

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ÁREA: Biologia Molecular

Aluna: Carolini Gremski Stabach
Supervisor: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Paulert

Trabalho de conclusão de curso de
graduação apresentado como requisito
parcial para a conclusão do CURSO
SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM
BIOTECNOLOGIA.

PALOTINA - PR
Agosto de 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA**

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA
LIPASE PROVENIENTE DA BIBLIOTECA
METAGENÔMICA DOS SOLOS DA FLORESTA ATLÂNTICA
PARANAENSE**

Aluna: Carolini Gremski Stabach
Supervisor: Emanuel Maltempi de Souza
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Paulert

Trabalho de conclusão de curso de
graduação apresentado como requisito
parcial para a conclusão do CURSO
SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM
BIOTECNOLOGIA.

PALOTINA - PR
Agosto de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE PALOTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade Federal do Paraná
Setor Palotina
Curso Superior de Tecnologia em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso
Área de Estágio: Biologia Molecular
Acadêmico: Carolini Gremski Stabach
Supervisor do Estágio: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Orientadora do Estágio: Profa. Dra. Roberta Paulert

O presente TCC foi apresentado e aprovado pela seguinte banca examinadora:

Profa. Msc. Mabel Arantes

Profa. Msc. Poliana Graziela Schreiner

Profa. Dra. Roberta Paulert
Orientadora

Palotina, 07 de agosto de 2013.

“A cada passo um desafio,
A cada desafio uma vitória,
A cada vitória um novo passo rumo ao sucesso!”

Michele Bertolletti

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por toda proteção e oportunidades que surgiram e surgem na minha vida.

Aos meus pais Cláudio e Izabel Stabach por todo apoio, investimento e incentivo depositado em mim, e por nunca terem medido esforços para a realização dos meus objetivos.

Aos meus irmãos João Vitor e Débora Stabach pelos momentos de descontração e de acolhimento.

A minha avó Casemira Stabach por sempre ter me ajudado com suas orações.

Aos meus amigos, parceiros da faculdade, Fernanda Heloísa Simch, Fernanda Freitas de Oliveira, Jéssica Barazetti, Mariana Ludtke, Mariana Agustini, Luís Felipe Priester, Dalva Nojikoski, Guilherme Nunes, Allan Hoppe, por terem proporcionado momentos maravilhosos e ímpares na minha vida acadêmica.

À minhas amigas Ana Luiza Lorenzen e a Valéria Ramos, que mesmo do outro lado do estado sempre estiveram presentes, me proporcionando bem estar e forças em momentos necessários.

Aos demais amigos de Palotina que, de alguma maneira, fizeram parte dessa formação me apoiando, confortando, e proporcionando momentos de felicidade.

Ao professor Nelson Fernandes, por toda ajuda prestada no decorrer da minha graduação.

À Professora Roberta Paulert por ter aceitado conceder sua orientação e pela leitura e correção desse relatório.

Ao professor Emanuel Maltempi de Souza pela oportunidade de estágio, por sua orientação e pela confiança depositada em mim.

À Michelle Zibetti Tadra e, principalmente, à Sarah Sacks Thimote. Pela amizade e por toda a paciência que teve para transmitir seus conhecimentos para o desenvolvimento desse trabalho. Sua ajuda foi valiosíssima. Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.2. METAGENÔMICA	3
2.3. ENZIMAS	7
2.3.1. Lipases	8
2.3.1.1. Lipases na Indústria	9
3. OBJETIVOS	11
3.1. OBJETIVO GERAL	11
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	12
4.2. MICRORGANISMOS E VETOR	12
4.3. MEIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS E ENZIMAS	12
4.4. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA	13
4.5. AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A LIPASE	14
4.5.1. Visualização do DNA	15
4.5.2. Clivagem de DNA com Enzimas de Restrição	16
4.6. PREPARO DO VETOR	16
4.6.1. Clonagem do inserto em vetor plasmídeo	17
4.7. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	18
4.7.1. Coleta de Clones Transformantes	18
4.8. PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL	18
4.8.1. Análise do produto da <i>mini-prep</i>	19
4.8.2. Clivagem enzimática do vetor pET29a(+) contendo o inserto.	19
4.9. SEQUENCIAMENTO DO CLONE	20
4.9.1. Análise das sequências	21
4.10. EXPRESSÃO DA LIPASE RECOMBINANTE EM <i>E.coli</i>	21
4.10.1. Transformação das células competentes para teste de expressão.	21
4.10.2. Teste de indução a expressão gênica	22
4.11. OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	23
4.11.1. Variação de temperatura	23

4.12.	OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	23
4.12.1.	Variação de pH do tampão de lise	23
4.12.2.	Variação da concentração do sal e do tipo de sal do tampão de lise.....	23
4.12.3.	Adição de detergentes no tampão de lise.	23
4.12.4.	Variação da estirpe de <i>E. coli</i>	24
4.12.5.	Alterações na manipulação do <i>pellet</i>	24
4.13.	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	24
4.14.	IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.1.	AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA A LIPASE LIPBL1	26
5.2.	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL	27
5.3.	ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS	29
5.4.	TESTE DE EXPRESSÃO DA LIPASE RECOMBINANTE.....	30
5.5.	OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO	31
5.6.	OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO	31
5.7.	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA LIPBL1	35
5.8.	ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	36
5.9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
6.	CONCLUSÃO	40
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Purificação de DNA e construção de bibliotecas metagenômicas	6
FIGURA 2. Prospecção de bibliotecas metagenômicas através do método baseado na função ou do método baseado na sequência.....	7
FIGURA 3: Características do vetor pET29a(+) (Novagen)	17
FIGURA 4: Amplificação do gene codificador da lipase BL1 por PCR.....	26
FIGURA 5: Eletroforese em gel de agarose da restrição do produto da PCR e do vetor pET29a(+).....	27
FIGURA 6: Dois diferentes padrões de bandas resultantes da eletroforese em gel de agarose 1% do DNA plasmidial sem restrição.	28
FIGURA 7: Restrição do DNA plasmidial, contendo o inserto (gene da lipase), com as enzimas NcoI e BamHI.....	29
FIGURA 8: Alinhamento de aminoácidos da sequência da LipBL1 da Biblioteca Metagenômica e da sequência da LipBL1 no pET29a(+).	30
FIGURA 9: Resultado da análise da sequência de aminoácidos pelo programa blastP.....	30
FIGURA 10: Teste de expressão da lipase LipBL1.	31
FIGURA 11: Teste de solubilidade com diferentes temperaturas (30°C e 18°C).	32
FIGURA 12: Teste de solubilidade com diferentes pHs no tampão de amostra	32
FIGURA 13: Teste de solubilidade com diferentes concentrações de NaCl e com 100 mM de KCl no tampão de amostra.....	33
FIGURA 14: Teste de solubilidade com diferentes detergentes no tampão de amostra	33
FIGURA 15: Teste de solubilidade com expressão da proteína lipase pela E. coli Rosetta. ...	34
FIGURA 16: Teste de solubilidade com frações que sofreram congelamento antes ou depois da sonicação	35
FIGURA 17: Purificação da proteína lipase LipBL1	36
FIGURA 18: Teste da estirpe <i>E.coli</i> BL21 transformada expressando lipase em meio seletivo	37
FIGURA 19: Teste da estirpe <i>E.coli</i> Rosetta transformada expressando lipase em meio seletivo	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Iniciadores utilizados na amplificação do gene codificador de lipase.	14
TABELA 2: Composição do gel SDS-PAGE utilizado para análise de proteínas	22

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são utilizadas em processos biotecnológicos há várias décadas, porém a demanda atual por novas enzimas e moléculas bioativas para aplicação em diversos setores da indústria vem crescendo cada vez mais.

As enzimas lipolíticas estão atraindo enorme atenção por causa dos seus potenciais biotecnológicos (VAKHLU e KOUR, 2006). A maioria das lipases usadas nas indústrias são enzimas microbianas, de origem fúngica ou bacteriana. Por serem enzimas versáteis e amplamente utilizadas, a expectativa é que as lipases futuramente sejam muito importantes como catalisadores industriais, da mesma forma que são as proteases e as enzimas degradadoras de carboidratos (TREVISAN, 2004).

Microrganismos são fontes potenciais de enzimas utilizadas pela indústria e de vários outros produtos de interesse biotecnológico. O solo é um ambiente complexo que inclui uma série de micro-habitats e um dos maiores reservatórios de biodiversidade microbiana devido a sua heterogeneidade física, química, biológica, e condições ambientais descontínuas (TORSVIK E OVREAS, 2002; RAJENDHRAN E GUNASEKARAN, 2008; HANSEL *et al.*, 2008). Acontece que essa biodiversidade e o potencial biotecnológico a ela associada são pouco conhecidos, pois a maioria dos microrganismos não consegue se multiplicar nos meios de cultivos tradicionalmente usados em laboratório. Para superar os limites impostos pelos meios de cultivo, uma abordagem molecular, denominada metagenômica, vem sendo aplicada. A metagenômica permite o acesso direto ao DNA de uma comunidade bacteriana presente em um determinado ambiente (metagenoma) de modo independente de cultivo (FAORO, 2010).

Técnicas independentes de cultivo são uma alternativa aos métodos tradicionais de bioprospecção e envolvem a extração do DNA de amostras de um ambiente e sua clonagem em vetores para construir as chamadas bibliotecas metagenômicas. Essas bibliotecas podem ser analisadas para identificação de novos genes e vias metabólicas por comparação de sequências em banco de dados ou seleção de proteínas ou fármacos produzidos pelo hospedeiro (LORENZ e SCHLEPER, 2002). Dessa forma, cerca de 99% dos microrganismos não detectados no isolamento convencional, podem ter seus genomas analisados na procura por novas biomoléculas e na geração de conhecimento da ecologia microbiana (WOLFGANG *et al.*, 2004). Nesse trabalho foi selecionado um clone na biblioteca metagenômica de solo da Mata Atlântica que apresentou indícios de atividade de lipase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOTECNOLOGIA E MICROORGANISMOS

Nos últimos 50 anos, produtos derivados do metabolismo microbiano têm sido utilizados para fins médicos, industriais e agrícolas, tais como antibióticos, antifúngicos, antitumorais, probióticos, biopolímeros, enzimas das mais variadas classes, herbicidas, pesticidas, entre outros, sendo importantes tanto para pesquisas acadêmicas, como para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas (OLIVEIRA *et al.*; 2006).

Atualmente, o avanço da biologia molecular e da bioinformática possibilitou uma grande quantidade de informação a respeito dos microrganismos. Sabe-se que eles constituem a base da biotecnologia, fornecendo produtos biológicos e, mais recentemente, agem como fornecedores de material genético. Elsas *et al.* (1998), afirma que a fração microbiana consiste, indiscutivelmente, no maior celeiro de genes do planeta.

Apesar de grande, esse conhecimento limita-se a estudos com culturas puras, tradicionalmente isoladas e cultivadas. A descoberta de novas funções e produtos derivados de culturas puras diminuiu significativamente devido a uma alta taxa de reisolamento de espécies já conhecidas. A principal razão para o baixo número de novas espécies descritas é a necessidade de cultivo celular no processo de identificação dos microrganismos, o que na grande maioria das vezes não é possível devido às condições fornecidas pelo procedimento de cultivo (PACE *et al.*, 1986).

Uma nova mudança de paradigma aconteceu em 1985, com um grande avanço experimental baseado no trabalho pioneiro de Carl Woese, que demonstrou que os genes do RNA ribossomal (rRNA) poderiam ser utilizados como ferramentas de medida de divergência evolutiva (WOESE, 1987). A análise direta das sequências dos genes rRNA 5S e 16 S foi utilizada para a descrição da diversidade de microrganismos em uma amostra ambiental, sem isolamento ou cultivo (LANE *et al.*, 1985).

Dados estatísticos indicam que um grama de solo pode conter cerca de 10 bilhões de microrganismos compreendendo milhares de espécies diferentes. No entanto, apenas uma pequena parcela desses microrganismos é conhecida e podem ser cultivados pelos métodos tradicionais usados em laboratório, sendo que a grande maioria permanece desconhecida (TORSVISK *et al.*, 2002). Desse modo, os microrganismos presentes no ambiente se

tornaram os maiores fornecedores de diversidade genética para a Biotecnologia, criando uma fonte de novos genes e, conseqüentemente, novas enzimas e novos produtos. A perspectiva de uma vasta diversidade de microrganismos não-cultiváveis no solo estimulou o desenvolvimento de técnicas que permitissem o estudo dessas comunidades microbianas e do seu potencial biotecnológico independente de cultivo. Dentre essas, a metagenômica surgiu como o principal método de prospecção biotecnológica (FAORO, 2010).

2.2. METAGENÔMICA

O termo metagenômica foi primeiramente usado por Jo Handelsman (HANDELSMAN *et al.*, 1998) 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.

O método utiliza técnicas clássicas de biologia molecular (purificação de DNA, clonagem e transformação) e microbiologia (caracterização fisiológica), mas as combinações desses dois campos, à luz da vasta diversidade desconhecida, tornam ilimitadas as possibilidades para prospecção biotecnológica. Através da metagenômica é possível acessar um grande número de genes que codificam novas enzimas ou enzimas mais eficientes do ponto de vista biotecnológico. Operons de genes que codificam para uma via metabólica completa também podem ser recuperados por essa técnica e usados na produção de moléculas do metabolismo secundário (DANIEL, 2004).

A partir da tecnologia de metagenômica e da enorme diversidade microbiológica disponível, é possível que um gene antes desconhecido, pertencente a um microrganismo não cultivável, encontrado em solo brasileiro, capaz de codificar uma importante hidrolase, seja inserido em uma bactéria como *Escherichia coli* e o clone resultante cultivado para a produção industrial de uma nova enzima. A enzima e o gene obtidos a partir da metagenômica podem ser patenteados e a tecnologia desenvolvida pode ser transferida para o setor produtivo (SHORT, 2004).

A técnica de metagenômica consiste basicamente na purificação e clonagem de DNA de amostras ambientais (Figura 1) seguido de prospecção por novos genes (Figura 2). Vários protocolos já foram descritos para a purificação de DNA do solo (TORSVIK, 1980; OGRAM, SAYLER e BARKAY, 1987; ZHOU, BRUNS e TIEDJE, 1996; HURT *et al.*, 2001; LILES *et*

al, 2008). No entanto, as metodologias podem ser divididas entre método direto e método indireto (DANIEL, 2005).

A purificação de DNA pelo método direto é realizada com toda a matriz do solo. Geralmente, esse método envolve um passo de lise mecânica na qual o solo é misturado com esferas de sílica e submetido à intensa agitação. O objetivo dessa etapa é desfazer os agregados de solo, liberar o máximo possível de células em solução e também auxiliar na fragmentação da parede celular de bactérias resistentes à lise química. No método indireto de purificação de DNA as amostras de solo são submetidas a vários ciclos de lavagem e centrifugação com o objetivo de separar as células bacterianas da matriz do solo (FAORO, 2010).

Após se obter a suspensão de células, a purificação de DNA prossegue como uma purificação de DNA genômico tipicamente usada em culturas puras. Em seguida, os fragmentos de DNA extraídos são selecionados e unidos a outros fragmentos de DNA, denominados vetores de clonagem, formando uma molécula de DNA, com capacidade independente de replicação, denominada DNA recombinante, e finalmente, essas moléculas de DNA são transformadas em uma bactéria hospedeira cultivável em laboratório, originando uma coleção de clones denominada biblioteca metagenômica.

Uma biblioteca genômica é o conjunto de clones recombinantes que representam todo o DNA genômico de um organismo individual. Já na biblioteca metagenômica, o conjunto de clones recombinantes contém parte do DNA presente em determinado ambiente ou amostra, não sendo possível garantir que todo o DNA de todas as espécies estejam presentes na biblioteca. O objetivo da metagenômica é a obtenção de um número suficiente de clones para a identificação de genes que codifiquem enzimas que possuam uma atividade desejada. Essa abordagem pode ser utilizada, inclusive, para a obtenção de uma via metabólica inteira. Bibliotecas metagenômicas podem ser multiplicadas e mantidas por muitos anos (BROWN, 2003).

A análise, ou prospecção, de bibliotecas metagenômicas pode ser feita através de dois métodos: o método baseado na função e o método baseado na sequência (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003) (FIGURA 2). O método baseado na função identifica clones que expressam uma enzima ou uma via metabólica desejada (RONDON *et al*, 2000; VOGET *et al*, 2003; JEONG *et al*, 2009a). A identificação do fenótipo é realizada em meio de cultivo sólido contendo um substrato seletivo para a função de interesse (meio contendo amido para detecção de amilases, por exemplo). Clones que estejam expressando a enzima formam um halo de hidrólise em volta da colônia. Outro modo de realizar a prospecção funcional é

através da adição de indicadores de pH no meio seletivo. Nesse caso, o produto de interesse é detectado através da mudança de pH em volta da colônia.

O método baseado na sequência faz uso de regiões conservadas do DNA para se desenhar sondas de hibridização ou oligonucleotídeos iniciadores para reações de PCR e, dessa forma, identificar clones que possuam os genes de interesse. Outra abordagem utilizada é o sequenciamento das extremidades dos insertos de DNA clonados ou mesmo o sequenciamento de todo o DNA metagenômico de uma determinada amostra (VENTER *et al.*, 2004; SCHLÜTER *et al.*, 2008; MORIMOTO e FUJII, 2009). Por essa metodologia, a identificação é realizada por comparação das sequências obtidas com os bancos de dados virtuais internacionais. Ou seja, a metagenômica não é utilizada apenas para identificar um gene funcional, também tem sido utilizada para estimar a diversidade microbiana, entender a dinâmica populacional de uma comunidade ou obter o genoma completo de um organismo não cultivável (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2008).

Baseadas nessas técnicas descritas, várias bibliotecas metagenômicas foram construídas a partir dos mais distintos tipos de amostras, como solo (RONDON *et al.*, 2000), água (ELEND *et al.*, 2006), biofilmes (SCHMEISSER *et al.*, 2003), rumem bovino (FERRER *et al.*, 2005b), boca humana (DIAZ-TORRES *et al.*, 2003), intestino de cupim (WARNECKE *et al.*, 2007), entre outros, tendo-se como principal objetivo o isolamento de novas enzimas.

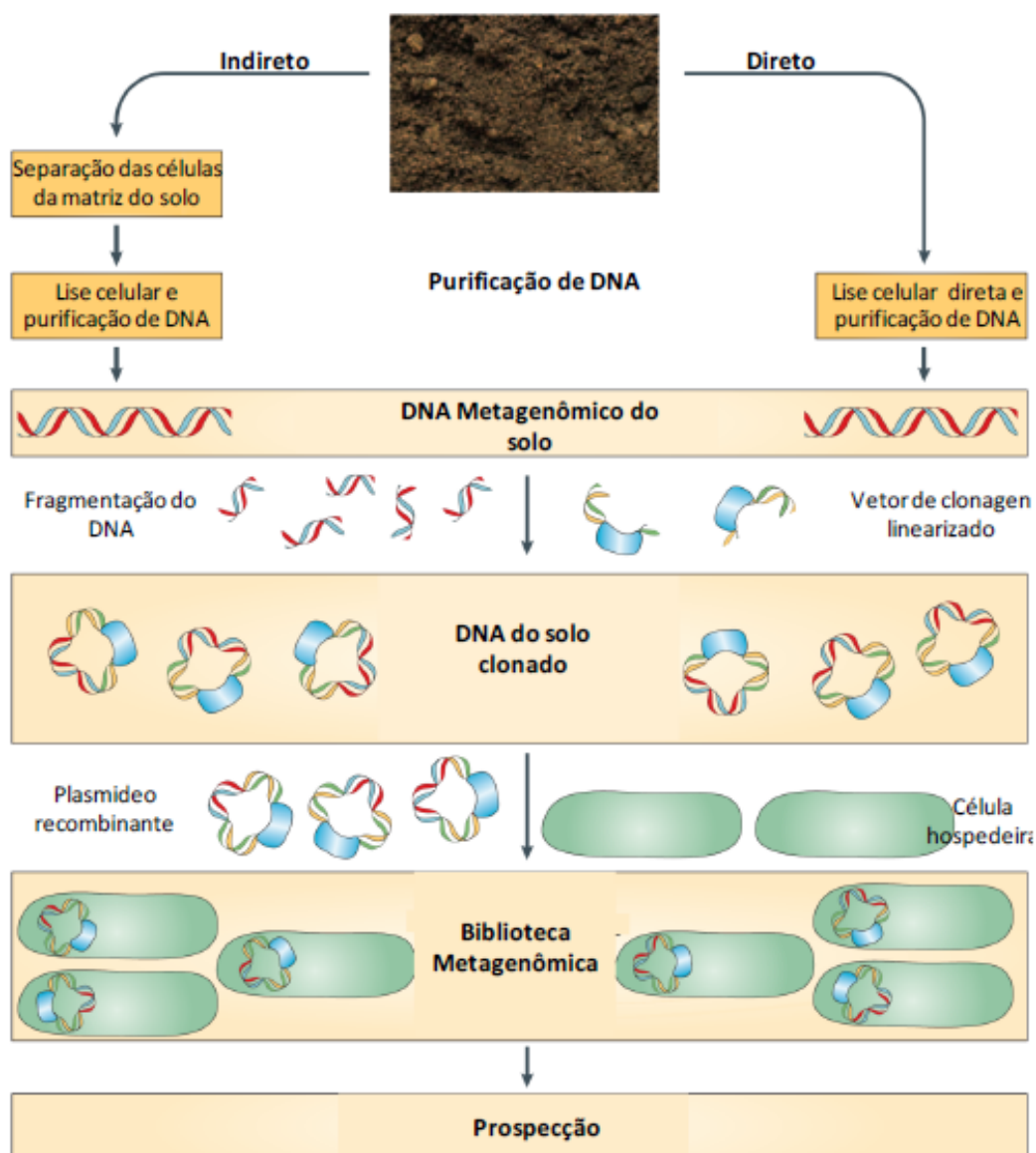


FIGURA 1: Purificação de DNA e construção de bibliotecas metagenômicas. Fluxograma mostrando as principais etapas para a construção de bibliotecas metagenômicas a partir de amostras de solo. A purificação do DNA pode ser realizada pelo método indireto, através da separação das células da matriz do solo, ou pelo método direto. O DNA purificado é fragmentado, ligado em um vetor linearizado e transformado em uma estirpe hospedeira originando a biblioteca. Diferentes estratégias de prospecção podem ser aplicadas para identificação de clones de interesse. FONTE: Adaptado de DANIEL, 2005.

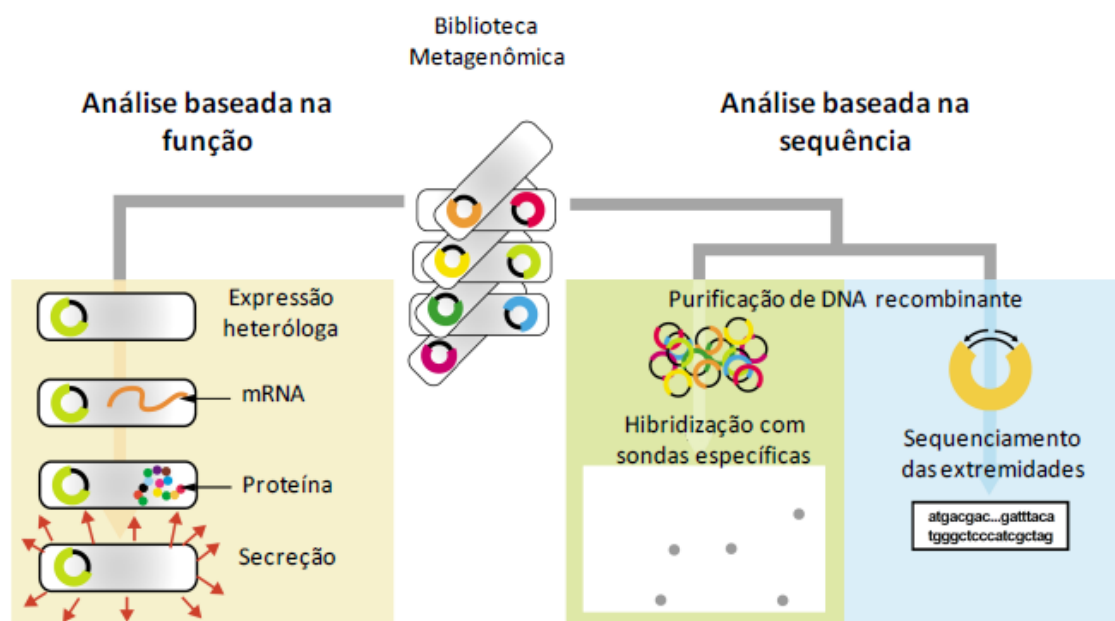


FIGURA 2. Prospecção de bibliotecas metagenômicas através do método baseado na função ou do método baseado na sequência. FONTE: Adaptado de FAORO, 2010.

2.3. ENZIMAS

As enzimas são biocatalizadores capazes de interagir com uma variedade de moléculas complexas e substratos, aumentando a velocidade de reações químicas, sem que sejam consumidas durante a reação.

O mercado global de enzimas é estimado em 2,3 bilhões de dólares por ano divididos em detergentes (U\$789 milhões), aplicações na indústria alimentícia (U\$634 milhões), agricultura (U\$376 milhões), processamento têxtil (U\$237 milhões) e aplicações em papel e couro e produção de reagentes químicos (U\$ 222 milhões) (LORENZ e ECK, 2005).

A maioria das enzimas relevantes para a indústria é de origem microbiana, por isso a procura por novas enzimas é um ponto importante para o desenvolvimento dos bioprocessos industriais (UCHIYAMA e MIYAZAKI, 2009). As enzimas mais utilizadas na indústria são hidrolases, enzimas que catalisam a quebra de polímeros utilizando a água. Amilases, celulases, proteases, esterases e lipases estão entre as classes de hidrolases mais investigadas.

2.3.1. Lipases

As lipases são enzimas que possuem atividade hidrolítica sobre substratos de origem lipídica, apresentando classificação baseada em seu modo de ação, tipo de substrato sobre o qual atua ou na similaridade de sequência. De acordo com o seu modo de ação e tipo de substrato estas enzimas são classificadas como: esterases, lipases verdadeiras ou fosfolipases.

As fosfolipases possuem especificidade de ligação com fosfoglicerídeos, hidrolisando um grupo acila dos mesmos. Estas enzimas são classificadas como fosfolipase A, C e D dependendo do seu modo de ação (WHITE *et al.*, 1976). A fosfolipase A remove um dos dois ácidos graxos constituintes das moléculas de fosfolipídios, produzindo um lisofosfolipídio e o segundo ácido graxo é removido então pela lisofosfolipase (VIEIRA, 2003). A retirada da cabeça polar através do rompimento das ligações fosfodiester e feita pela fosfolipase C e D.

As esterases e lipases verdadeiras pertencem à classe das carboxil-ester-hidrolases que catalisam a hidrólise ou formação de ligações éster (JEONG *et al.*, 2009b). As esterases hidrolisam estas ligações de acil-esteres de cadeia curta, solúveis ou emulsificados, enquanto as lipases atuam sobre triacilglicerídeos de cadeias longas (ARPIGNY e JAEGER, 1999). Além da atividade hidrolítica sobre ligação ester-carboxílicas as lipases também catalisam reações de esterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (CORREIA, 2010).

Outra característica que difere a maioria das lipase das esterases é o fenômeno de ativação interfacial, que se refere ao intenso aumento na atividade da enzima na interface lipídio-água de substratos emulsificados ou micelares, disparado por um rearranjo estrutural do sítio ativo. Na ausência da interface, o sítio ativo apolar da enzima esta coberto por uma tampa e a enzima está na conformação fechada. Já na presença de substâncias hidrofóbicas, a tampa é deslocada, expondo uma grande superfície hidrofóbica e tornando os resíduos catalíticos acessíveis ao substrato (conformação aberta) (VERGER, 1997). No entanto, nem todas as lipases apresentam ativação interfacial, permanecendo a primeira definição como a mais abrangente.

O conhecimento da estrutura de lipases e esterases tem aumentado consideravelmente nos últimos anos através da elucidação de muitas sequências gênicas. A classificação deste grande conjunto de dados e identificação das famílias e subfamílias de enzimas lipolíticas tem sido feitos a fim de identificar as sequências de motivos conservados em enzimas lipolíticas provenientes de uma ampla variedade de organismos, e relacioná-las a elementos estruturais

de três dimensões envolvidos no reconhecimento do substrato e catálise, sendo essencial para a compreensão da função de enzimas lipolíticas (ARPIGNY e JAEGER, 1999).

A lipase selecionada neste trabalho apresenta algumas características físico-químicas teóricas que foram analisadas segundo as ferramentas da bioinformática. A massa molar esperada dessa proteína é de 42413,4 KDa, deve apresentar um número de 373 aminoácidos e o ponto isoelétrico de 8,2.

2.3.1.1.Lipases na Indústria

Prévios estudos têm demonstrado que a análise metagenômica oferece uma combinação quase ilimitada para encontrar novos genes codificadores de produtos gênicos relevantes como lipases e esterases (HENNE *et al.*, 2000; CIESLINSKI *et al.*, 2009; COUTO *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2010). Por exemplo, nos últimos dez anos vários genes codificadores de enzimas lipolíticas puderam ser identificados em bibliotecas metagenômicas advindas de várias amostras ambientais como o solo (HENNE *et al.*, 2000; RONDON *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2004), água de lagoa e lago (REES *et al.*, 2003; RAJAN *et al.*, 2005), de mar (CHU *et al.*, 2008), sedimento de manguezais (COUTO *et al.*, 2010), e campos termais (RHEE *et al.*, 2005).

Estas enzimas apresentam uma extensa lista de possibilidades de aplicações industriais destacando-se o seu potencial de utilização em etapas de produção de biodiesel a partir de óleos vegetais e na biorremediação de rejeitos industriais de origem lipídica (JEONG *et al.*, 2009b; NOUREDDINI *et al.*, 2005).

A indústria farmacêutica também faz uso de lipases microbianas, neste caso visando a obtenção de produtos com níveis aumentados de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) a partir de óleos vegetais ou animais (CARVALHO *et al.*, 2003), além da sua aplicação na fabricação de cosméticos (JEONG *et al.*, 2009b). Em muitos processos em indústrias alimentícias, as lipases são utilizadas na fabricação de novos óleos e gorduras, visando alteração de propriedades físicas ou até mesmo do aspecto nutricional (VILLENEUVE, 2003). As lipases também são utilizadas na indústria coureira no processo de remoção da gordura e dos pelos que estão no couro. Além do uso na formulação de detergentes (PRAZERES *et al.*, 2006).

A maioria das lipases produzidas para fins comerciais são provenientes de microrganismos, principalmente as isoladas de origem bacteriana como *Bacillus*,

Pseudomonas e *Burkholderia*. As diferentes aplicações industriais destas enzimas advêm de suas características cinéticas distintas, as lipases caracterizam-se por apresentarem atividade em amplo intervalo de pH, 3 a 11, e temperatura de 30 a 60°C (GUPTA *et al*, 2004). A mudança conformacional da estrutura da enzima durante a catálise permite a hidrólise do substrato insolúvel em água e a adsorção na interface óleo/água (ARPIGNY e JAEGGER, 1999). Características como a estabilidade a solventes orgânicos, a não exigência de cofatores e ainda especificidade ao substrato fazem das lipases, enzimas com um grande potencial biotecnológico (ROH e VILLATTE, 2008).

De modo geral, as lipases apresentam diversas aplicações com alto ganho nos processos biotecnológicos, maior eficiência, com conseqüentemente redução de gastos, menor necessidade de utilização de produtos químicos perigosos, o que gera vantagens ao meio ambiente. No entanto, o mercado mundial de enzimas ainda demanda lipases termoestáveis, por sua maior estabilidade, maior eficiência, e por ser uma condição que favorece a solubilização dos substratos (HASAN *et al*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é expressar, purificar e avaliar a atividade enzimática de uma lipase recombinante proveniente de uma biblioteca metagenômica do solo da Mata Atlântica Paranaense.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar e clonar o gene de uma enzima lipase denominada LipBL1;
- Expressar a enzima lipase LipBL1 em *Escherichia coli*;
- Testar procedimentos para aumentar a solubilidade da proteína;
- Purificar a lipase recombinante;
- Analisar a atividade enzimática da lipase recombinante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio foi realizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná situado na cidade de Curitiba no estado do Paraná, que possui mais de 40 anos de experiência em Bioquímica de Microrganismos e Biologia Molecular.

Esse departamento abrange várias linhas de pesquisa, mas têm como destaque a de fixação biológica de nitrogênio. Há cerca de cinco anos, iniciou-se também uma linha de pesquisa em metagenômica e em transcriptômica.

Vários laboratórios integrados constituem o departamento e dão espaço a estagiários, mestrandos, doutorandos, e pós-doutorandos, para realizarem o desenvolvimento de suas pesquisas, com o auxílio de professores doutores renomados.

4.2. MICRORGANISMOS E VETOR

O vetor pET29a (vetor de expressão de proteínas com cauda de histidina e promotor T7, Novagen) e as estirpes hospedeiras de *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen), BL21 λ DE3 e Rosetta (Novagen) foram utilizados para clonagem e expressão do gene codificador da enzima de interesse.

4.3. MEIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS E ENZIMAS

Os meios de cultivo utilizados para a multiplicação das estirpes de *E. coli* foram o meio Luria Bertani (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L e ágar 15 g/L) e meio LA – Tributirina 1% (Extrato de levedura 3g/L, peptona 5g/L, ágar 25 g/L, goma arábica, 10 g/L, tributirina 10 ml/L), segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) e esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos.

Os antibióticos utilizados para multiplicação, manutenção e seleção das estirpes de *E. coli* e do plasmídeo utilizado foram estreptomomicina 80 μ g/mL (Sm80) e canamicina 100 μ g/mL (Km100).

Enzimas de restrição e modificadoras de DNA, RNase, tampões e sais utilizados para preparar as soluções utilizadas na manipulação do DNA foram todas de alto grau de pureza (grau biologia molecular) obtidas de diferentes fornecedores.

4.4. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA

O DNA que codifica a enzima desse trabalho foi proveniente de dois trabalhos anteriores desenvolvidos no grupo de pesquisa de Metagenômica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, descritos por Faoro e colaboradores (2011) e Glogauer e colaboradores (2011). A purificação de DNA total das amostras ambientais foi realizada utilizando o kit Power Max soil DNA (MoBIO). A purificação de DNA dos clones fosmidiais foi realizada pelo método da lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989) em placas de 96 amostras. Após a purificação o DNA fosmidial foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliação da integridade e quantidade do material. Em seguida, o DNA fosmidial dos clones a serem sequenciados foram unidos em quantidades semelhantes em uma única alíquota e tratados com as nucleases ExoIII e S1Nase para remoção de DNA linear proveniente do genoma da bactéria hospedeira (*Escherichia coli* EPI300 – EPICENTRE) por 1 hora a 37°C. Por fim, o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, seco a temperatura ambiente e ressuspensão em 300 µl de água ultrapura. O DNA resultante desse tratamento foi utilizado para a construção da biblioteca para sequenciamento na plataforma SOLiD, seguindo as recomendações do fabricante (AppliedBiosystems-Life Technology). Para sequenciamento da biblioteca de fragmentos foi utilizado o kit *SOLiD™ Fragment Library Sequencing* para 50 pares de bases em um tempo aproximando de 8 dias. Em seguida realizaram-se as montagens das sequências de DNA e, posteriormente, a identificação de fases de leitura aberta (Open Reading Frames ou ORFs), a partir dos contigs reconstruídos. As sequências de DNA das ORFs identificadas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa BLASTx. Sequências de aminoácidos foram comparadas utilizando-se o programa BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997). Dentre essas sequências comparadas, foi selecionado um gene que tinha potencial para codificar uma lipase.

4.5.AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A LIPASE

A partir da sequência de nucleotídeos da enzima identificada na etapa anterior, foram construídos iniciadores específicos a serem utilizados para a amplificação do gene de interesse por PCR (Polymerase Chain Reaction). Esses iniciadores foram desenhados utilizando o programa *PrimeSelect* disponível no pacote de programas *LaserGene* (DNASTAR, Madison, WI, USA). As sequências dos iniciadores construídos são apresentadas na Tabela 1. Nos iniciadores foram inseridos sítios para enzimas de restrição com o objetivo de facilitar a clonagem do gene amplificado em um vetor de expressão.

TABELA 1: Iniciadores utilizados na amplificação do gene codificador de lipase.

Gene	Iniciador	Sequência	Vetor	Sítio de restrição	Cauda His
Lipase	LipBL1 For	5' CAA CGT TTA CCA TGG AAC AGA TAA GC	pET29a(+)	NcoI	C-ter
LipBL1	LipBL1 Ver	5' CTG CTA ATT TTA GGA TCC GAG GT	pET29a(+)	BamHI	C-ter

O gene codificador de lipase foi amplificado por PCR em termociclador *Eppendorf Master Cycler Gradiente*, adotando as seguintes condições:

Para um volume de 10 µL de reação:

Reagente	Volume
• Tampão de reação (Tris-HCl pH 8,4 e KCl 500 mM) concentrado 10X	1 µL
• DNTPs	1,6 µL
• MgCl ₂	0,6 µL
• Iniciador <i>foward</i> (10 pM)	0,2µL
• Iniciador <i>reverse</i> (10 pM)	0,2 µL
• Taq DNA polimerase de alta fidelidade Platinum™ <i>Pfx</i>	0,1 µL
• DNA molde 100% (pool de DNA)	1 µL
• Água ultrapura	5,3 µL

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes temperaturas:

• Inicial	95°C	5 minuto
• Desnaturação	95 °C	15 segundos
• Anelamento	62 °C	30 segundos
• Extensão	72 ° C	90 segundos
• Final	4 °C	∞

Este ciclo foi repetido 35 vezes.

4.5.1. Visualização do DNA

Para visualização e análise de DNA foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose elaborado na concentração de 1% (m/v). A solução TAE 1X (40 mM Tris-acetato e 1 mM de EDTA) foi utilizada para dissolver a agarose, bem como o tampão de corrida.

Após homogeneização da amostra (3 µL) com a solução corante FSUDS (3 µL, conforme descrito abaixo), esta foi aplicada no gel e este submetido a 70 V por 80 minutos. A corrida foi acompanhada pela migração do azul de bromofenol contido na solução corante da amostra. Após isso, o gel foi incubado com brometo de etídeo 0,002%, e visualizado sob luz UVB (302 nm) em um transluminador 3UV™ Transilluminator (UVP Corp).

Foi aplicado no primeiro poço do gel, o marcador de peso molecular de DNA (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas).

Composição do corante FSUDS:

• Bromofenol 2%	0,5 mL
• Ficol (0,5 g em Tris 10 mM – 1,25 g (2,5 mL)	1 mL
• SDS 10%	1,35 mL
• EDTA 0,5 M pH 8,0	45 µL
• TrisHCl 1M pH 8,0	812,5 µL
• Xileno Cianol	0,05 g

Dissolução em água milli-Q até completar 12,5 mL.

4.5.2. Clivagem de DNA com Enzimas de Restrição

O DNA foi digerido com as enzimas de restrição do sítio mutagênico inserido. A primeira restrição ocorreu com a enzima NcoI em um sistema de 20 μL :

- | | |
|-------------------|-------------------|
| • Tampão (tango) | 2 μL |
| • DNA amplificado | 10 μL |
| • Enzima NcoI | 0,2 μL |
| • Água Milli-Q | 7,8 μL |

O sistema foi incubado em estufa, a 37 °C *overnight*. Posteriormente realizou-se a precipitação do DNA. Esta reação ocorreu completando o volume da restrição com NcoI, para 100 μL com água Milli-Q e 50 μL de fenol-clorofórmio álcool isoamílico. O sistema foi centrifugado por 5 minutos a 11.337 xg (13000 rpm em mini centrífuga *Mini Spin Eppendorf*), recuperando a fase aquosa em um novo tubo. Adicionou-se etanol absoluto em um volume de três vezes e centrifugou-se novamente por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e prosseguiu-se com adição de 500 μL de etanol 70% e nova centrifugação por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* secou a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 30 μL de água Milli-Q.

Uma nova restrição foi realizada com os mesmos reagentes e volumes citados acima, porém, com alteração da enzima para BamHI. O DNA que sofre restrição foi analisados por eletroforese em gel de agarose, de maneira idêntica a descrita acima no item 4.5.1.

4.6. PREPARO DO VETOR

O vetor escolhido para a expressão da proteína recombinante em *E.coli*, foi o pET-29a(+) (Novagen), que confere resistência ao antibiótico canamicina (pET SYSTEM MANUAL, 2002). Tal vetor possui 5.371 pares de base (Figura 3), e é fornecido pronto para uso. O DNA foi clonado no sítio múltiplo de clonagem. Portanto, previamente à reação de ligação, o vetor pET29a(+) foi digerido com as enzimas NcoI e BamHI, nos volumes: 5 μL do tampão tango (Fermentas) para as duas enzimas, 0,5 μL de enzima, 10 μL do pET29 e 34,5 μL de água milli-Q.

4.6.1. Clonagem do inserto em vetor plasmídeo

A reação de ligação foi realizada em um sistema de 15 μL :

pET 29a(+) (30 ng/ μL)	3 μL
DNA com restrição (inserto)	5 μL
T4 DNA ligase (Fermentas)	1 μL
Tampão (Fermentas)	1,5 μL
Água Milli-Q	4,5 μL

A reação foi incubada a temperatura de 4°C por 24 horas. Após a incubação, a solução foi utilizada para a transformação de células competentes de *Escherichia coli*.

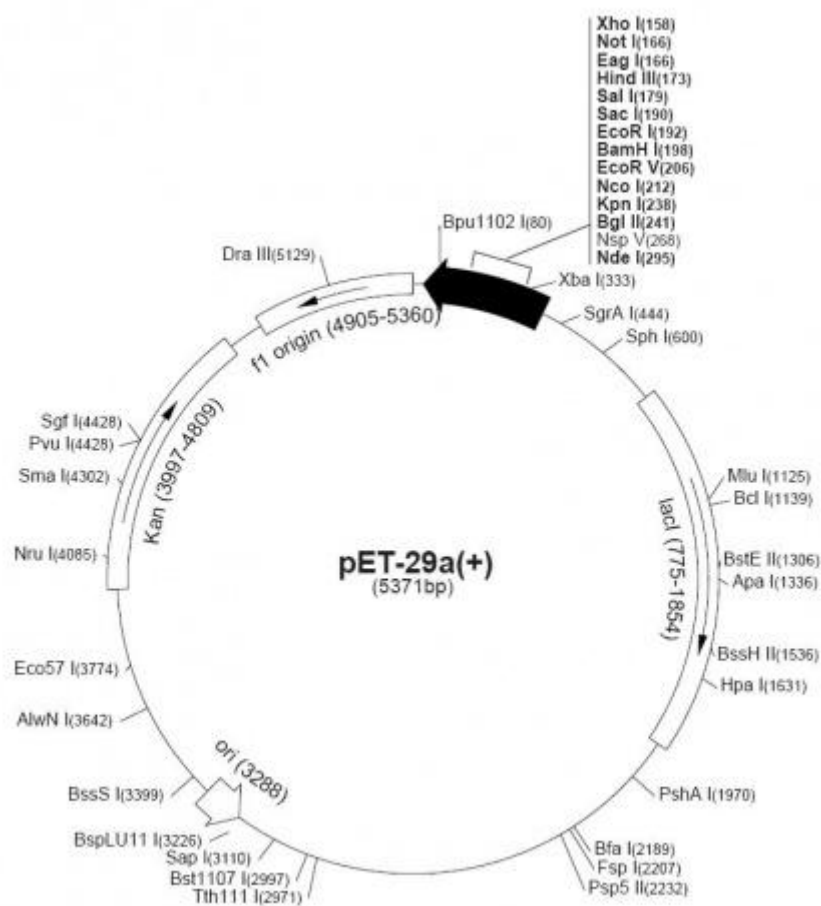


FIGURA 3: Esquema ilustrativo das características do vetor pET29a(+) (Novagen). FONTE: <http://www.synthesisgene.com/vector/pET-29a.pdf>

4.7. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

A transformação bacteriana foi feita utilizando-se células termocompetentes. Para isso, um pré-inóculo de 5 mL da célula *Escherichia coli*, estirpe TOP 10, foi crescido sob agitação por aproximadamente 16 horas em meio líquido LB, na presença do antibiótico Sm (80 µg/mL).

Um inóculo foi feito na proporção 1:100 em 5 mL de LB e crescidos até uma DO_{600} entre 0,2 e 0,5. A cultura foi mantida por 10 minutos no gelo e alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 11337 xg (13.000 rpm) durante 60 segundos. As células foram ressuspensas em 100 µL de solução TSS (CHUNG; NIEMELA; MILLER, 1989). Para a transformação, 10µL da ligação foram adicionados a 100 µL de células termocompetentes e incubadas em gelo por 30 minutos. Um choque térmico de 30 segundos a 42°C foi feito seguido de incubação em gelo por 2 minutos. As células foram recuperadas em meio LB à 37°C, durante 1 hora.

Posteriormente, estas células foram plaqueadas em meio sólido LA contendo o antibiótico canamicina (100 µg/mL).

4.7.1. Coleta de Clones Transformantes

As colônias transformantes (as crescidas na placa) foram coletadas aleatoriamente com o auxílio de palitos de madeira estéreis e inoculadas em meio LB contendo canamicina (100 µg/mL).

4.8. PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

O isolamento do DNA plasmidial foi feito segundo o método de lise alcalina descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Uma alíquota de 1,5 mL de uma cultura de células crescidas por aproximadamente 16 horas foram centrifugados durante 1 minuto a 11.337 g (13000 rpm). O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspendido, utilizando o vórtex, em 150 µL de tampão GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl pH 8,0 25 mmol/L). A solução foi centrifugada novamente na mesma condição e mais 150 µL de tampão GET foi adicionado. Prosseguiu com adição de 1 µL de ribonuclease A (Sigma). A lise foi realizada adicionando-se 150 µL de uma solução contendo NaOH 0,18

mol/L + SDS 1 %. Essa mistura foi homogeneizada suavemente por inversão e incubada por 1 minuto a temperatura ambiente. O DNA cromossomal, proteínas e o SDS foram precipitados pela adição de 150 µL de acetato de potássio 3 mol/L. Essa mistura foi homogeneizada por inversão e mantida por 5 minutos em banho de gelo. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 11337 g (13000 rpm). A essa solução foi adicionado 100 µL da mistura clorofórmio:álcoolisoamílico (24:1). A mistura resultante foi agitada para homogeneização e centrifugada por 5 minutos a 11337 g. O sobrenadante contendo o plasmídeo foi separado em outro tubo, descartando-se o precipitado. Após coleta da fase aquosa, foi misturado 3 volumes de etanol absoluto. Novamente centrifugou-se a 11337 xg (13000 rpm) por 5 minutos, e posteriormente, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seco em estufa 37°C e dissolvido em 30 µL de água milli-Q e armazenado no freezer a -20°C.

4.8.1. Análise do produto da *mini-prep*

Para a análise da qualidade do produto da *mini-prep*, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito no item 4.5.1.

4.8.2. Clivagem enzimática do vetor pET29a(+) contendo o inserto.

O produto da *mini-prep*, ou seja, o vetor pET contendo o inserto correspondente à proteína Lip BL1 com os sítios de restrição, foi clivado com as enzimas NcoI e BamHI. Desta forma, em tubos para microcentrífuga de 1,5 mL foram adicionados 5 µL de amostra (pET com inserto da proteína contendo os sítios de restrição), 0,5 µL da enzima NcoI (10 U/µL) (Fermentas), 2 µL de tampão Tango 10X concentrado (Fermentas 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL BSA) e 12,5 µL de água Milli-Q para um volume final de 20 µL. A reação foi brevemente centrifugada e incubada em estufa a 37°C *overnight*.

Seguiu-se com o protocolo de precipitação de DNA, descrito no item 4.5.2 para posterior restrição com a enzima BamH I (10 U/µL) nas mesmas condições. Para confirmar a digestão foi realizada uma eletroforese preparativa em gel de agarose 1% como descrito no item 4.5.1.

4.9. SEQUENCIAMENTO DO CLONE

As reações de PCR para seqüenciamento dos fragmentos de DNA clonados em vetor pET29a(+), foram realizadas nas seguintes condições:

• BigDye Terminator (Applied Biosystems)	1,0 µL
• Primer T7 10 pmoles	0,5 µL
• Tampão Save money (Applied Biosystems)	3,0 µL
• DNA	3,0 µL
• Água milli-Q	2,5 µL

Composição do tampão Save Money:

• Tris-HCl pH 9.0, 1 M	2 mL
• MgCl ₂ 50 Mm	1 mL
• Água milli-Q	Completar para 10 mL

Foram feitas reações individuais para cada primer utilizado. As misturas foram levadas ao termociclador, sendo submetidas ao seguinte programa:

• Inicial	96°C	1 minuto
• Desnaturação	96 °C	15 segundos
• Anelamento	60 °C	15 segundos
• Extensão	60 ° C	4 segundos
• Final	4 °C	∞

Após a reação, os fragmentos de DNA amplificados foram precipitados, e os dNTPs marcados por fluorescência que não foram incorporados, foram retirados por sucessivas lavagens.

Para precipitação do DNA amplificado, marcado pela PCR de seqüenciamento, adicionou-se 2 µL de acetato de amônio 7,5 M, 10 µL de água milli-Q estéril e 66 µL de etanol absoluto. Centrifugou-se a mistura por 45 minutos a 11337 xg (13.000 rpm). Retirou-se o sobrenadante e adicionou 100 µL de etanol 70% (v/v), voltando a centrifuga por mais 15 minutos na mesma rotação. Após, descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar a temperatura ambiente.

Para aplicação no seqüenciador, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de Hi.Diformamida (ABI Prism), submetidas a desnaturação por 5 minutos, a 96 °C. O seqüenciamento foi realizado em um aparelho capilar modelo ABI 3500 DNA Analyzer (AppliedBiosystems).

4.9.1. Análise das sequências

Após o seqüenciamento, os eletroferogramas foram analisados usando-se o programa Phred/Phrap (EWING et al., 1998), onde relatórios de qualidade das sequências foram gerados e alinhados. O programa Consed (GORDON et al., 1998) foi utilizado para visualizar a reunião das sequências.

As sequências obtidas nos equipamentos foram alinhadas no programa ClustalW2 (CHENNA et al., 2003), para reconstrução do inserto original contido na biblioteca metagenômica (FAORO, 2011).

A sequência consenso, estendida, denominada “contig” foi comparada ao banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Para analisar as sequências de nucleotídeos, foram utilizadas no programa as ferramentas blastX, disponível no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> que compara sequências de nucleotídeos traduzidas com o banco de dados de aminoácidos do GenBank. Por outro lado, para analisar as sequências de aminoácidos, foi utilizada a ferramenta blastP, que compara sequência de aminoácidos com o banco de dados de aminoácidos do GenBank. Foi utilizada na análise das sequências de aminoácidos do gene da lipase. Outras análises utilizaram os programas disponíveis no site web.expasy.org/protparam/ (GASTEIGER et al., 2005) determina algumas características físico-químicas para a sequência de aminoácidos da proteína. TMHMM Server v 2.0 disponível no site www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ avalia a presença de hélices transmembrana na proteína.

4.10. EXPRESSÃO DA LIPASE RECOMBINANTE EM *E.coli*

4.10.1. Transformação das células competentes para teste de expressão.

A transformação de maneira similar ao item 4.7. com algumas alterações. Adicionou-se 10µL do plasmídeo integro em 100 µL de células da estirpe BL21 (λDE3) (Stratagene)

4.10.2. Teste de indução a expressão gênica.

Algumas colônias de *E. coli* crescidas em meio LA foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de meio LB na presença do antibiótico canamicina (Km 100µg/mL), a cultura foi incubada sob agitação por cerca de 16 horas, a 180 rpm. Cinquenta microlitros do pré-inóculo foram utilizados para preparar o inoculo utilizado para verificação da expressão. As bactérias foram multiplicadas a 37 °C, 180 rpm até atingir OD₆₀₀ de 0,5 e, a estas adicionou-se 0,5 mM de isopropil-β-tiogalactosídeo (IPTG). Decorridos os tempos de 1, 2, 3 e 5 horas de indução, retirou-se alíquotas de 1,5 mL que foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado. As células foram lisadas por sonicação (3 vezes com intervalos de 10 segundos) em tampão de lise (tampão de mastra) (Tris HCl 20 mM e NaCl 100 mM, pH 8,1) em um volume de 200 µL. Recolheu alíquotas do extrato bruto, solúvel e do precipitado. O mesmo procedimento foi feito com a estirpe sem inserto, como um controle. A expressão da proteína de interesse foi verificada em gel SDS-PAGE. A composição do gel utilizado é apresentada na Tabela 2. Para a aplicação no gel, as amostras de proteína foram misturadas com tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 100 mM, glicerol 20% (m/v), SDS 4% (m/v), azul de bromotimol 0,2% (m/v) e DTT 200 mM) na proporção 1:1 e aquecidas a 100°C por 5 minutos. As eletroforeses foram conduzidas a 170 V durante 50-60 minutos em tampão de corrida (Tris-base 25 mM, glicina 250 mM e SDS 0,1%). Depois de finalizada a corrida, o gel foi corado em solução Coomassie Blue R-250 2,5% durante 25 minutos. Em seguida, o gel foi lavado em água ultrapura e descorado em solução descorante (água/metanol/ácido acético nas concentrações 4,5/4,5/1,0 % v/v) por 20 minutos.

TABELA 2: Composição do gel SDS-PAGE utilizado para análise de proteínas

Componente	Gel de empilhamento	Gel de separação
• Tris-HCl pH 6,5 0,5M	1,3 mL	-
• Tris-HCl pH 8,8 1,5M	-	2,5 MI
• SDS 10%	50 µL	100 µL
• Acrilamida 40%	487,5 µL	3 mL
• APS 10%	25 µL	50 µL
• TEMED	10 µL	10 µL
• Água ultrapura	3,162 mL	4,35 MI

4.11. OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Foi determinada uma condição diferente de expressão para a obtenção de maior rendimento da proteína, na forma solúvel, após a lise das células bacterianas. O procedimento realizado foi igual ao descrito no item anterior, variando o tempo e a temperatura.

4.11.1. Variação de temperatura.

Após a indução com IPTG, os inoculos foram colocados para crescer nas seguintes temperaturas:

- 30 °C com 3 horas de indução.
- 18 °C com 3 horas de indução.

O tampão de lise e a estirpe mantiveram-se os mesmos.

4.12. OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

4.12.1. Variação de pH do tampão de lise.

Após otimização da temperatura a 30 °C por 3 horas foi utilizado o tampão de lise com a mesma composição, porém, alterando o pH para 5, 6, 9 e 10.

4.12.2. Variação da concentração do sal e do tipo de sal do tampão de lise.

Foram testadas diferentes concentrações de NaCl no tampão de lise: 100 mM, 300 mM e 500 mM. Além disso, outro tampão foi feito, substituindo o cloreto de sódio por cloreto de potássio (KCl) em concentração de 100 mM, em pH 8.

A sonicação nesse teste foi aumentada para 10 vezes de 20 segundos de intervalos.

4.12.3. Adição de detergentes no tampão de lise.

Testou a solubilidade da proteína adicionando três tipos de detergentes: Triton, Tween 20 e Tween 80. Todos eles em uma concentração de 1%. Isso foi realizado já que detergentes têm a capacidade de aumentar a solubilidade da proteína.

4.12.4. Variação da estirpe de *E. coli*.

A estirpe Rosetta (Novagen) foi utilizada, substituindo a BL21 com a finalidade de aumentar a solubilidade da proteína recombinante. A transformação e o preparo do inoculo ocorreu da mesma maneira que a BL21, descrito no item 4.10. O tampão de lise utilizado foi composto pelos mesmos componentes no teste de expressão (Tris HCl 20 mM, pH 8 e NaCl 100 mM). A temperatura de crescimento da bactéria foi de 30°C e de 37°C.

4.12.5. Alterações na manipulação do *pellet*.

O inóculo de 5 mL induzido com IPTG foi centrifugado após 3 horas de indução. Em uma alíquota foi adicionado o tampão de lise e em seguida, congelado. Após 14 horas continuaram os procedimentos de sonicação e verificação da expressão. Em outra alíquota o tampão de lise foi adicionado, seguiu com a sonicação de 10 vezes, com intervalos de 20 segundos e depois foi congelado. Após 14 horas, a amostra foi sonicada mais uma vez e seguiu com procedimento.

4.13. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

Otimizadas as condições de expressão e recuperação da proteína com temperatura de 30°C, tempo de indução por 3 horas, tampão de lise correspondendo a 20 mM Tris HCl e 100 mM de NaCl, pH 8,1 com congelamento depois da sonicação, realizou-se a expressão em maior escala para proceder-se a purificação da proteína recombinante. A purificação da lipase Lip BL foi realizada a partir de 1000 mL de cultura contendo 500 µL de antibiótico canamicina. Foi inoculado com uma pré-cultura de *E.coli* (BL21) transformada, da diluição de 1/100 e incubada a 30 °C com agitação de 180 rpm. Quando a absorbância em 600 nm alcançou 0,5, a expressão de proteína foi induzida pela adição de IPTG na concentração final de 0,5 mM. Após 3 horas de indução, as células foram centrifugada a 4,70x1000 xg (5000

rpm) em centrífuga refrigerada a 4°C por 10 minutos. Os precipitados celulares foram suspensos em 66 mL tampão de lise (Tris-HCl pH 8,0 20 mM, NaCl 100 mM). As células foram lisadas por sonicação (15 vezes de 20 segundos com intervalos de 20 segundos) em gelo, usando o sonicador® XL 2020 (Heat systems-UltasonicsInc., New Highway, farmingdale, NY, USA). Em seguida, todo o extrato bruto foi guardado em tubos *falcons* estéreis e armazenado em freezer a -20°C. O descongelamento ocorreu por agitação manual e logo após, essa solução foi sonicada mais uma vez, na mesma condição. O extrato celular resultante foi centrifugado a 30.000 xg (15000 rpm) por 30 minutos para separação das frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel contendo a proteína com cauda de histidina foi aplicada em uma coluna cromatográfica *HisTrap™ chelatingHP*column (GE Healthcare, USA) carregada com NiCl₂ e equilibrada com tampão de lise (tampão A). A cromatografia foi conduzida no cromatógrafo AKTA basic (GE Healthcare, USA). A coluna foi lavada com 6 volumes de tampão A. A proteína lipBL1 possui uma cauda com resíduos de histidina na região N-terminal que favorece sua interação com o níquel da coluna. Enquanto as demais proteínas são eluídas, Lip BL fica retida na coluna. Após toda a solução de proteínas ter passado pela coluna, a proteína de interesse foi eluída com gradiente crescente (0 – 100%) de tampão de lise contendo imidazol 500 mM (tampão B), com uma vazão de 2 mL/segundo. A detecção das proteínas foi monitorado a 280 nm e as frações das proteínas eluídas foram analisadas em gel SDS-PAGE.

4.14. IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A detecção da atividade da lipase foi realizada em meio sólido LA, contendo canamicina (100µg/mL), 1% de tributirina e 0,5 mM de IPTG e em outro meio, LA contendo ampicilina, canamicina (100µg/mL), e 0,5 mM de IPTG.

A bactéria contendo o gene da lipase foi plaqueada no meio contendo tributirina, incubada a 37 °C por sete dias. Para o preparo do meio da lipase todos os componentes foram pesados, dissolvidos em água destilada, misturados mecanicamente durante 1 minuto e autoclavados.

A mesma bactéria transformada foi plaqueada em meio LB contendo IPTG 0,5 mM, canamicina (100µg/µL) e ampicilina nas seguintes concentrações: 100 µg/µL, 50 µg/µL, 25 µg/µL e 10 µg/µL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA A LIPASE LIPBL1

Foi sintetizado um par de oligonucleotídeos (forward e reverse) para a amplificação da lipase LipBL1 com base no gene da biblioteca metagenômica e as sequências estão descritas na Tabela 1 dos materiais e métodos. Com o auxílio da bioinformática, verificou-se que essa proteína apresenta o peso molecular de aproximadamente 1200 pares de bases (pb). Através da comparação visual com padrões de tamanho molecular em gel de agarose, notou-se que a amplificação do gene após a PCR foi bem sucedida, gerando um fragmento com o peso esperado (Figura 4). Esse produto da PCR foi digerido com as enzimas de restrição NcoI e BamHI, assim como o vetor, possibilitando assim que o inserto pudesse ser ligado ao vetor (Figura 5).

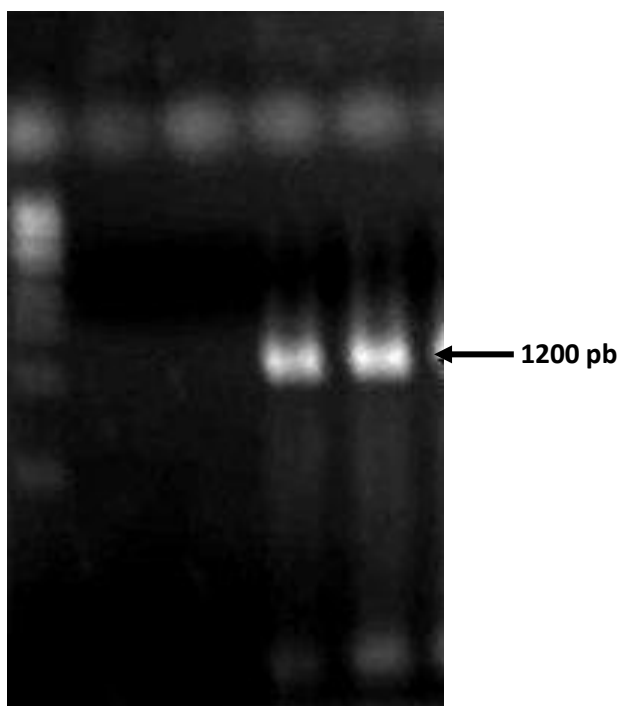


FIGURA 4: Amplificação do gene codificador da lipase BL1 por PCR, resultando em uma banda com aproximadamente 1200 pares de bases em eletroforese em gel de agarose 1%.

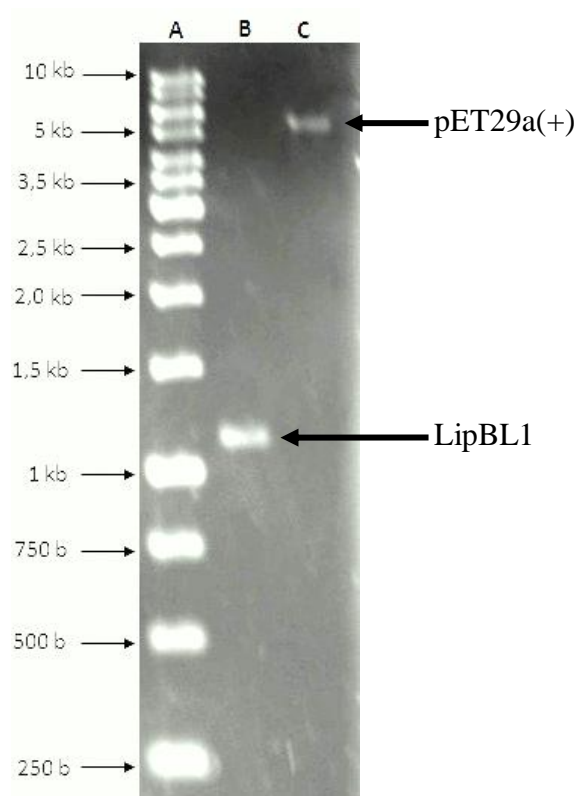


FIGURA 5: Eletroforese em gel de agarose 1% da restrição do produto da PCR e do vetor pET29a(+). Onde (A) Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Fermentas Ladder; (B) Restrição da Lipase BL1 com as enzimas NcoI e BamHI e (C) perfil de restrição do vetor pET29a(+) com enzimas NcoI e BamHI.

5.2.TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Depois do vetor e o DNA terem sido incubados por 24 horas, a 4° C, para que ocorresse a ligação formando o plasmídeo recombinante com o gene da lipase, este foi transformado por termocompetência na bactéria *E. coli* estirpe TOP10 (Invitrogen), para certificação que a reação foi bem sucedida. As bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo canamicina e 12 colônias transformantes, resistentes ao antibiótico, foram selecionadas para extração do DNA plasmidial.

Os 12 diferentes DNAs plasmidiais isolados foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% para analisar se houve diferenças nos padrões de banda. Observando a Figura 6, confirma-se a presença de dois diferentes padrões, indicando que em um deles corresponde ao vetor pET29a(+) com o gene que codifica a lipase e outro, correspondendo apenas ao vetor. O perfil de digestão com as enzimas de restrição NcoI e BamHI dos fragmentos clonados possibilitou a confirmação da presença dos insertos corretos na maioria

dos padrões de bandas. Ou seja, exceto nos poços 3 e 8 (Figura 6) o inserto não se ligou ao vetor.

Para verificar a correta inserção do gene no plasmídio, foi realizada uma nova restrição da banda 13 com as enzimas NcoI e BamHI e o produto foi aplicado no gel (Figura 7, amostra 3), juntamente com o plasmídeo não digerido (Figura 7, amostra 2).

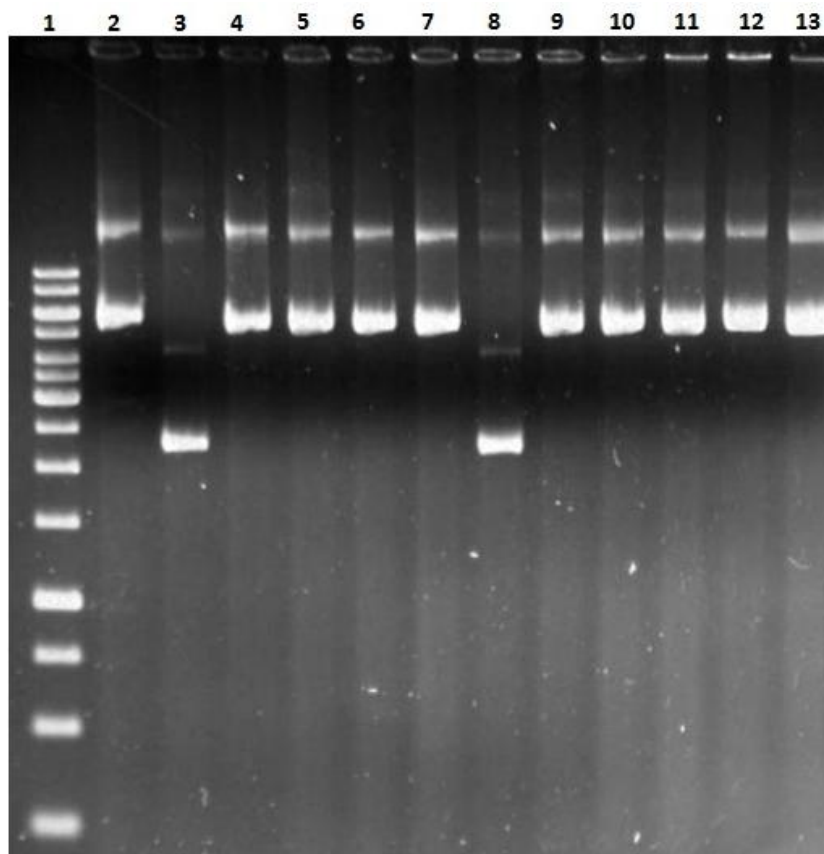


FIGURA 6: Dois diferentes padrões de bandas resultantes da eletroforese em gel de agarose 1% do DNA plasmidial sem restrição.

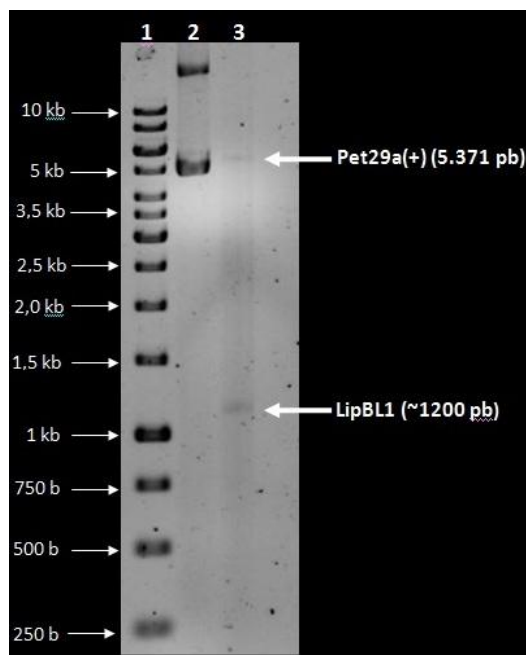


FIGURA 7: Mapa de restrição do DNA plasmidial, contendo o inserto (gene da lipase), com as enzimas NcoI e BamHI. (1) Marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas). (2) DNA plasmidial recombinante sem restrição. (3) DNA plasmidial recombinante, com restrição.

5.3. ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS

A reação de sequenciamento do DNA plasmidial recombinante gerou uma sequência. Esta foi comparada com a existente na biblioteca genômica através do programa ClustalW2 resultando em mutação de dois aminoácidos (Figura 8), uma lisina foi alterada para glutamato e uma isoleucina foi alterada para valina. Apesar dessas mutações, possivelmente as propriedades da proteína não foram alteradas, já que essas ocorreram nas extremidades da proteína. Seguindo com a análise de nucleotídeos e de aminoácidos pelo banco de dados do NCBI, os programas BlastX e BlastP detectaram que o gene LipBL1 alinhou-se com o gene beta-lactamase de *Chryseobacterium* sp. com 64% de identidade. Ambos os programas também indicaram o domínio principal presente na sequência de nucleotídeo e aminoácido. Por similaridade de sequência, a lipase LipBL1 pode ser classificada como pertencente a superfamília das beta-lactamases (Figura 9).

O programa ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) forneceu alguns parâmetros físico-químicos para a sequência de aminoácidos da lipase LipBL1: 371 aminoácidos, peso molecular de 42172,0 Da e pI teórico de 7,68. A análise de região transmembrana foi realizada em TMHMM Server v 2.0 (SONNHAMMER et al., 1998) revelando que não possui hélices transmembrana.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

LipBL1-pET          MKETAAVKFERQHMDSPDLGTLVPRGSMEEQISLQFLALCFVINCSGQSQADKKLELKLDS
LipBL1-Biblioteca  -----MKQISLQFLALCFVINCSGQSQADKKLELKLDS
                   *:*****

LipBL1-pET          VLNPLFRSDEPGGAVFIQQGNNTLYDKSFGGLADLTTKEKFTDKTVSNLGSISKTFVAYAI
LipBL1-Biblioteca  VLNPLFRSDEPGGAVFIQQGNNTLYDKSFGGLADLTTKEKFTDKTVSNLGSISKTFVAYAI
                   *****

LipBL1-pET          LMLQSQGKLSVEDNLLKYFPEFKNKALAKKIKIKHLLFHTSGLPDSRETTKDSLFLYTAK
LipBL1-Biblioteca  LMLQSQGKLSVEDNLLKYFPEFKNKALAKKIKIKHLLFHTSGLPDSRETTKDSLFLYTAK
                   *****

LipBL1-pET          DAENFRPLTSLDTELEFEPGKWNYSNPAYNGLALIEKVTKERWQNFVINNIFIPSGMTH
LipBL1-Biblioteca  DAENFRPLTSLDTELEFEPGKWNYSNPAYNGLALIEKVTKERWQNFVINNIFIPSGMTH
                   *****

LipBL1-pET          SKITDGSYPSEVAHGYYLKNKWEYDYGEYPTFAAAGNGGVWSSIEDLQKYVRAINEY
LipBL1-Biblioteca  SKITDGSYPSEVAHGYYLKNKWEYDYGEYPTFAAAGNGGVWSSIEDLQKYVRAINEY
                   *****

LipBL1-pET          KFIGKKQVDSSMRILWSGQALTGKDTVSRSYVWF IHKQSPHPDEKREPYTII EHAGEQGG
LipBL1-Biblioteca  KFIGKKQVDSSMRILWSGQALTGKDTVSRSYVWF IHKQSPHPDEKREPYTII EHAGEQGG
                   *****

LipBL1-pET          FTAHLVMIPEKKMTIIWLSNKAEYLTPKIYTVLNQLSY--
LipBL1-Biblioteca  FTAHLVMIPEKKMTIIWLSNKAEYLTPKIYTVLNQLSYLD
                   *****

```

FIGURA 8: Alinhamento de aminoácidos da sequência da LipBL1 da Biblioteca Metagenômica e da sequência da LipBL1 no pET29a(+). Mutações destacadas em vermelho.

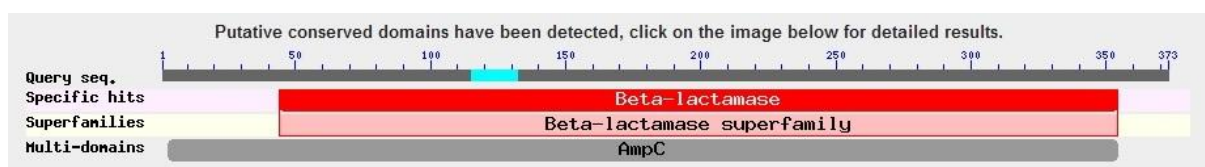


FIGURA 9: Resultado da análise da sequência de aminoácidos pelo programa blastP, resultando em um domínio beta-lactamase.

5.4. TESTE DE EXPRESSÃO DA LIPASE RECOMBINANTE

Confirmada a presença do gene no vetor, seguiu-se com a transformação da estirpe BL21 para a expressão da lipase. A expressão da proteína foi avaliada em gel desnaturante SDS utilizando o extrato bruto, a fração solúvel e a fração insolúvel, após indução com 0,5 mM de IPTG por 1, 2, 3 ou 5 horas. Em todos os casos, foi possível visualizar uma banda de proteína expressa com um peso correspondente ao tamanho esperado da proteína de interesse (42 kDa), indicando que o sistema de expressão funcionou satisfatoriamente. O melhor gel

para a visualização da proteína recombinante foi o de 2 horas após a indução (Figura 10). Como controle no gel, foi utilizada a bactéria contendo o vetor, mas sem a presença do inserto.

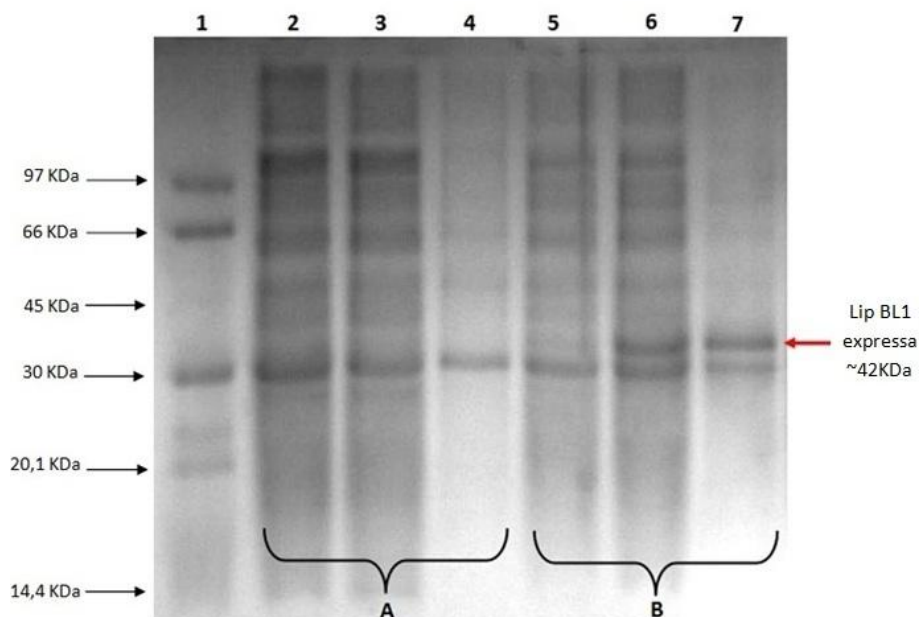


FIGURA 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) das proteínas expressas pelas células de *E. coli* BL21 sem o inserto (A) e com o inserto no vetor (B). Indução com 0,5 mM de IPTG por 2 horas a 37°C. A seta indica a banda correspondente à proteína recombinante expressa. Onde, (1) Marcador de massa molecular Amersham Low Molecular Weight (GE heathcare); (2) Extrato bruto; (3) Fração solúvel; (4) Fração insolúvel; (5) Fração solúvel; (6) Extrato bruto; (7) Fração insolúvel.

5.5. OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO

Buscando melhorar a expressão da proteína, a indução com IPTG foi realizada em diferentes temperaturas (30°C e 18°C), conforme a Figura 11.

5.6. OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO

Devido ao fato da proteína recombinante ter sido encontrada principalmente na fração insolúvel, foram testados outros tampões de lise e/ou outras condições de expressão, buscando a solubilização da proteína de interesse, para posterior etapa de purificação. Para isso, foram testados diferentes pHs, concentrações e tipo de sal e detergentes no tampão de lise. Mesmo com as alterações das condições, a lipase ficou quase que totalmente na fração insolúvel, como pode ser observado nas figuras a seguir (Figura 12, 13 e 14).

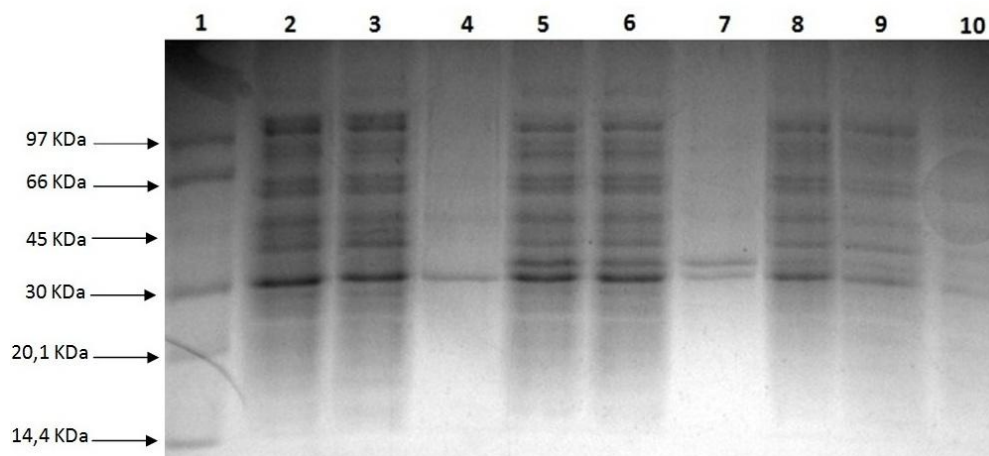


FIGURA 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) dos extratos brutos e das frações solúvel e insolúvel, induzidos em diferentes temperaturas (30°C e 18°C) com 0,5 mM de IPTG, por 2 horas em *E.coli* BL21 com e sem gene que codifica a lipase. Onde, (1) Marcador de massa molecular; (2) Extrato bruto sem gene que codifica lipase a 30°C; (3) Fração solúvel sem gene que codifica lipase a 30°C; (4) Fração insolúvel sem gene que codifica a lipase a 30°C; (5) Extrato bruto com o gene que codifica a lipase a 30°C; (6) Fração solúvel com o gene que codifica a lipase a 30°C; (7) Fração insolúvel com o gene que codifica a lipase a 30°C; (8) Extrato bruto com o gene que codifica a lipase a 18°C; (9) Fração solúvel com o gene que codifica a lipase a 18°C; (10) Fração insolúvel com o gene que codifica a 18°C.

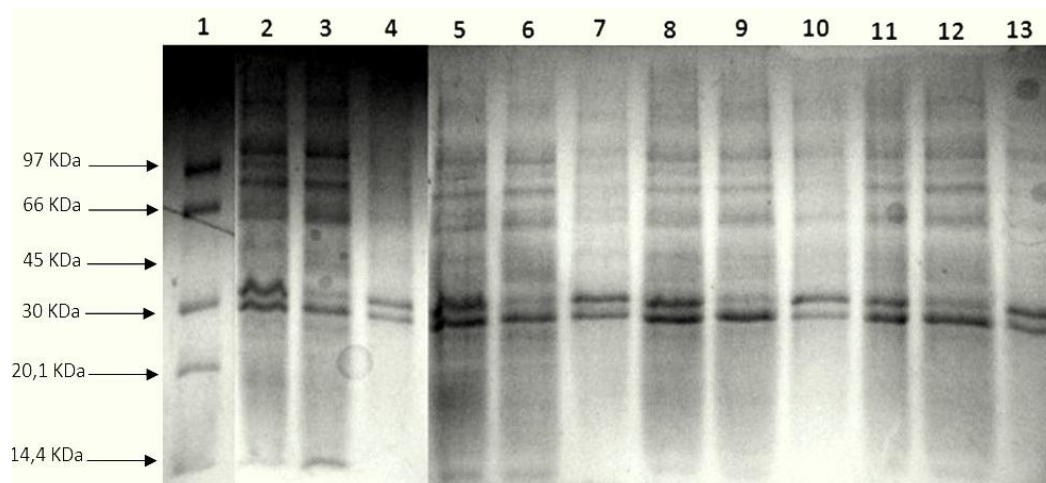


FIGURA 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do extrato bruto e das frações solúvel e insolúvel da proteína lipase expressa pela *E. coli* BL21, tratados com diferentes pHs. Indução com 0,5 mM de IPTG, por 3 horas a 30°C.

Onde, (1) Marcador de massa molecular; (2) Extrato bruto tratado com tampão de amostra em pH 5; (3) Fração solúvel tratado com tampão de amostra em pH 5; (4) Fração insolúvel tratado com tampão de amostra em pH 5; (5) Extrato bruto tratado com tampão de amostra em pH 6; (6) Fração solúvel tratado com tampão de amostra em pH 6; (7) Fração insolúvel tratado com tampão de amostra em pH 6; (8) Extrato bruto tratado com tampão de amostra em pH 9; (9) Fração solúvel tratado com tampão de amostra em pH 9; (10) Fração insolúvel tratado com tampão de amostra em pH 9; (11) Extrato bruto tratado com tampão de amostra em pH 10; (12) Fração solúvel tratado com tampão de amostra em pH 10; (13) Fração insolúvel tratado com tampão de amostra em pH 10.

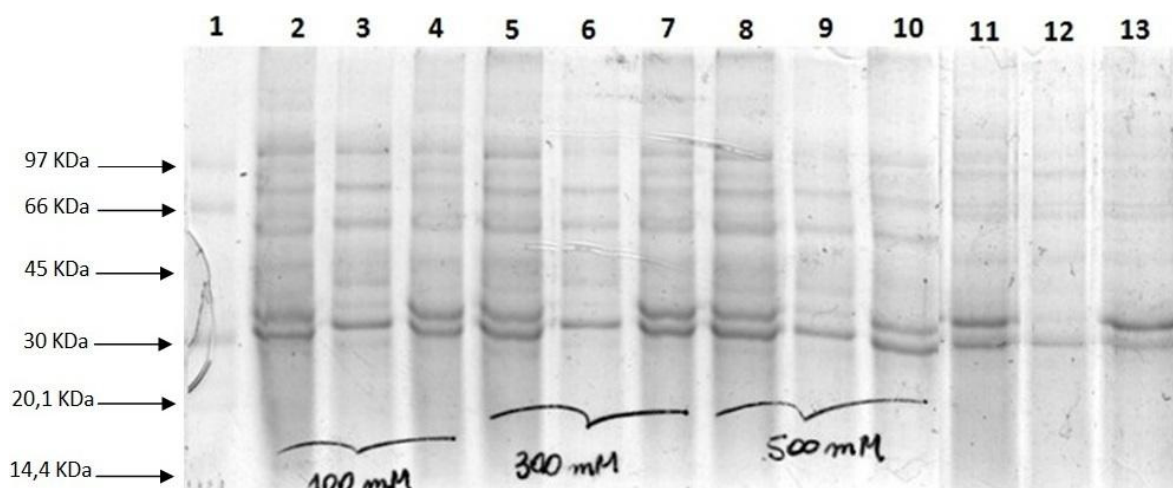


FIGURA 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do extrato bruto e das frações solúvel e insolúvel da proteína lipase expressa pela *E. coli* BL21, tratados com diferentes concentrações de NaCl e com 100 mM de KCl no tampão de amostra. Indução com 0,5 mM de IPTG, por 3 horas a 30°C. Onde: (1) Marcador de massa molecular; (2) Extrato bruto tratado com 100 mM de NaCl; (3) Fração solúvel tratado com 100 mM de NaCl; (4) Fração insolúvel tratado com 100 mM de NaCl; (5) Extrato bruto tratado com 300 mM de NaCl; (6) Fração solúvel tratado com 300 mM de NaCl; (7) Fração insolúvel tratado com 300 mM de NaCl; (8) Extrato bruto tratado com 500 mM de NaCl; (9) Fração solúvel tratado com 500 mM de NaCl; (10) Fração insolúvel tratado com 500 mM de NaCl; (11) Extrato bruto tratado com 100 mM de KCl; (12) Fração solúvel tratado com 100 mM de KCl; (13) Fração insolúvel tratado com 100 mM de KCl.

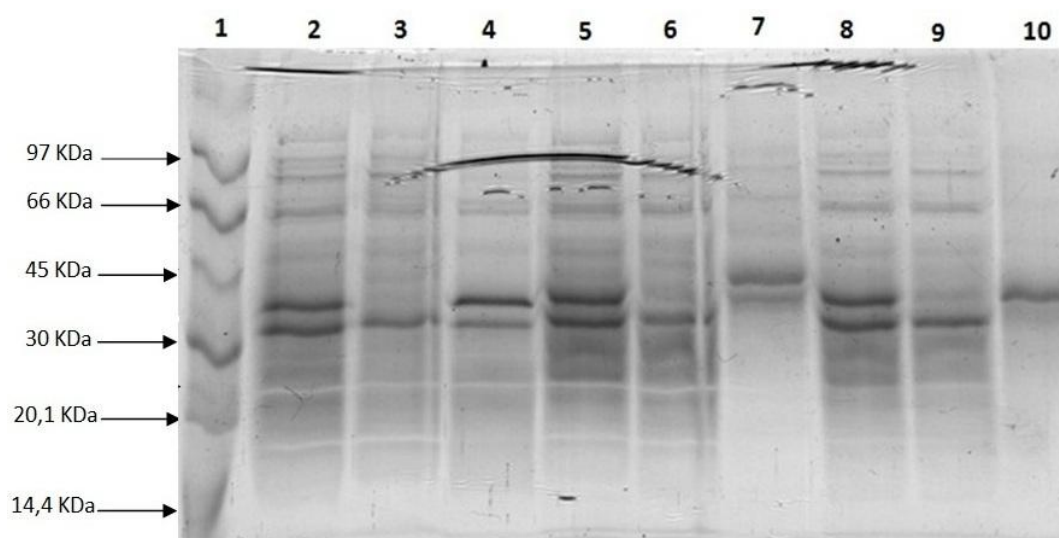


FIGURA 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do extrato bruto e das frações solúvel e insolúvel da proteína lipase expressa pela *E. coli* BL21, tratados com diferentes detergentes na concentração de 1% no tampão de amostra. Indução com 0,5 mM de IPTG, por 3 horas a 30°C. Onde: (1) Marcador de massa molecular; (2) Extrato bruto com Triton; (3) Fração solúvel com Triton; (4) Fração insolúvel com Triton; (5) Extrato bruto com Tween 20; (6) Fração solúvel com Tween 20; (7) Fração insolúvel com Tween 20; (8) Extrato bruto com Tween 80; (9) Fração solúvel com Tween 80; (10) Fração insolúvel com Tween 80.

Devido à possibilidade de existir de códons raros nesse gene em estudo e na tentativa de eliminar esse problema de solubilidade, testou-se a expressão em *E. coli* estirpe Rosetta. Esta estirpe de *E. coli* facilita a expressão de códons raros. No entanto, mesmo com a alteração do sistema de expressão, o problema da solubilidade não foi resolvido como pode ser observado na Figura 13. Pode-se observar que nas frações solúveis expressas a 30° ou 37°C (amostras número 3 e 6 da Figura 15) a proteína não pode ser visualizada.

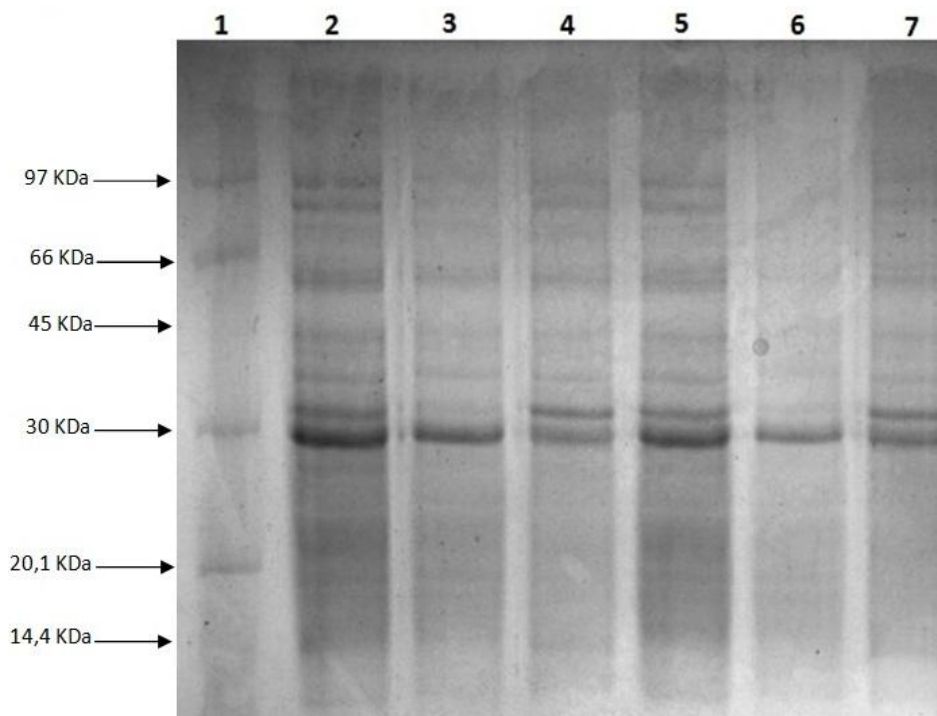


FIGURA 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do extrato bruto e das frações solúvel e insolúvel da proteína lipase expressa pela *E. coli* Rosetta. Indução com 0,5 mM de IPTG, por 3 horas a 30°C e 37°C. Onde, (1) Marcador de massa molecular; (2) Extrato bruto expresso a 30 °C; (3) Fração solúvel expressa 30 °C; (4) Fração insolúvel expressa a 30 °C; (5) Extrato bruto expresso a 37 °C; (6) Fração solúvel expressa a 37°C; (7) Fração insolúvel expressa a 37 °C.

Após consulta na literatura, optou-se por congelar o pellet na presença de tampão. Como descrito nos materiais e métodos, no item 4.12.5, foram feitos dois tipos de congelamento: antes da sonicação (condição 1) ou após a sonicação (condição 2). Após estes procedimentos, observou-se que o pellet na condição 1, teve sua fração solúvel aumentada (amostra número 6 da Figura 16), indicando que o congelamento auxiliou na liberação da proteína para a fase aquosa.

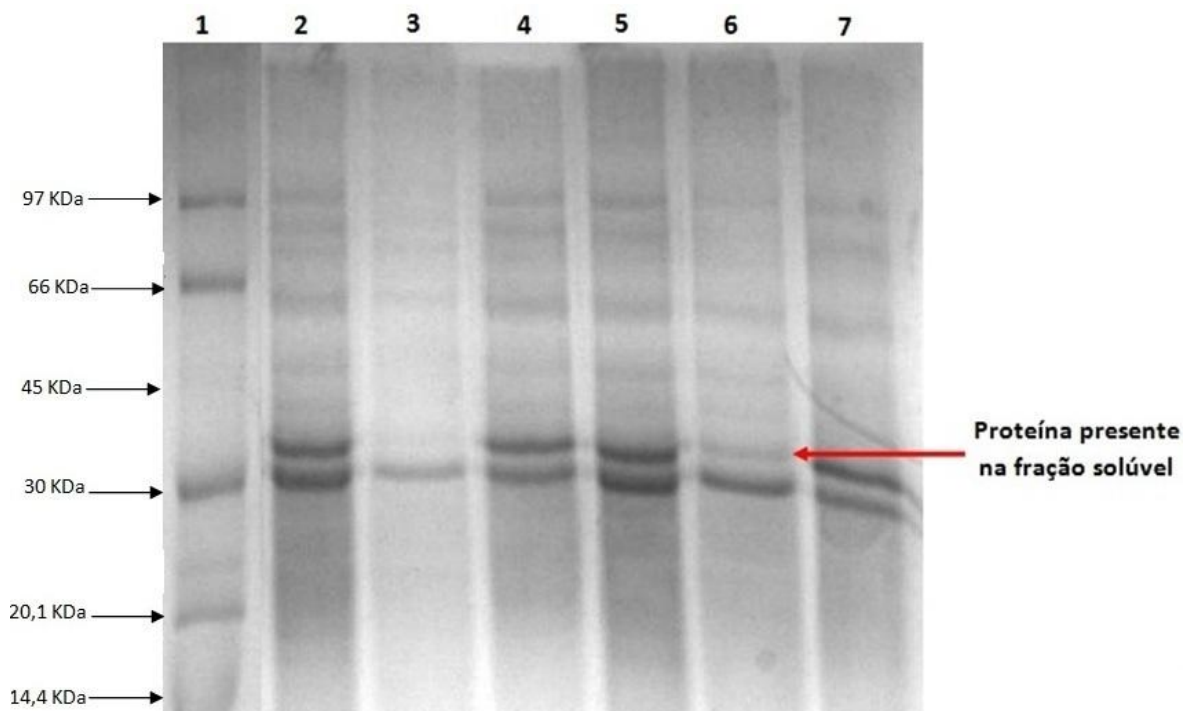


FIGURA 16: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do extrato bruto e das frações solúvel e insolúvel da proteína lipase expressa em *E. coli* BL21, com congelamento antes ou depois da sonicação. Indução com 0,5 mM de IPTG, por 3 horas a 30°C.

Onde, (1) Marcador de massa molecular; (2) Extrato bruto que teve o pellet ressuspensionado em tampão e congelado; (3) Fração solúvel que teve o pellet ressuspensionado em tampão e congelado; (4) Fração insolúvel que teve o pellet ressuspensionado em tampão e congelado; (5) Extrato bruto que teve o pellet ressuspensionado em tampão, sonificado e congelado; (6) Fração solúvel que teve o pellet ressuspensionado em tampão, sonificado e congelado; (7) Fração insolúvel que teve o pellet ressuspensionado em tampão, sonificado e congelado.

5.7. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA LIPBL1

Depois de estipuladas às características de procedimentos com o *pellet* seguiu-se com a purificação da proteína como descrita nos materiais e métodos item 4.13.

A proteína LipBL1 foi purificada pelo método cromatográfico de afinidade em coluna de níquel, através da interação entre os resíduos de histidina (His-tag) adicionados na região C-terminal da proteína e os íons metálicos de níquel da coluna. Para eluir a proteína de interesse, foi utilizado o tampão de lise com concentrações crescentes de imidazol (tampão B). Foram coletadas 12 frações proteicas de 2 ml cada, sendo que os picos de eluição começaram a aparecer na fração 4, correspondendo 16% de imidazol no tampão B e terminaram na fração 7, correspondendo a 40%. O pico de eluição máximo correspondeu a 31% de imidazol no tampão B (Figura 17).

Como observado no gel, a proteína de interesse não foi purificada, permanecendo na fração insolúvel. Os picos de eluição resultantes do equipamento referiam-se a outras proteínas que, possivelmente estavam em maior quantidade na fração solúvel, ou pelo fato de que a concentração de sal no tampão de lise (tampão A) ser muito pequena, permitindo a interação das proteínas com a agarose da coluna.

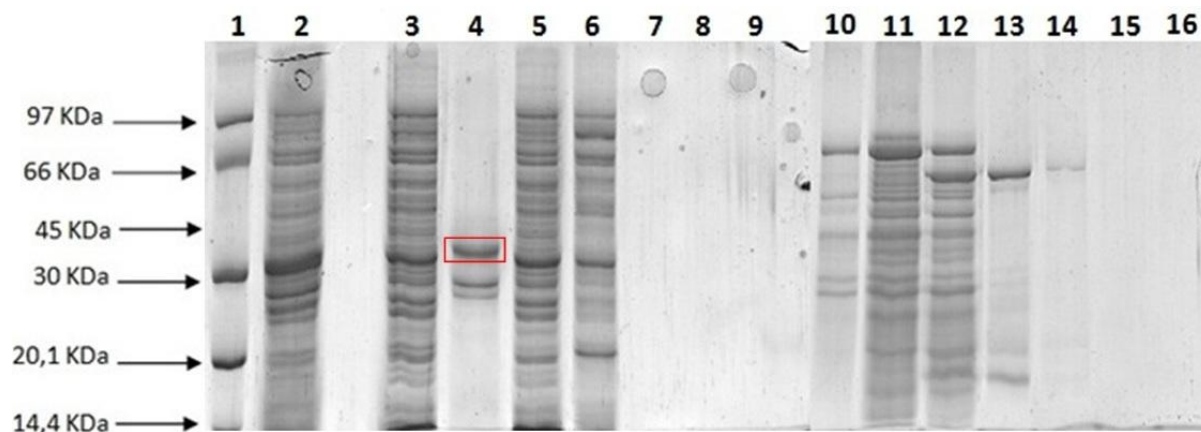


FIGURA 17: Eletroforese em gel de SDS poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) das frações protéicas obtidas da tentativa de purificação da LipBL1 em coluna His Trap carregada com níquel e eluídas em concentrações crescentes de imidazol. Onde: Marcador de massa molecular; (2) LipBL1 extrato bruto. (3) LipBL1 fração solúvel. (4) LipBL1 fração insolúvel. (5) LipBL1 injeção. (6) LipBL1 lavagem. (7) Fração um – 0% de imidazol. (8) Fração dois. (9) Fração três. (10) Fração quatro – 16% de imidazol. (11) Fração cinco – 31% de imidazol. (12) Fração seis – ~40% de imidazol. (13) Fração sete. (14) Fração oito. (15) Fração nove. (16) Fração dez - ~60% imidazol.

5.8. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os substratos hidrolisados por lipases são triglicerídeos, os quais quimicamente são ésteres carboxílicos derivados do glicerol. A tributirina é um triglicerídeo composto por uma molécula de glicerol e três moléculas de ácido butírico. Ela oferece vantagens como um substrato para a lipase, por ser facilmente dispersa sem o uso de detergentes e por apresentar seus produtos, da reação de hidrólise, na forma solúvel em água.

Quando a lipase consegue produzir um halo de degradação em meio sólido contendo tributirina, significa que a enzima conseguiu hidrolisar esse triglicerídeo em glicerol e ácido butírico (ZIBETTI, 2008).

As células que continham os plasmídeos com o inserto (gene de interesse da lipase) deveriam produzir halos de hidrólise indicando que o gene da lipase estava sendo corretamente expresso e que a enzima estava íntegra e ativa, degradando a tributirina. No

entanto, nos experimentos realizados, as células não produziram halos de hidrólise (Figura 18). É possível inferir que esse gene selecionado da biblioteca metagenômica não esteja íntegro. Ou seja, é possível que esse gene exija a expressão de múltiplos genes para que sua atividade biológica seja identificada. Também é possível que a proteína esteja sendo expressa de maneira insolúvel, podendo formar corpo de inclusão, e dessa forma a atividade enzimática não será observada.



FIGURA 18: A bactéria *E. coli* transformada contendo o gene codificador de lipase clonado no vetor de expressão pET29a foi testado em meio LA suplementado com tributirina 1% para avaliação da atividade lipolítica. O clone bacteriano foi crescido em estufa a 37°C durante sete dias.

No trabalho de Faoro (2010) um teste de atividade enzimática muito similar foi realizado. Ele utilizou a estirpe de *E. coli* Rosetta transformada com um plasmídeo que também continha um gene codificador de uma lipase. Essa estirpe foi plaqueada em meio LA - tributirina 1% e foi possível visualizar a formação de um halo de degradação (Figura 19).

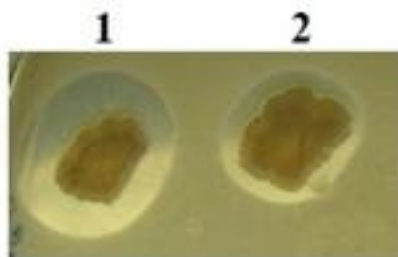


FIGURA 19: Estirpes de *E. coli* Rosetta contendo genes codificadores de lipases clonados no vetor pET28a testados em meio LA – tributirina 1%. (1) pETLP001ORF27 BL21 Rosetta (LP001ORF27); (2) pETLP090ORF24 BL21 Rosetta (1LP090ORF24). FONTE: FAORO, 2010.

Outro teste foi realizado em um meio contendo ampicilina em diferentes concentrações, pois segundo a análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos dessa lipase revelou um domínio de beta-lactamase. Plasmídeos que apresentam genes de beta-lactamases, conferem resistência a ampicilina. Esta enzima é secretada para o periplasma, onde catalisa a hidrólise do anel β -lactâmico das penicilinas. A ampicilina presente no meio de cultivo é especialmente suscetível à degradação, tanto pela beta-lactamase ou por condições ácidas em culturas de alta densidade. Portanto as bactérias que crescem na placa contendo a ampicilina, teoricamente apresentam esse domínio beta-lactâmico, sendo resistentes a esse antibiótico (MARTINELLI, 2007).

Desta forma, para estudar esta atividade biológica, as bactérias contendo o plasmídeo foram plaqueadas no meio com ampicilina. Porém, as células não cresceram em nenhuma concentração desse antibiótico, indicando que a quebra do anel beta-lactâmico não foi possível.

5.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Bibliotecas metagenômicas permitem a exploração biotecnológica de microrganismos ainda desconhecidos sem a necessidade de cultura. Porém permanece a necessidade de métodos de *screening* funcionais para atividades enzimáticas que sejam de interesse mais específico.

Dentro de uma biblioteca metagenômica muitos clones podem passar despercebidos, podem ser isolados para um tipo de atividade, quando na verdade realizam outro tipo de catálise, e/ou podem necessitar de genes complementares (expressão de mais de um gene)

para que a atividade enzimática possa ser evidenciada. Esses dois últimos casos podem estar ocorrendo nesse trabalho.

6. CONCLUSÃO

A ORF que codificava uma lipase retirada da biblioteca metagenômica da Mata Atlântica Paranaense foi amplificada, clonada e expressa. Porém a purificação não foi bem sucedida porque a proteína recombinante encontrou-se insolúvel nas condições testadas.

A enzima lipase expressa neste trabalho não apresentou atividade lipolítica sobre o substrato tributirina e também não apresentou propriedade de beta-lactamase frente à ampicilina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, v. 25, n. 17, p. 3389-402, 1997.

ARPIGNY, J.L.; JAEGER, K.H. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, v. 343, p. 177-183, 1999.

BROWN, T.A. **Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma Introdução**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CARVALHO, P. de O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicações de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova* v. 26, n.1, p. 75-80, 2003.

CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G., THOMPSON, J.D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* v. 31(13), p. 3497-500, 2003. Programa disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2>.

CHU, X.; HE, H.; GUO, B. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from south China sea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, p. 615-25, 2008.

CHUNG, C.T.; NIEMELA, S.L.; MILLER, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, p. 2172-2175, 1989.

CIESLINSKI, H.; BIALKOWSKA, A.; TKACZUK, K.; DLUGOLECKA, A.; KUR, J.; TURKIEWICZ, M. Identification and molecular modeling of a novel lipase from an Antarctic soil metagenomic library. *Polish Journal of Microbiology*, v. 58, n. 3, p. 199-204, 2009.

CORREIA, V. A. B. **Seleção e Caracterização Molecular de uma Lipase do Metagenoma de Solo do Cerrado**. Universidade Católica de Brasília. Brasília, DF, 2010.

COUTO, G. H.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazil coast. *Genetics and Molecular research*, v.9, n.1, p. 514-523, 2010.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 3, p.470-478, 2005.

DANIEL, R. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 15, p. 199-204, 2004.

DIAZ-TORRES, M. L.; McNAB, R.; SPRATT, D. A.; VILLEDIEU, A.; HUNT, N.; WILSON, M.; MULLANY, P. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 47, n. 4, p. 1430-2, 2003.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 5, p. 3637-45, 2006.

ELSAS, J. D. van; DUARTE, G.F.; ROSADO, A. S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Washington, DC, v. 32, p. 133-154, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 175-194, 1998.

FAORO, H. **Prospecção metagenômica de biocatalisadores da microbiota de solos da Floresta Atlântica Paranaense**. Universidade federal do Paraná. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Brasil, 2010.

FAORO, H.; GLOGAUER, A.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; CRUZ, L. M.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O. Identification of a new lipase family in the Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 3, p. 750-755, 2011.

FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M.; COUTO, G.H.; GLOGAUER, A.; IORIS, R.M. Isolation of lipase producing clones from metagenomic libraries of Atlantic Forest soils. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 37., 2008, Águas de Lindóia. Livro de Resumos: SBBq, 2008. H-012. Disponível em: <http://sbbq.iq.usp.br/v2//index.php?option=com_content&task=category§ionid=4&id=25&Itemid=89>. Acesso em: jun/2013.

FERRER, M.; MARTÍNEZ-ABARCA, F.; GOLYSHIN, P. N. Mining genomes and metagenomes for novel catalysts. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 16, p. 588-593, 2005.

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

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**. v. 8, p. 195-202, 1998.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 64, p. 763-81, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biology provides access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**. v. 5(10), p. R245-R249, 1998.

HANSEL, C.M.; FENDORF, S.; JARDINE, P.M.; FRANCIS, C.A. Changes in Bacterial and Archaeal Community Structure and Functional Diversity along a Geochemically Variable Soil Profile. **Applied and Environmental Microbiology** v. 74, n. 5, p. 1620-33, 2008.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances** v. 27, p. 782–98, 2009.

HENNE, A.; SCHMITZ, R.A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3113-6, 2000.

HU, Y.; FU, C.; HUANG, Y.; YIN, Y.; CHENG, G.; LEI, F.; LU, N.; LI, J.; ASHFORH, E. J.; ZHANG, L.; ZHU, B. Novel lipolytic genes from the microbial metagenômica library of the South China Sea marine sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 72, p. 228-37, 2010.

HURT, R. A.; QIU, X.; WU, L.; ROH, Y.; PALUMBO, A. V.; TIEDJE, J. M.; ZHOU, J. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 4495–503, 2001.

JEONG, H. J.; 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. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 81, p. 865–74, 2009b.

JEONG, 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. 307, p 307-16, 2009a.

LANE, D.; PACE, B.; OLSEN, G.; STAHL, D.; SOGIN, M.; PACE, N. Rapid determination of 16 S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 82, n. 20, p. 6955-59, 1985.

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, p. 720-26, 2004.

LILES, M. R.; WILLIAMSON, L. L.; RODBUMRER, J.; TORSVIK, V.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, JO. Recovery, purification and cloning of high molecular weight DNA from soil microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 10, p.3302-05, 2008.

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

LORENZ, P.; SCHLEPER, C. Metagenome a challenging source of enzyme discovery. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** v. 19–20, p. 13–19, 2002.

MARTINELLI, A. H. S. **Expressão da Urease ubíqua de soja em *Escherichia coli***. Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2007.

MORIMOTO, S.; FUJII, T. A new approach to retrieve full lengths of functional genes from soil by PCR-DGGE and metagenome walking. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 83, p. 389–96, 2009.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em maio e julho de 2013.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology** v. 96, n. 7, 769-77, 2005.

OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **J. Microbiol. Methods**. v. 7, p. 57–66, 1987.

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L. D.; GARBOGGINI, F. F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multiciência**, v. 7, p. 1-19, 2006.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J.. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Adv. Microb. Ecol.**, v. 9, p. 1-55, 1986.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de latex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Quimica Nova* [online] v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PRAZERES, J.N.; CRUZ, J.A.B.; PASTORE, G.M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal Microbiology** v.37, n. 4, p. 505-09, 2006.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Biotechnology Advances**. V .26, 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 Communication**, n. 335, p. 57-65, 2005.

RAPP, D., OLIVECRONA, T. Kinetics of Milk Lipoprotein Lipase. Studies with Tributyrin. *Eur. J. Biochem.* v. 91, p. 379-385, 1978.

REES, H.C.; GRANT, S.; JONES, E.B.; GRANT, W. D.; HEAPHY, E.S. Detecting cellulose and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles**, v. 7, 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. 817-25, 2005.

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

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2541-47, 2000.

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

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 14, p.303–310, 2003.

SCHLÜTER A.; BEKEL T.; DIAZ N. N., DONDRUP M.; EICHENLAUB R.; GARTEMANN K-H.; KRAHN I.; KRAUSE L.; KRÖMEKE H.; KRUSE O.; MUSSGNUMG J. H.; NEUWEGER H.; NIEHAUS K.; PÜHLER A.; RUNTE K. J.; SZCZEPANOWSKI R.; TAUCH A.; TILKER A.; VIEHÖVER P.; GOESMANN A. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. **J. Biotechnol.**, v. 136, p.77-90, 2008.

SCHMEISSER, C.; STÖCKIGT, C.; RAASCH, C.; WINGERDER, J.; TIMMIS, K. N.; WENDEROTH, D. F.; FLEMMING, H. C.; LIESEGANG, H.; SCHMITZ, R. A.; JAEGER, K-E.; STREIT, W. D. Metagenomic survey of biofilms in drinking-water networks. **Appl. Environm. Microbiol.**; v. 69, n. 12, p. 7298-7309, 2003

SHORT, J.M. Protein activity screening of clones having DNA from uncultivated microorganisms. U.S. Patent Number 6,677,115. **Diversa Corporation**, 2004.

SONNHAMMER, E.L.L.; HEIJNE, G. VON; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proc. of Sixth Int. Conf. on **Intelligent Systems for Molecular Biology**, p 175-182. Ed J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, and C. Sensen Menlo Park, CA: AAAI Press, 1998.

TORSVIK, V. L. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil Biol. Biochem.**, v. 12, p. 15-21, 1980.

TORSVIK, V; OVREAS, L.. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240–5, 2002.

TREVISAN, H. C. Lipases. IN: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 20, p. 616– 622, 2009.

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

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKONCH, C.; ROGERS, Y-H.; SMITH, H. O. Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. **Science**, v. 304, p. 66-74, 2004.

VERGER, R. Intervacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends Biotechnol.**, v. 15, p. 32-38, 1997.

VIEIRA, R. **Fundamentos de bioquímica**. Belem-Pará. 2003.

VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 105, p. 308–17, 2003.

VOGET, S.; LEGGEWIE, C.; UESEBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K-E.; STREIT, W. R. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 6235-6242, 2003.

WARNECKE, F.; LUGINBU, P.; IVANOVA, N.; GHASSEMIAN, M.; RICHARDSON, T. H.; STEGE, J. T.; CAYOUE, M.; MCHARDY, A. C.; DJORDJEVIC, G.; ABOUSHADI, N.; SOREK, R.; TRINGE, S. G.; PODAR, M.; MARTIN, H. G.; KUNIN, V.; DALEVI, D.; MADEJSKA, J.; KIRTON, E.; PLATT, D.; SZETO, E.; SALAMOV, A.; BARRY, K.; MIKHAILOVA, N.; KYRPIDES, N. C.; MATSON, E. G.; OTTESEN, E. A.; ZHANG, X.; HERNÁNDEZ, M.; MURILLO, C.; ACOSTA, L. G.; RIGOUTSOS, I.; TAMAYO, G.; GREEN, B. D.; CHANG, C.; RUBIN, E. M.; MATHUR, E. J.; ROBERTSON, D. E.; HUGENHOLTZ, P.; LEADBETTER, J. R. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, v. 450, p. 560-569, 2007.

WHITE, A. **Princípios de Bioquímica**. Guanabara Koogan, 5^a Ed, 1976.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-71, 1987.

WOLFGANG, R. S.; ROLF, D.; KARL-ERICH, J. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 15, p. 285–90, 2004.

ZHOU, J. M.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 316–22, 1996.

ZIBETTI, A. W. **Desenvolvimento de um sistema reacional de hidrólise enzimática de tributirina para aplicação em biossensor indicador de tempo-temperatura**. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro tecnológico de engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2008.