez que sua estrutura 3D seja elucidada, ou por evolução dirigida.

9 PUBLICAÇÕES

O artigo referente ao trabalho desta tese foi publicado e encontra-se disponível na versão eletrônica no sítio <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/54>.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 195-203, 2009.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, v. 343 Pt 1, p. 177-183, 1999.
- ARPIGNY, J. L.; JENDROSSEK, D.; JAEGER, K. E. A novel heat-stable lipolytic enzyme from *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 displaying similarity to polyhydroxyalkanoate depolymerases. **Fems Microbiology Letters**, v. 167, n. 1, p. 69-73, 1998.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, 2003.
- BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9-14, 2010.
- BAYER, S.; BALLSCHMITER, M.; GREINER-STOEFFELE, T. Identification of a new lipolytic enzyme family and several novel nitrilases in metagenomic libraries. **New Biotechnology**, v. 25, n. Supplement 1, p. S72-S73, 2009.
- 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. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 181-187, 2010.
- BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, n. 4, p. 783-795, 2004.
- BENKERT, P.; TOSATTO, S. C.; SCHOMBURG, D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 71, n. 1, p. 261-277, 2008.
- BISEN, P. S.; SANODIYA, B. S.; THAKUR, G. S.; BAGHEL, R. K.; PRASAD, G. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 8, p. 1019-1030, 2010.
- BOND, C. S.; SCHUTTELKOPF, A. W. ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 65, n. Pt 5, p. 510-512, 2009.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.

BRADY, S. F.; CHAO, C. J.; HANDELSMAN, J.; CLARDY, J. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. **Organic Letters**, v. 3, n. 13, p. 1981-1984, 2001.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. Long-chain N-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 51, p. 12903-12904, 2000.

BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, G. G.; LAWSON, D. M.; TURKENBURG, J. P.; BJORKKLING, F.; HUGE-JENSEN, B.; PATKAR, S. A.; THIM, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 491-494, 1991.

CARVALHO, P. D. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M. D.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, p. 614-621, 2005.

CHU, X. M.; HE, H. Z.; GUO, C. Q.; SUN, B. L. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 615-625, 2008.

COLTON, I. J.; AHMED, S. N.; KAZLAUSKAS, R. J. A 2-propanol treatment increases the enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward esters of chiral carboxylic-acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 212-217, 1995.

COTTRELL, M. T.; MOORE, J. A.; KIRCHMAN, D. L. Chitinases from uncultured marine microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2553-2557, 1999.

COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C. M.; BALL, M.; FRANCOU, F. X.; NORMAND, P.; HELYNCK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S. J.; HOPKE, J.; OSBURNE, M. S.; AUGUST, P. R.; NALIN, R.; GUERINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J. L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 49-55, 2003.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 470-478, 2005.

DEREWENDA, U.; BRZOZOWSKI, A. M.; LAWSON, D. M.; DEREWENDA, Z. S. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1532-1541, 1992.

EGGERT, T.; LEGGEWIE, C.; PULS, M.; STREIT, W.; VAN POUDEROYEN, G.; DIJKSTRA, B. W.; JAEGER, K. E. Novel biocatalysts by identification and design. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, n. 2, p. 139-144, 2004.

EL KHATTABI, M.; VAN GELDER, P.; BITTER, W.; TOMMASSEN, J. Role of the calcium ion and the disulfide bond in the Burkholderia glumae lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5-6, p. 329-338, 2003.

ELEND, C.; SCHMEISSER, C.; HOEBENREICH, H.; STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (R)-ibuprofen esters. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 4, p. 370-377, 2007.

ELEND, C.; SCHMEISSER, 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.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-2132, 2004.

ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENOM, M. A.; MADHUSUDHAN, M. S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M. Y.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Protein Science**, v. Chapter 2, p. 29, 2007.

FERRER, M.; GOLYSHINA, O. V.; CHERNIKOVA, T. N.; KHACHANE, A. N.; MARTINS DOS SANTOS, V. A. P.; YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Microbial Enzymes Mined from the Urania Deep-Sea Hypersaline Anoxic Basin. **Chemistry & Biology**, v. 12, n. 8, p. 895-904, 2005.

FERRER, M.; REYES-DUARTE, D.; GOLYSHINA, O. V.; CHERNIKOVA, T. N.; KHACHANE, A. N.; MARTINS DOS SANTOS, V. A. P.; STROMPL, C.; ELBOROUGH, K.; JARVIS, G.; NEEF, A.; YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 1996-2010, 2005.

FOJAN, P.; JONSON, P. H.; PETERSEN, M. T.; PETERSEN, S. B. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1033-1041, 2000.

GABOR, E. M.; DE VRIES, E. J.; JANSSEN, D. B. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. **Fems Microbiology Ecology**, v. 44, n. 2, p. 153-163, 2003.

GABOR, E. M.; DE VRIES, E. J.; JANSSEN, D. B. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 948-958, 2004.

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

GILLESPIE, D. E.; BRADY, S. F.; BETTERMANN, A. D.; CIANCIOOTTO, 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.

GMMSB; FISBIO. MHOLline: Automatic 3D Comparative Modelling. Disponível em: <http://www.mholline.lncc.br>.

GROCHULSKI, P.; LI, Y. G.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; SMITH, P.; HARRISON, D.; RUBIN, B.; CYGLER, M. Insights into interfacial activation from an open structure of candida-rugosa lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12843-12847, 1993.

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

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

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, n. 10, p. R245-R249, 1998.

HÅRDEMAN, F.; SJÖLING, S. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. **Fems Microbiology Ecology**, v. 59, n. 2, p. 524-534, 2007.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 782-798, 2009

HASAN, F.; SHAH, A. A.; JAVED, S.; HAMEED, A. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4836-4844, 2010.

HAYES, D. G. Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 81, n. 12, p. 1077-1103, 2004.

HEALY, F. G.; RAY, R. M.; ALDRICH, H. C.; WILKIE, A. C.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 667-674, 1995.

HENNE, A.; DANIEL, R.; SCHMITZ, R. A.; GOTTSCHALK, G. Construction of environmental DNA libraries in Escherichia coli and screening for the presence of genes

conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3901-3907, 1999.

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 and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3113-3116, 2000.

HIROKAWA, T.; BOON-CHIENG, S.; MITAKU, S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**, v. 14, n. 4, p. 378-379, 1998.

HOLM, L.; PARK, J. DaliLite workbench for protein structure comparison. **Bioinformatics**, v. 16, n. 6, p. 566-567, 2000.

HOOFT, R. W.; VRIEND, G.; SANDER, C.; ABOLA, E. E. Errors in protein structures. **Nature**, v. 381, n. 6580, p. 272, 1996.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications - An overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

HU, Y. F.; FU, C. Z.; HUANG, Y. P.; YIN, Y. S.; CHENG, G.; LEI, F.; LU, N.; LI, J.; ASHFORTH, E. J.; ZHANG, L. X.; ZHU, B. L. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. **Fems Microbiology Ecology**, v. 72, n. 2, p. 228-237, 2010.

INVERNIZZI, G.; PAPALEO, E.; GRANDORI, R.; DE GIOIA, L.; LOTTI, M. Relevance of metal ions for lipase stability: structural rearrangements induced in the *Burkholderia glumae* lipase by calcium depletion. **Journal of Structural Biology**, v. 168, n. 3, p. 562-570, 2009.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T.; EIPPER, A.; REETZ, M. T. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 5, p. 519-530, 2001.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

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

- JENSEN, R. G.; DEJONG, F. A.; CLARK, R. M. Determination of lipase specificity. **Lipids**, v. 18, n. 3, p. 239-252, 1983.
- 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. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 307-316, 2009.
- JEON, J. H.; KIM, J. T.; KIM, Y. J.; KIM, H. K.; LEE, H. S.; KANG, S. G.; KIM, S. J.; LEE, J. H. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 5, p. 865-874, 2009.
- JIANG, Z. B.; WANG, H. P.; MA, Y. S.; WEI, D. Z. Characterization of two novel lipase genes isolated directly from environmental sample. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 3, p. 327-332, 2006.
- JONES, W. J. High-Throughput Sequencing and Metagenomics. **Estuaries and Coasts**, v. 33, n. 4, p. 944-952, 2010.
- KAKIRDE, K. S.; PARSLEY, L. C.; LILES, M. R. Size Does Matter: Application-driven Approaches for Soil Metagenomics. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1911-1923, 2010.
- KANG, H. Y.; KIM, J. F.; KIM, M. H.; PARK, S. H.; OH, T. K.; HUR, C. G. MELDB: a database for microbial esterases and lipases. **Febs Letters**, v. 580, n. 11, p. 2736-2740, 2006.
- KHEADR, E. E.; VUILLEMARD, J. C.; EL-DEEB, S. A. Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. **Food Research International**, v. 36, n. 3, p. 241-252, 2003.
- 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.
- KIM, Y. H.; KWON, E. J.; KIM, S. K.; JEONG, Y. S.; KIM, J.; YUN, H. D.; KIM, H. Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 1, p. 45-49, 2010.
- KIM, Y. J.; CHOI, G. S.; KIM, S. B.; YOON, G. S.; KIM, Y. S.; RYU, Y. W. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 2, p. 315-323, 2006.
- KIMURA, N. Metagenomics: Access to Unculturable Microbes in the Environment. **Microbes and Environments**, v. 21, n. 4, p. 201-215, 2006.
- KNIETSCH, A.; WASCHKOWITZ, T.; BOWIEN, S.; HENNE, A.; DANIEL, R. Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: Generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on

Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1408-1416, 2003.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, Jan 19 2001.

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.

LÄMMLE, K.; ZIPPER, H.; BREUER, M.; HAUER, B.; BUTA, C.; BRUNNER, H.; RUPP, S. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 4, p. 575-592, 2007.

LAPIDUS, A. L.; MOSELIO, S. **Genome Sequence Databases: Sequencing and Assembly Encyclopedia of Microbiology**. Oxford: Academic Press, 2009. p. 196-210.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 291, 1993.

LEE, C. C.; KIBBLEWHITE-ACCINELLI, R. E.; WAGSCHAL, K.; ROBERTSON, G. H.; WONG, D. W. S. Cloning and characterization of a cold-active xylanase enzyme from an environmental DNA library. **Extremophiles**, v. 10, n. 4, p. 295-300, 2006.

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, n. 11, p. 7406-7409, 2006.

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**, v. 65, n. 6, p. 720-726, 2004.

LI, G.; WANG, K.; LIU, Y. H. Molecular cloning and characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase originating from the Metagenome. **Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 38, 2008.

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, n. 21, p. 8323-8329, 2010.

LIU, D. N.; TRODLER, P.; EIBEN, S.; KOSCHORRECK, K.; MULLER, M.; PLEISS, J.; MAURER, S. C.; BRANNEBY, C.; SCHMID, R. D.; HAUER, B. Rational Design of *Pseudozyma antarctica* Lipase B Yielding a General Esterification Catalyst. **Chembiochem**, v. 11, n. 6, p. 789-795, 2010.

LIU, K.; WANG, J.; BU, D.; ZHAO, S.; MCSWEENEY, C.; YU, P.; LI, D. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein

cow rumen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 385, n. 4, p. 605-611, 2009.

LIU, K. L.; WANG, J. Q.; BU, D. P.; ZHAO, S. G.; MCSWEENEY, C.; YU, P.; LI, D. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 385, n. 4, p. 605-611, 2009.

LONG, Z. D.; XU, J. H.; ZHAO, L. L.; PAN, J.; YANG, S.; HUA, L. Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 47, n. 3-4, p. 105-110, 2007.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 510-516, 2005.

MACLEAN, D.; JONES, J. D.; STUDHOLME, D. J. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 287-296, 2009.

MACNEIL, I. A.; TIONG, C. L.; MINOR, C.; AUGUST, P. R.; GROSSMAN, T. H.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; PHILLIPS, T.; NARULA, S.; SUNDARAMOORTHY, R.; TYLER, A.; ALDREDGE, T.; LONG, H.; GILMAN, M.; HOLT, D.; OSBURNE, M. S. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 301-308, 2001.

MALA, J. G.; TAKEUCHI, S. Understanding structural features of microbial lipases-an overview. **Journal of Analytical Chemistry Insights**, v. 3, p. 9-19, 2008.

MATSUMAE, H.; FURUI, M.; SHIBATANI, T. Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 93-98, 1993.

MEILLEUR, C.; HUPÉ, J. F.; JUTEAU, P.; SHARECK, F. Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 853-861, 2009.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 497-505, 2010.

NARDINI, M.; LANG, D. A.; LIEBETON, K.; JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 31219-31225, 2000.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B.; DEERFIELD, D. W. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **EMBnet.news**, v. 4, p. 14, 1997.

NINI, L.; SARDA, L.; COMEAU, L.-C.; BOITARD, E.; DUBÈS, J.-P.; CHAHINIAN, H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic

study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1534, n. 1, p. 34-44, 2001.

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.; ET AL. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

PARK, H.-J.; JEON, J. H.; KANG, S. G.; LEE, J.-H.; LEE, S.-A.; KIM, H.-K. Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome. **Protein Expression and Purification**, v. 52, n. 2, p. 340-347, 2007.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 856-866, 2009.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 576-590, 2008.

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**, v. 335, n. 1, p. 57-65, 2005.

REES, H. C.; GRANT, S.; JONES, B.; GRANT, W. D.; HEAPHY, S. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles**, v. 7, n. 5, p. 415-421, 2003.

RHEE, J. K.; AHN, D. G.; KIM, Y. G.; OH, J. W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 817-825, 2005.

RIESENFELD, C. S.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 981-989, 2004.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, v. 38, p. 525-552, 2004.

ROH, C.; VILLATTE, F. Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 1, 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.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd. ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action De La Lipase Pancreatique Sur Les Esters En Emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513-521, 1958.

SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. **Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry**. Bangalore, INDE: Current Science Association, 1999.

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.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 303-310, 2003.

SCHMIDT-DANNERT, C.; PLEISS, J.; SCHMID, R. D. A toolbox of recombinant lipases for industrial applications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 864, p. 14-22, 1998.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 2nd. ed. New York: Springer-Verlag, 1987.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SHU, Z.-Y.; JIANG, H.; LIN, R.-F.; JIANG, Y.-M.; LIN, L.; HUANG, J.-Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 1-8, 2010.

SIMON, C.; DANIEL, R. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 265-276, 2009.

SINGH, J.; BEHAL, A.; SINGLA, N.; JOSHI, A.; BIRBIAN, N.; SINGH, S.; BALI, V.; BATRA, N. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 480-494, 2009.

STEELE, H. L.; JAEGER, K. E.; DANIEL, R.; STREIT, W. R. Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 25-37, 2009.

STREIT, W. R.; DANIEL, R.; JAEGER, K.-E. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 285-290, 2004.

- SUENAGA, H.; OHNUKI, T.; MIYAZAKI, K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2289-2297, 2007.
- SYREN, P. O.; LINDGREN, E.; HOEFFKEN, H. W.; BRANNEBY, C.; MAURER, S.; HAUER, B.; HULT, K. Increased activity of enzymatic transacylation of acrylates through rational design of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 65, n. 1-4, p. 3-10, 2010.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TIRAWONGSAROJ, P.; SRIPRANG, R.; HARNPICHARNCHAI, P.; THONGARAM, T.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. **Journal of Biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 42-49, 2008.
- TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36-43, 2001.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.
- UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616-622, 2009.
- UCHIYAMA, T.; WATANABE, K. Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1202-1212, 2008.
- VAKHLU, J.; SUDAN, A. K.; JOHRI, B. N. Metagenomics: Future of microbial gene mining. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 202-215, 2008.
- VAN HELLEMOND, E. W.; JANSSEN, D. B.; FRAAIJE, M. W. Discovery of a novel styrene monooxygenase originating from the metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5832-5839, 2007.
- VAN TILBEURGH, H.; EGLOFF, M. P.; MARTINEZ, C.; RUGANI, N.; VERGER, R.; CABBILLAU, C. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 814-820, 1993.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 32, 1997.

VERMA, M. L.; AZMI, W.; KANWAR, S. S. Microbial lipases: At the interface of aqueous and non-aqueous media: A review. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 55, n. 3, p. 265-294, 2008.

VOGET, S.; LEGGEWIE, C.; UESBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K. E.; STREIT, W. R. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6235-6242, 2003.

WANG, G. Y.; GRAZIANI, E.; WATERS, B.; PAN, W.; LI, X.; MCDERMOTT, J.; MEURER, G.; SAXENA, G.; ANDERSEN, R. J.; DAVIES, J. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. **Organic Letters**, v. 2, n. 16, p. 2401-2404, 2000.

WEI, P.; BAI, L. P.; SONG, W. G.; HAO, G. P. Characterization of two soil metagenome-derived lipases with high specificity for *p*-nitrophenyl palmitate. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 3, p. 233-240, 2009.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis**. Weinheim; [Chichester]: Wiley-VCH, 2002.

WHEELER, D. L.; BARRETT, T.; BENSON, D. A.; BRYANT, S. H.; CANESE, K.; CHETVERNIN, V.; CHURCH, D. M.; DICUCCIO, M.; EDGAR, R.; FEDERHEN, S.; FEOLO, M.; GEER, L. Y.; HELMBERG, W.; KAPUSTIN, Y.; KHOVAYKO, O.; LANDSMAN, D.; LIPMAN, D. J.; MADDEN, T. L.; MAGLOTT, D. R.; MILLER, V.; OSTELL, J.; PRUITT, K. D.; SCHULER, G. D.; SHUMWAY, M.; SEQUEIRA, E.; SHERRY, S. T.; SIROTKIN, K.; SOUVOROV, A.; STARCHENKO, G.; TATUSOV, R. L.; TATUSOVA, T. A.; WAGNER, L.; YASCHENKO, E. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database issue, p. D13-21, 2008.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server issue, p. W668- W673, 2004.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2008.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W407-10, 2007.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. 3rd ed. ed. London: Ellis Horwood, 1995.

WOODY, R. W. Circular dichroism. **Methods in Enzymology**, v. 246, p. 34-71, 1995.

WU, C.; SUN, B. L. Identification of Novel Esterase from Metagenomic Library of Yangtze River. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 187-193, 2009.

XIAO, M.; MATHEW, S.; OBBARD, J. P. Biodiesel fuel production via transesterification of oils using lipase biocatalyst. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 1, n. 2, p. 115-125, 2009.

XU, X. B. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 4, p. 287-303, 2000.

YAN, Z. J.; CUI, X. L.; LI, M. G.; LI, Y. Q.; PENG, Q.; WEN, M. L. Soil metagenomics and its application for new drug discovery. **Chinese Journal of Antibiotics**, v. 31, n. 1, p. 1-5, 2006.