

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ FERREIRA MOTA

IDENTIFICAÇÃO DE UMA NOVA LIPASE A PARTIR DE CLONES DE UMA
BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE SOLO CONTAMINADO COM GORDURA
ANIMAL

CURITIBA

2015

ANDRÉ FERREIRA MOTA

IDENTIFICAÇÃO DE UMA NOVA LIPASE A PARTIR DE CLONES DE UMA
BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE SOLO CONTAMINADO COM GORDURA
ANIMAL

Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Ciências - Bioquímica, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Leda Satie Chubatsu.

Coorientadores:

Dr. Helisson Faoro

Dr. Marco Aurélio Schüler de Oliveira

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Mota, André Ferreira

Identificação de uma nova lipase a partir de clones de uma biblioteca metagenômica de solo contaminado com gordura animal. / André Ferreira Mota. – Curitiba, 2015.

70f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Leda Satie Chubatsu

Coorientadores: Helisson Faoro

Marco Aurélio Schüler de Oliveira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Metagenômica. 2. Lipase. I. Título II. Chubatsu, Leda Satie. III. Faoro, Helisson. IV. Oliveira, Marco Aurélio Schüler de. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

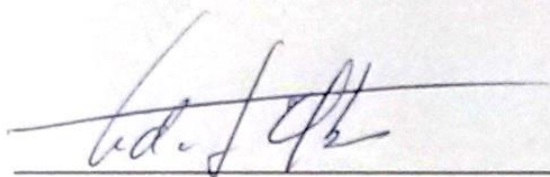
CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

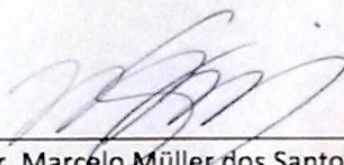
ANDRÉ FERREIRA MOTA

IDENTIFICAÇÃO DE UMA NOVA LIPASE A PARTIR DE CLONES DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE SOLO CONTAMINADO COM GORDURA ANIMAL

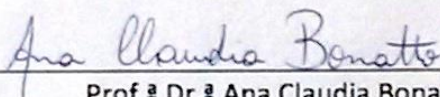
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof.^a Dr.^a Leda S. Chubatsu – Orientadora
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Bonatto
Departamento de Genética, UFPR

Curitiba, 20 de março de 2015.

***Ao meu pai Celso, mãe
Dulcinéa e irmão Felipe pelo
amor, apoio e dedicação.***

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof.^aDr.^a Leda Satie Chubatsu e aos coorientadores Dr. Helisson Faoro e Dr. Marco Aurélio Schüller pela orientação e principalmente pelos valiosos conhecimentos essenciais para o desenvolvimento de minha carreira científica.

Ao Valter pelo auxílio nas etapas de sequenciamento que ajudaram a concretizar esse trabalho.

À Roseli Prado pelo auxílio técnico e pela atenção no dia-dia de trabalho, aos amigos Euclides, Joseph, Geisa, Glaucio, Vivian, Daniel, Rodrigo e Robson com os quais vivi momentos memoráveis, e aos demais colegas de laboratório.

Ao meu pai Celso Mota, à minha mãe Dulcinéa Ferreira Rodrigues Mota e irmão Felipe Mota por todo amor e apoio nos momentos difíceis.

Ao meu compadre, primo e amigo Hugo Amaral pela amizade, apoio e diálogos regados ao mais puro malte.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

“A sua teoria é louca, mas não louca o suficiente para ser verdade.”

Niels Bohr

RESUMO

A análise de 192 clones previamente isolados de uma biblioteca metagenômica construída a partir de uma amostra de solo contaminado com gordura animal levou a escolha de 12 clones com atividade lipolítica na presença de tributirina 1%, trioctanoína 1% ou trioleína 1%. Os fosmídeos dos 12 clones selecionados foram purificados e fragmentados com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI para comparação, indicando diferentes perfis de restrição entre todos eles. Três clones que apresentaram os maiores halos de hidrólise em meio LB-ágar contendo trioleína 1% e foram escolhidos para identificação da lipase. Os fosmídeos destes três clones foram digeridos com a enzima *Eco*RI para a construção de sub-bibliotecas metagenômicas em vetor pUC19. Os clones obtidos de cada sub-biblioteca foram submetidos a uma nova triagem nos meios de cultura contendo triacilgliceróis a fim de identificar aqueles com atividade lipolítica. A partir do sequenciamento desses clones foram identificados genes que codificam para uma lipase e sua chaperona. O gene para lipase apresenta 903 pb, codificando para uma proteína de 301 aminoácidos. Um possível peptídeo sinal foi localizado na porção N-terminal da proteína. O gene para a chaperona encontra-se a jusante do gene da lipase, apresentando 741 pb e codificando uma proteína de 247 aminoácidos. Análises mostraram alta similaridade com proteínas não caracterizadas de *Aeromonas hydrophyla*. Oligonucleotídeos iniciadores foram construídos permitindo a amplificação dos genes isolados neste trabalho.

Palavras-chave: Metagenômica, Lipase, Lipase bacteriana

ABSTRACT

Analysis of 192 clones previously isolated from a metagenomic library constructed from a soil sample contaminated with animal fat led to selection of 12 clones with lipolytic activity in the presence of 1% tributyrin, 1%trioctanoin, or 1% triolein. The fosmids from the 12 selected clones were purified and fragmented with the restriction enzymes *Bam*HI and *Eco*RI for comparison, showing different restriction profiles. Three clones that showed the largest hydrolysis halos in LB agar containing 1% triolein were chosen for lipase identification. These fosmids were digested with *Eco*RI in order to construct sub-metagenomic DNA libraries into the pUC19 vector. Clones obtained from each sub-library were subjected to screening in a new culture medium containing triacylglycerols in order to identify those with lipolytic activity. By sequencing, we have identified genes encoding a lipase and a chaperone were identified. The lipase gene has 903bp, encoding for a protein with 301 amino acid. A putative signal peptide is located at N-terminal portion of this protein. The chaperone gene is located downstream of the lipase gene showing a 741bp encoding for a 247 amino acid protein. Analysis also showed high similarity to uncharacterized proteins of *Aeromonas hydrophyla*. Oligonucleotide primers were constructed allowing the amplification of the genes isolated in this work which will allow the characterization of these proteins upon over-expression.

Key-words: Metagenome, lipase, bacterial lipase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. ESQUEMA INDICANDO A EXTRAÇÃO E CLONAGEM DE DNA A PARTIR DE UMA AMOSTRA AMBIENTAL.....	16
FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS SETORES INDÚSTRIAS QUE UTILIZAM BIOMOLÉCULAS.	19
FIGURA 3. VARIAÇÃO ESTRUTURAL DAS α/β HIDROLASES.	20
FIGURA 4. REAÇÃO CATALISADA POR LIPASES.....	21
FIGURA 5. ESTRUTURA DA LIPASE DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
FIGURA 6. EXPRESSÃO DE CHAPERONA E LIPASE EM BACTÉRIAS.....	24
FIGURA 7. BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS.....	29
FIGURA 8. CLONES DAS SUB-BIBLIOTECAS PL1A E PL2A (SUPERIOR E INFERIOR RESPECTIVAMENTE) CULTIVADAS EM MEIO LA CONTENDO 1% DE TRIBUTIRINA.....	37
FIGURA 9. CLONES DAS SUB-BIBLIOTECAS PL1A E PL2A (SUPERIOR E INFERIOR RESPECTIVAMENTE) CULTIVADAS EM MEIO LA CONTENDO 1% DE TRIOCTANOÍNA.....	38
FIGURA 10. CLONES DAS SUB-BIBLIOTECAS PL1A E PL2A (SUPERIOR E INFERIOR RESPECTIVAMENTE) CULTIVADAS EM MEIO LA CONTENDO 1% DE TRIOLEÍNA.	39
FIGURA 11. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DOS FOSMÍDEOS DIGERIDOS COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Bam</i> HI.....	41
FIGURA 12. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DOS FOSMÍDEOS DIGERIDOS COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Eco</i> RI.....	42
FIGURA 13. TRANSFORMANTES OBTIDOS DA SUBCLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA DO FOSMÍDEO E7.	44
FIGURA 14. ESQUEMA DO PROCESSO DE MUTAGENESE ALEATÓRIA POR INSERÇÃO DE TRANSPOSON.	46
FIGURA 15. ESQUEMA DE INSERÇÃO DE TRANSPOSON EM DIFERENTES REGIÕES DO DNA ALVO.	47

FIGURA 16. TRANSFORMANTES RESISTENTES A CANAMICINA CULTIVADOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM TRIBUTIRINA 1%......	48
FIGURA 17. ANOTAÇÃO DAS SEQUENCIAS OBTIDAS PELO PROGRAMA ARTEMIS.....	49
FIGURA 18. SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS (EM LETRAS MINÚSCULAS) REFERENTE AS <i>orfs</i> QUE CODIFICAM PARA A LIPASE E A CHAPERONA.....	51
FIGURA 19 REGIÕES CONSERVADAS DA LIPE7.	51
FIGURA 20.ÁRVORE FILOGENÉTICA DA LipE7	52
FIGURA 21.RESULTADO GERADO PELA DA FERRAMENTA SIGNALIP VERSÃO 4.1.....	53
FIGURA 22. SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DA LipE7.	54
FIGURA 23. SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DA ChapE7.....	54
FIGURA 24. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DO PRODUTO DE PCR DO GENE QUE CODIFICA PARA A LIPASE E CHAPERONA.	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 VETORES	26
TABELA 2 ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i>	26
TABELA 3 MEIOS UTILIZADOS PARA CULTIVO E CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS	27
TABELA 4- PRIMERS <KAN-2> RP-1 E FP-1	33
TABELA 5 – “PRIMERS” PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES	35

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

BLAST – Do inglês “Basic Local Alignment Sequence Tool”

BAC – Do inglês “Bacterial Artificial Chromosome” (cromossomo artificial de bactéria)

DMF – dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

DO600 – densidade ótica a 600 nm de comprimento de onda

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

GenBank – banco de sequências de genes e proteínas do NCBI

Kb – mil pares de base

LB – meio líquido Luria Bertani

LA – meio LB ágar

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

ORF – Do inglês “Open Reading Frame” (região codificadora de proteína)

pb – pares de bases

PCR – Do inglês “Polymerase Chain Reaction” (reação em cadeia da polimerase)

PDB – “Protein Data Bank”

pH – potencial hidrogeniônico

pNP – p-nitrofenol

pNPP – palmitato de p-nitrofenila

rpm – rotações por minuto

SAP – Do inglês “Shrimp Alkaline Phosphatase” (fosfatase alcalina de camarão)

TAE – tris-acetato-EDTA

TBE – tris-borato-EDTA

Tris – tris hidroximetilaminometano

X-GAL – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	METAGENÔMICA E A PROSPECÇÃO DE NOVAS BIOMOLÉCULAS.	15
2.2	BIOMOLÉCULAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO.	18
2.3	HIDROLASES: ESTERASES E LIPASES.	21
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	PLASMÍDEOS, VETORES E MICRORGANISMOS	26
4.2	MEIOS DE CULTIVO	26
4.3	ANTIBIÓTICOS	28
4.4	REAGENTES GERAIS	28
4.5	BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS	28
4.6	PREPARO DAS CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÕES BACTERIANAS	29
4.7	CONSTRUÇÃO DAS SUB-BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS	30
4.7.1	ANÁLISE DOS CLONES EM pCC2FOS	30
4.7.2	EXTRAÇÃO DO VETOR FOSMIDIAL pCC2FOS RECOMBINANTE	30
4.7.3	COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE RESTRIÇÃO	31
4.7.4	FRAGMENTAÇÃO DOS FOSMÍDEOS SELECIONADOS	31
4.7.5	CLONAGEM EM VETOR PLASMIDIAL pUC19	31
4.8	ARMAZENAMENTO DOS CLONES TRANSFORMADOS	32
4.9	SEQUENCIAMENTO DOS CLONES EM pUC19	32
4.9.1	MUTAGÊNESE ALEATÓRIA COM TRANSPOSON	32
4.9.2	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	33
4.9.3	SEQUENCIAMENTO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO	33
4.9.4	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS	33

4.10	AMPLIFICAÇÃO DOS GENES POR REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR).....	34
5	RESULTADOS	35
5.1	ANÁLISES DOS CLONES DAS SUB-BIBLIOTECAS PL1A E PL2A ..	36
5.2	ANÁLISES DOS CLONES SELECIONADOS.....	40
5.3	CONSTRUÇÃO DAS SUB-BIBLIOTECAS A PARTIR DOS FOSMÍDEOS ISOLADOS.	42
5.3.1	DIGESTÃO DOS FOSMÍDEOS DAS BIBLIOTECAS PL1A E PL2A.	43
5.3.2	LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO DNA FOSMIDIAL AO VETOR pUC19 E SELEÇÃO DOS CLONES COM DNA RECOMBINANTE	43
5.4	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DOS SUB-CLONES EM pUC19.....	45
5.4.1	MUTAGÊNESE ALEATÓRIA POR INSERÇÃO DE TRANSPOSON E CULTIVO DOS TRANSFORMANTES EM MEIO SUPLEMENTADO COM TRIBUTIRINA 1%.	45
5.4.2	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUENCIAS OBTIDAS.	48
5.5	AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DA LIPASE (LipE7) E CHAPERONA (ChapE7).....	54
6	CONCLUSÃO	56
6.1	PERSPECTIVAS.....	56
	REFERÊNCIAS	57
7	ANEXOS	69
7.1	ANEXO 1 – MAPA DO VETOR pUC19.....	69
7.2	ANEXO 2 - MAPA DO VETOR pCC2FOS	70

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente é crescente a demanda por novas enzimas com aplicação biotecnológica, portanto torna-se altamente necessário o desenvolvimento experimental para identificação e caracterização de genes capazes de expressar estas biomoléculas. Estudos utilizando a metagenômica como ferramenta para identificação de novas enzimas tem representado grande utilidade nestas pesquisas (ELENDA *et al.*, 2006).

A metagenômica consiste em uma técnica de clonagem direta de DNA oriundo de amostras ambientais, sem a necessidade de cultivo do microrganismo e que utiliza métodos laboratoriais convencionais, tornando possível o acesso ao conteúdo genômico de diversos microrganismos, incluindo aqueles não cultiváveis (ELENDA *et al.*, 2007).

Estima-se que uma parte muito pequena dos microrganismos existentes são cultiváveis em meios artificiais, portanto as pesquisas envolvendo a metagenômica apresentam-se como uma alternativa viável na prospecção destas novas moléculas. Esta ferramenta torna acessível o conteúdo enzimático de organismos nunca antes cultivados em laboratórios, através do acesso direto ao seu conteúdo genômico.

O objetivo central deste trabalho consiste na identificação de uma nova lipase oriunda de uma amostra ambiental de solo contaminado com gordura animal, utilizando a metagenômica como ferramenta de pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 METAGENÔMICA E A PROSPECÇÃO DE NOVAS BIOMOLÉCULAS.

Existe uma grande quantidade de evidências sugerindo que apenas uma parte minoritária da microbiota do solo pode ser cultivada utilizando abordagens laboratoriais convencionais. As demandas nutricionais bem como as condições de temperatura favoráveis ao crescimento de muitos desses microrganismos são desconhecidas, portanto as frações não cultiváveis destes microrganismos superam em grande escala a fração cultivável. Há grande possibilidade de que esta enorme fração desconhecida da microbiota ambiental seja capaz de produzir um inestimável número de biomoléculas, portanto a expressão heteróloga dos fragmentos de DNA extraídos diretamente de amostras ambientais inseridos em células hospedeiras deve favorecer a produção destas biomoléculas originárias de microrganismos não cultiváveis (BRADY e CLARDY 2000).

Estudos conduzidos por Carl Woese (WOESE, 1987) resultaram na descoberta de novos filos do domínio Bacteria, entretanto sua pesquisa foi embasada apenas na fração cultivável dos indivíduos. Posteriormente os estudos utilizando as novas técnicas de biologia molecular independentes de cultivo, revelaram a existência de muitos outros filos do domínio Bacteria. As evidências probatórias da existência deste grande percentual de microrganismos não cultiváveis na biosfera vêm da descoberta de sequências exclusivas do gene 16S rRNA, oriundas de diversas fontes ambientais (De LONG e PACE 2001).

Utilizando técnicas clássicas de clonagem é possível inserir o DNA extraído de uma amostra ambiental em células de organismos como *E. coli*, conforme ilustrado pela figura 1, dando origem a uma biblioteca metagenômica. A partir deste processo é possível promover um estudo de bioprospecção tornando possível acessar, identificar e reproduzir toda informação contida nos genes encontrados. Esta metodologia tornou-se possível em virtude dos grandes avanços da biologia molecular permitindo a análise coletiva de diversos genomas, como exemplo a análise de DNA oriunda de uma amostra de solo (HANDELSMAN *et al.*, 1998).

O primeiro protocolo para extração e isolamento de DNA de solo foi publicado em 1980 por TORSVIK (TORSVIK *et al.*, 1980). Neste trabalho foi

demonstrado um método eficiente para extração e isolamento do conteúdo genômico de toda comunidade presente em uma amostra de solo (TORSVIK 1980). Este trabalho complementou uma publicação anterior de TORSVIK e GOKSOYR onde foi descrito um método de determinação de DNA bacteriano do solo e indicou a concentração do DNA metagenômico analisado possibilitando mais tarde a purificação deste conteúdo (TORSVIK e GOKSOYR 1978).

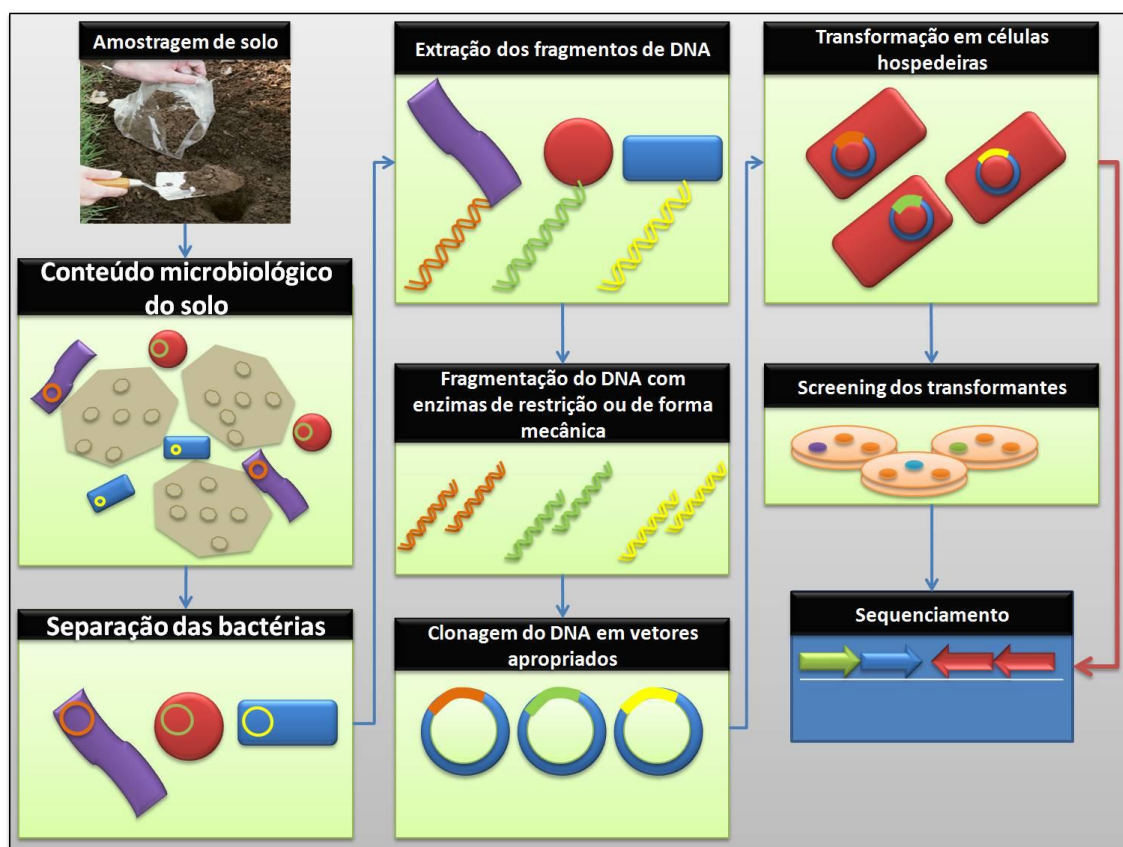


FIGURA 1. ESQUEMA INDICANDO A EXTRAÇÃO E CLONAGEM DE DNA A PARTIR DE UMA AMOSTRA AMBIENTAL.

A PARTIR DA AMOSTRA AMBIENTAL COLETADA, COMO SOLO, É REALIZADA A SEPARAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRESENTES NA AMOSTRA. O DNA PRESENTE NA AMOSTRA É EXTRAÍDO E PURIFICADO PARA POSTERIOR DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO OU FRAGMENTAÇÃO MECÂNICA. OS FRAGMENTOS DE DNA SÃO CLONADOS EM VETORES ADEQUADOS E INTRODUZIDOS EM UMA CÉLULA HOSPEDEIRA COMO *Escherichia coli*. OS TRANSFORMANTES PODEM SER OBTIDOS APÓS CULTIVO EM MEIOS SELETIVOS, O SEQUENCIAMENTO PODE SER FEITO APÓS O CULTIVO EM MEIOS SELETIVOS (*SCREENING*) OU APÓS A TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS. ADAPTADO DE HANDELSMAN *et al.*, (1998).

RONDON *et al.*, (2000) utilizaram métodos específicos para acessar a riqueza de informações de um metagenoma através da clonagem de grandes fragmentos de DNA de microrganismos isolados a partir de ambientes naturais,

utilizando como vetor o cromossoma artificial bacteriano (BAC). O vetor BAC foi utilizado pelo fato do mesmo manter eficientemente grandes insertos de DNA (maiores do que 100 kb) de forma estável em *Escherichia coli*, permitindo assim a presença de vários genes em um único clone. Os resultados demonstraram que a expressão de DNA heterólogo de *Bacillus cereus* em um sistema *E.coli*-BAC foi detectada em uma frequência razoável entre o número de transformantes, validando a ideia de que o vetor BAC de baixo número de cópias poderia ser utilizado para expressar DNA metagenômico em *E. coli* (RONDON *et al.*, 2000).

Uma abordagem utilizando a metagenômica foi conduzida em uma pesquisa publicada por HUGHES *et al.*, (1997). Neste trabalho foi descrita a manipulação gênica originária de uma bactéria fixadora de carbono não cultivável que estabeleceu relação trófica endossimbionte com *Riftiapachyptila* (conhecida também como verme tubular gigante) estando envolvida na fixação de carbono em fontes termais nas profundezas do oceano. Foi estudada uma possível via de transdução de sinal entre as espécies simbiotes utilizando técnicas de clonagem em vetores fosmidiais dando origem a bibliotecas metagenômicas com a finalidade central de sequenciar genes relacionados à fixação de carbono (HUGHES *et al.*, 1997).

Outro aspecto importante é a possibilidade de identificar novos produtos naturais a partir de amostras de solo incluindo novos biocatalisadores e fármacos. Assim a tecnologia de clonagem direta dos genes presentes em amostras de solo, originando bibliotecas metagenômicas, pode contribuir de maneira significativa para descoberta de novas moléculas.

2.2 BIOMOLÉCULAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO.

Diante do grande potencial apresentado pelos avanços no campo da metagenômica, acredita-se que um número extremamente pequeno de biocatalisadores seja conhecido atualmente. O universo estabelecido por estes progressos trás a tona o gigantesco número de moléculas que podem ser descobertas e caracterizadas, proporcionando avanços em diversos setores industriais. A geração e análise de bibliotecas metagenômicas permitem identificar em dada amostra ambiental quais organismos estão presentes, o que eles fazem e como sua informação genética pode ser benéfica para a humanidade (FERRER, MARTÍNEZ-ABARCA e GOLYSHIN, 2005). Além disso, atualmente existe uma grande demanda por enzimas com potencial biotecnológico, bem como a necessidade de melhora de bioprocessos envolvendo enzimas já conhecidas (SCHMID *et al.*, 2001).

O número de processos de biotransformação para obtenção de novas moléculas cresceu rapidamente na última década e a expectativa é de que este crescimento tome proporções ainda maiores no futuro. Um estudo realizado por STRAATHOF *et al.*, (2002) analisando a demanda industrial por biocatalisadores indicou quais classes de biomoléculas eram mais utilizadas, destacando-se, carboidratos e derivados de gordura como as mais utilizadas. O estudo também identificou quais setores industriais estavam envolvidos nestes bioprocessos indicando os setores alimentício, agroindustriais e farmacêutico como a maioria neste conjunto (figura 2).

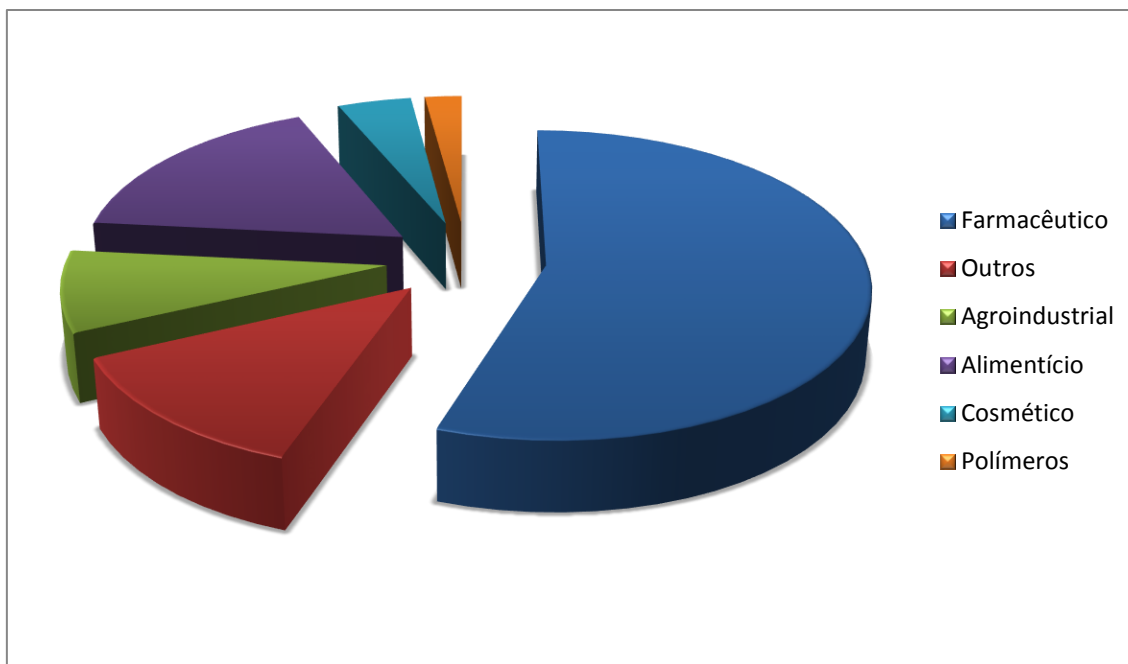


FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS SETORES INDÚSTRIAS QUE UTILIZAM BIOMOLÉCULAS.

NO GRÁFICO SÃO APRESENTADOS OS SETORES INDUSTRIAIS QUE REALIZAM PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO BIOCATALISADORES. ADAPTADO DE STRAATHOF *et al.*, (2002)

A estimativa de STRAATHOF *et al.*, (2002), sugere que aproximadamente 50% de todas as biomoléculas pesquisadas pertenciam a superfamília das hidrolases.

Hidrolases são enzimas que possuem a capacidade de catalisar reações envolvendo água e a utilizam como receptor de grupos funcionais. Existem diversas subclassificações destas enzimas e a partir do dobramento específico de suas cadeias protéicas elas podem ser subdivididas em famílias menores, como a família das α/β -hidrolases onde estão inseridas as lipases e esterases. Um núcleo de 5-8 folhas- β interligadas por estruturas α -hélice constituem a estrutura denominada sanduíche $\alpha/\beta/\alpha$ das enzimas pertencentes a esta família (LENFANT *et al.*, 2013). Estas enzimas diferenciaram-se a partir de um ancestral comum originando enzimas hidrolíticas, com vasta especificidade para diferentes substratos, os resíduos de aminoácidos da tríade catalítica estão presentes nos “*loops*” das cadeias protéicas, onde o nucleófilo está posicionado após a folha β -5 conforme descrito pela figura 3 (LENFANT *et al.*, 2013).

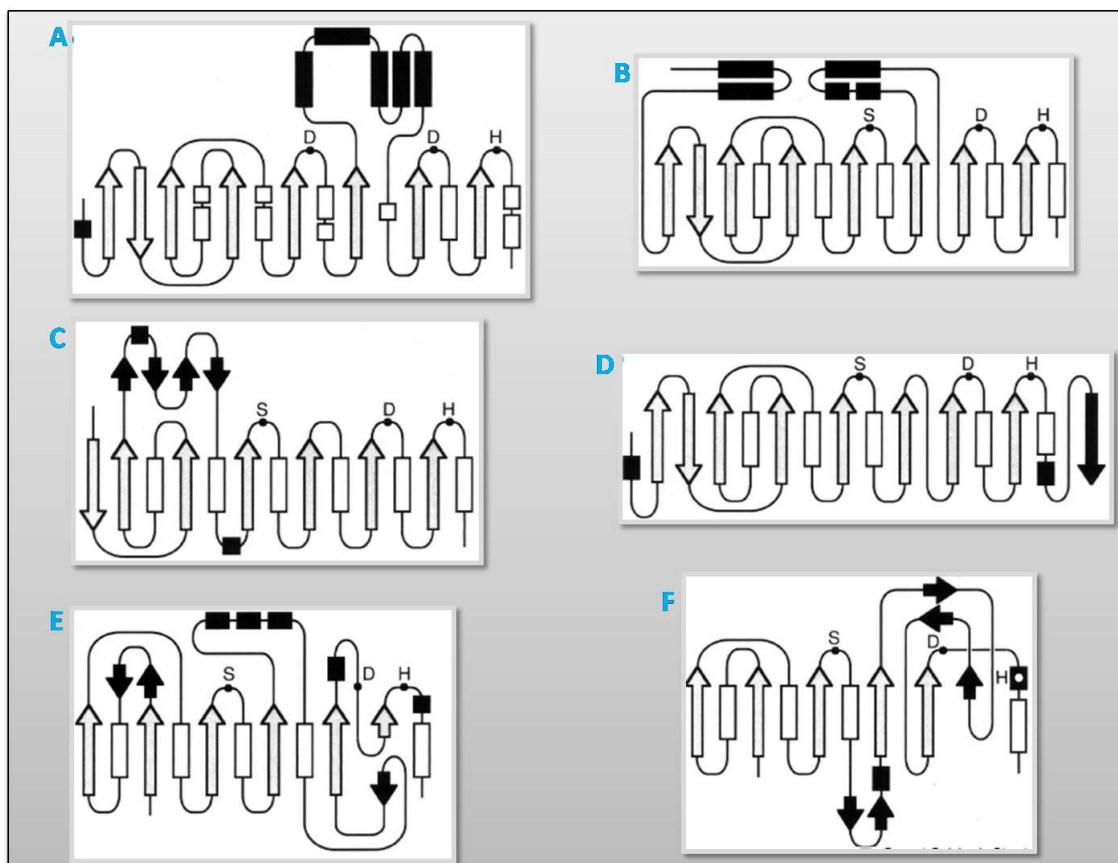


FIGURA 3. VARIAÇÃO ESTRUTURAL DAS α/β HIDROLASES.

AS ESTRUTURAS EM α -HÉLICE ESTÃO DESTACADAS PELOS RETÂNGULOS BRANCOS E AS FOLHAS β PELAS SETAS BRANCAS AS ESTRUTURAS FORA DO PADRÃO CANÔNICO ESTÃO REPRESENTADAS POR TODAS AS OUTRAS ESTRUTURAS PRETAS, OS SÍTIOS DA TRIÁDE CATALÍTICA ESTÃO REPRESENTADOS PELOS BLOCOS PRETOS EXCLUSIVAMENTE INCLUINDO OS PONTOS PRETOS SEGUIDOS PELA PRIMEIRA LETRA DE CADA AMINOÁCIDO CONSTITUINTE. (A) EPÓXIDO HIDROLASE DE *A. radiobacter*, (B) BREFELDIN A ESTERASE DE *B. subtilis*, (C) CARBOXILESTERASE DE *Pseudomonas fluorescens*, (D) LIPASE DE *S. exfoliatus*, (E) LIPASE DE *P. aeruginosa*, (F) ACETILXILANA ESTEARASE DE *P. purpurogenum*. ADAPTADO DENARDINI e DIJKSTRA (1999).

Foi criado um banco de dados exclusivo para esta classe de enzimas, denominado ESTHER (Esterases and alpha/beta-Hydrolase Enzymes and Relatives) encontrado no endereço eletrônico <http://bioweb.ensam.inra.fr/esther>. Este servidor reúne e anota toda informação publicada relacionada com os genes e sequências de proteínas desta superfamília, bem como dados bioquímicos, farmacológicos e estruturais, de forma a conectá-los disponibilizando bases para estudar a estrutura e relações funcionais dentro da família de enzimas (LENFANT *et al.*, 2013).

2.3 HIDROLASES: ESTERASES E LIPASES.

A natureza das hidrolases com atividade lipolítica é diversa, elas ocorrem em plantas, animais e microrganismos, podendo ser classificadas de acordo com esta origem: vegetal, animal e microbianas. Independentemente de sua origem, elas funcionam catalisando tanto a síntese quanto a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos (figura 4), a aplicabilidade biotecnológica destas enzimas envolvem ambos os sentidos de reação. Assim como as glicosil-hidrolases e proteases, as lipases e esterases de origem microbiana possuem maior importância industrial por serem mais estáveis (em comparação com as enzimas vegetais e animais) e podem ser obtidas em grandes quantidades. Mais de 50% destas enzimas são produzidas por leveduras e sintetizadas sob a forma de várias isoenzimas codificadas por diferentes genes. Entre muitas leveduras produtoras de lipase a *Candida rugosa* é mais frequentemente utilizada (JYOTI VAKHLU e AVNEET KOUR 2005).

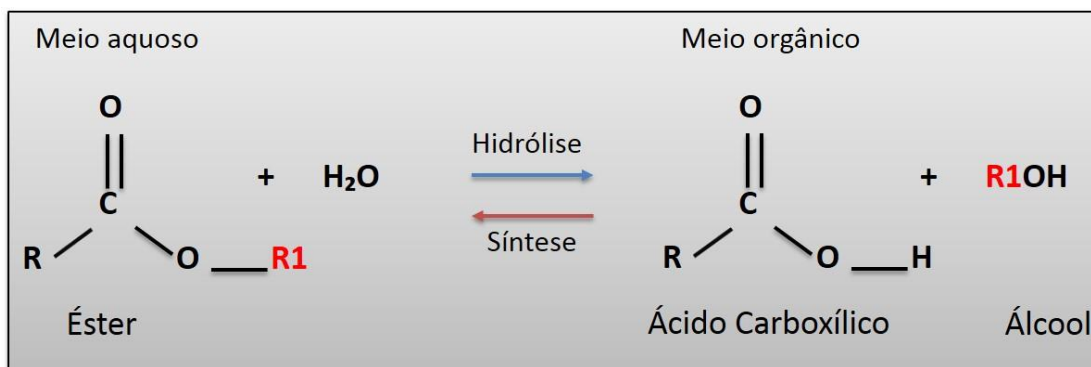


FIGURA 4. REAÇÃO CATALISADA POR LIPASES.

EM MEIO AQUOSO OCORRE A HIDRÓLISE DO ÉSTER GERANDO ÁCIDO CARBOXÍLICO E ÁLCOOL COMO PRODUTO DE REAÇÃO, EM MEIO ORGÂNICO A CATÁLISE OCORRE NO SENTIDO INVERSO SINTETIZANDO ÉSTER DE ÁCIDO GRAXO A PARTIR DE ALCOOL E ÁCIDO CARBOXÍLICO.

Uma diferenciação muito utilizada entre lipases e esterases está relacionada aos substratos utilizados por elas. Esterases são enzimas lipolíticas que utilizam triacilgliceróis de cadeia carbônica mais curta como substrato (<10 átomos) enquanto lipases são aquelas capazes de catalisar reações envolvendo triacilgliceróis de cadeia carbônica maior (>10 átomos) (JAEGER, DJKSTRA e REETZ, 1999). Muitas destas enzimas foram estudadas nas últimas décadas, estes estudos constataram alguns padrões bioquímicos

como a atividade catalítica dependente de íons cálcio, pH, temperatura, e reações que são capazes de catalisar (ARPIGNY e JAEGER 1999).

As lipases bacterianas podem ser classificadas em oito famílias diferentes de acordo com similaridade entre suas sequências de aminoácidos (famílias I à VIII). A família I é a maior e possui seis subdivisões (subfamília I.1 à I.6), as subfamílias I.1 e I.2 compreendem as lipases do gênero *Pseudomonas*. A primeira lipase purificada e a mais estudada pertence à espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Esta enzima possui vasta aplicabilidade industrial por apresentar especificidade para uma grande variedade de substratos (NARDINI *et al.*, 2000). Estas subfamílias de lipases (I.1 e I.2) possuem um sítio catalítico constituído pelos resíduos de aminoácidos Ser-His-Asp (tríade catalítica) (BRUMLIK e BUCKLEY, 1996), onde o resíduo Ser está localizado em um pentapeptídeo semi conservado Gly(Ala)-X1-Ser-X2-Gly (JAEGER *et al.*, 1994) ou Gly-X1-Ser-X2-Ser (BRUMLIK e BUCKLEY, 1996), estas enzimas também são chamadas de “GxSxG” (JAEGER *et al.*, 1994).

Ao invés de apresentarem o pentapeptídeo convencional “GxSxG” as enzimas lipolíticas agrupadas na família II (GDSL) apresentam os resíduos Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)] contendo no sítio catalítico o resíduo serina (ARPIGNY e JAEGER 1999).

Uma característica importante das lipases é o fenômeno de ativação interfacial, que se refere ao aumento da atividade enzimática na interface lipídio-água dos substratos. No topo do sítio catalítico da enzima existe um subdomínio denominado “tampa” ou “Lid” (figura 5) que interage com a interface lipídeo/água e sofre uma mudança conformacional. Na ausência da interface a “tampa” encontra-se fechada e o sítio catalítico inacessível ao substrato.

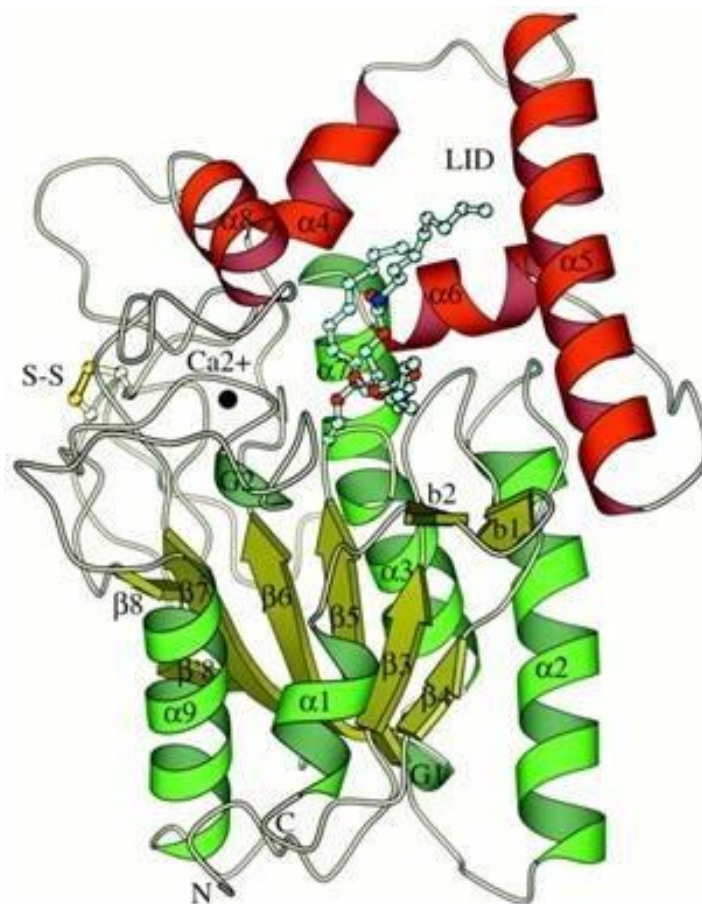


FIGURA 5. ESTRUTURA DA LIPASE DE *Pseudomonas aeruginosa*.

α -HÉLICES E FOLHAS- β ESTÃO REPRESENTADAS PELAS ESPIRAIS E SETAS RESPECTIVAMENTE, AS α -HÉLICES EM VERMELHO PERTENCEM AO DOMÍNIO ENVOLVIDO COM A LIGAÇÃO ENZIMA-SUBSTRATO ONDE SE ENCONTRA A “TAMPA” (LID) (BRUMLIK e BUCKLEY, 1996).

As lipases destas subfamílias usualmente são codificadas em um operon contendo um segundo gene responsável pela expressão de uma chaperona denominada Lif (*Lipase-specific-foldase*) essencial para o correto dobramento estrutural da enzima ativa (figura 6-A). Uma análise detalhada com base na homologia entre aminoácidos resultou na classificação destas chaperonas em quatro diferentes famílias Lif (I – IV) e revelou a presença de um motivo estrutural conservado entre elas Rx1x2FDY(F/C)L(S/T)A. Estas Lifs são ancoradas na membrana através de uma α -hélice interior hidrofóbica N-terminal com o domínio C-terminal localizado no periplasma e são denominadas chaperonas estéricas, pois exercem a sua função fisiológica através da redução das barreiras energéticas durante o dobramento das lipases e sua ancoragem a membrana não é essencial a sua função (figura 6-B) (PAUWELS *et al.*, 2005).

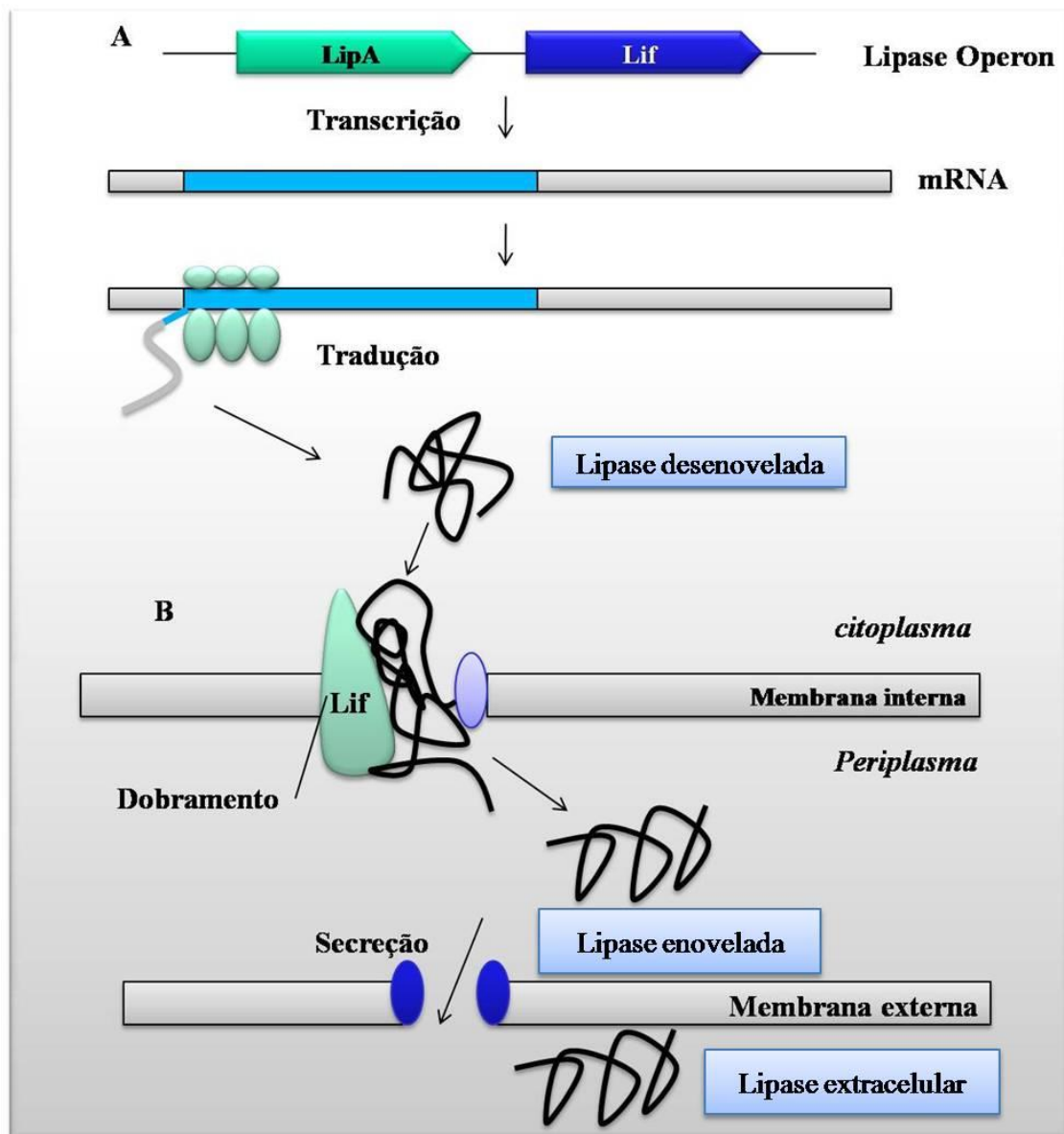


FIGURA 6. EXPRESSÃO DE CHAPERONA E LIPASE EM BACTÉRIAS.

(A) TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO DOS GENES DA LipA (LIPASE) E CHAPERONA (Lif), (B) FUNCIONAMENTO DA CHAPERONA PARA DOBRAMENTO DA LIPASE. ADAPTADO DE ROSENAU *et al.*, (2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar uma nova lipase a partir de clones de uma biblioteca metagenômica de solo contaminado com gordura animal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar 192 clones metagenômicos previamente selecionados com atividade lipolítica e selecionar aqueles que apresentam os maiores halos de hidrólise nos meios de cultura contendo trioleína 1%;
- Purificar os fosmídeos dos clones selecionados e verificar duplicidade através do perfil de restrição de cada clone;
- Construir sub-bibliotecas dos clones metagenômicos selecionados utilizando o vetor de clonagem pUC19;
- Realizar a triagem das sub-bibliotecas em meios de cultura contendo trioleína para selecionar clones com atividade lipolítica;
- Sequenciar os clones identificados e analisar os genes que codificam para lipases.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PLASMÍDEOS, VETORES E MICRORGANISMOS

Foram isolados doze clones pertencentes às bibliotecas metagenômicas PL1A e PL2A (GLOGAUER *et al.*, 2011), denominados D2, D9, D10, E3, E4, E7, E9, F6, F7, F9, G5 e H5 para que tivessem seus vetores recombinantes (pCC2FOS) digeridos pela enzima de restrição *EcoRI*, e os fragmentos gerados utilizados como insertos em nova clonagem.

Foi utilizado o vetor plasmidial de clonagem pUC19 e células hospedeiras da estirpe TOP 10 de *E.coli*, para construção das sub-bibliotecas metagenômicas E7EcoRI (originária do clone E7), E4EcoRI (originária do clone E4) e D2EcoRI (originária do clone D2) (tabelas 1 e 2).

TABELA 1 VETORES

Vetores	Característica	Referência
pCC2FOS	<i>lacZ</i> , Sítio Cos, <i>OriV</i> , <i>Ori2</i> , Cm ^R	EPICENTRE
pUC19	<i>lacZ</i> , Amp ^R	Invitrogen

TABELA 2 ESTIRPES DE *Escherichia coli*

Estirpes	Fenótipo/Genótipo	Referência
TOP 10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139$ $\Delta(ara leu) 7697 galUgalK rpsL (StrR)$ <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
EPI300	[F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ (StrR) $\phi 80d lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 endA1$ $araD139 \Delta(ara, leu)7697 galUgalK \lambda-$ <i>rpsL nupG trfA tonA dhfr]</i>	Epicentre

4.2 MEIOS DE CULTIVO

Foram utilizados os meios de cultivo suplementados descritos na tabela 3 para promoção do crescimento das estirpes de *E.coli*, preparados conforme SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989).

TABELA 3 MEIOS UTILIZADOS PARA CULTIVO E CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS

Meio de cultivo	Composição	Concentração
LB (Luria Bertani)	Triptona Extrato de Levedura NaCl	10g/L 5g/L 10g/L
LB ágar (LA)	Triptona Extrato de Levedura NaCl Agar	10g/L 5g/L 10g/L 15g/L
LA + tributirina 1%	Triptona Extrato de Levedura NaCl Agar Goma arábica Tributirina CaCl ₂ 2mM	10g/L 5g/L 10g/L 15g/L 5g/L 10mL/L 20mL/L
LA + trioctanoína 1%	Triptona Extrato de Levedura NaCl Agar Goma arábica Trioctanoína CaCl ₂ 2mM	10g/L 5g/L 10g/L 15g/L 5g/L 10mL/L 20mL/L
LA + trioleína 1%	Triptona Extrato de Levedura NaCl Agar Goma arábica Trioletina CaCl ₂ 2mM	10g/L 5g/L 10g/L 15g/L 5g/L 10mL/L 20mL/L

4.3 ANTIBIÓTICOS

Para crescimento, manutenção e seleção das estirpes de *E. coli* e dos plasmídeos foram utilizados os seguintes antibióticos: cloranfenicol 12,5 µg/mL (Cm12,5), cloranfenicol 30 µg/mL (Cm30), ampicilina 250 µg/ml (Amp250), estreptomicina 40 µg/mL (Sm40) e canamicina 50 µg/mL (Km50). Os antibióticos ampicilina, estreptomicina e canamicina foram preparados utilizando água ultrapura nas respectivas concentrações estoques 250, 40 e 100 mg/mL, posteriormente as soluções foram esterilizadas por filtração utilizando membrana HAWP 0,22 µm. Cloranfenicol foi preparado em etanol 95% (m/v) na concentração estoque de 30 mg/mL. As soluções de antibióticos foram armazenadas a -20°C.

4.4 REAGENTES GERAIS

Enzimas de restrição, RNase, tampões e sais utilizados para preparo de soluções foram todos de alto grau de pureza (grau biologia molecular) obtidas de diferentes fornecedores.

4.5 BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS

Os clones de partida utilizados no presente trabalho foram obtidos a partir de duas sub-bibliotecas metagenômicas (PL1A e PL2A) selecionadas a partir de uma biblioteca contendo cerca de 500 mil clones (GLOGAUER *et al.*, 2011), construída a partir de um solo contaminado com gordura animal e utilizando o vetor pCC2FOS, conforme o diagrama de blocos da figura 7.

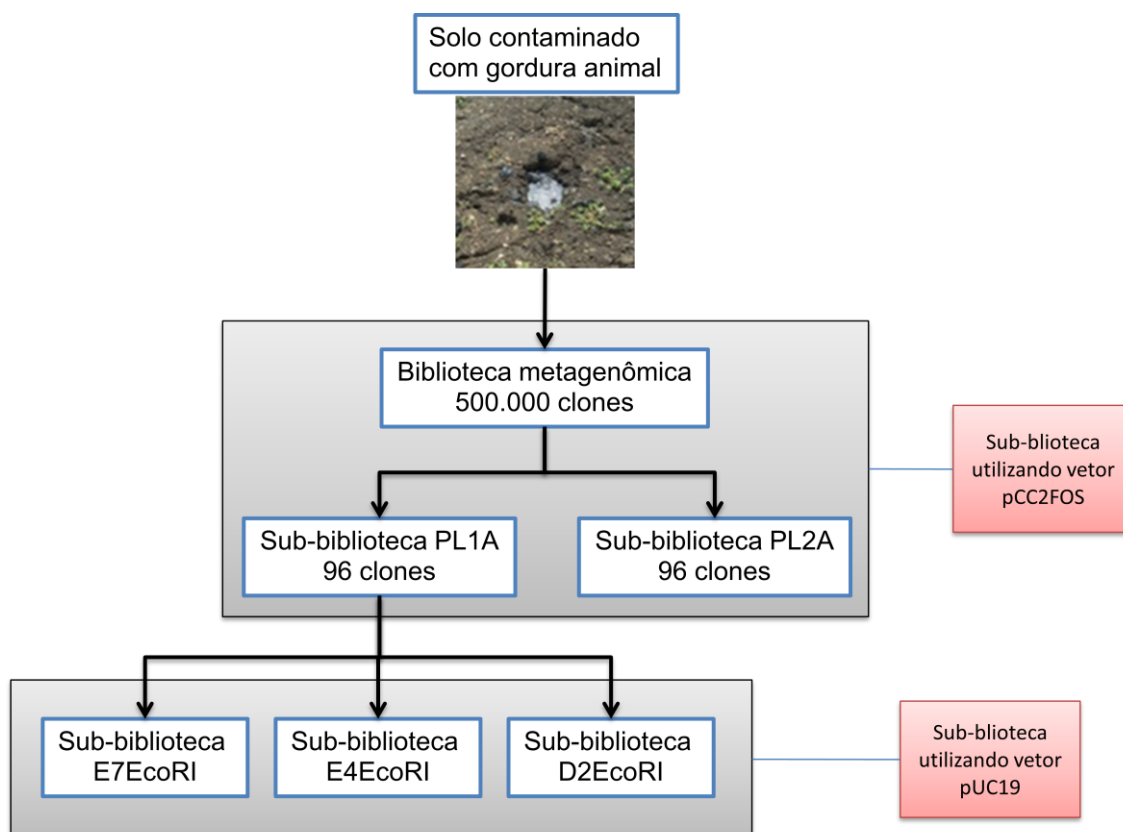


FIGURA 7. BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS.

ESQUEMA INDICANDO A ORIGEM DAS SUB-BIBLIOTECAS PL1A E PL2A EM pCC2FOS (GLOGAUER *et al.*, 2011) E E7EcoRI, E4EcoRI e D2EcoRI EM pUC19.

4.6 PREPARO DAS CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÕES BACTERIANAS

As estirpes de *E.coli* utilizadas no processo de eletroporação foram cultivadas em 100 mL de meio LB até D.O.600nm de 0,6. Posteriormente a suspensão foi resfriada em gelo por 30 minutos. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação em tubos do tipo falcon de 50mL à 300xg por 5 minutos a 4°C em centrífuga do tipo *Hitachi himac CR21*. O precipitado de células foi lavado duas vezes com água ultrapura autoclavada e gelada e uma vez com glicerol 10% gelado, finalmente foi suspenso em 1 mL de glicerol 10%.

A eletroporação foi executada com alíquotas de 100µL de células eletrocompetentes utilizando 1µL de DNA oriundo da reação de ligação, 1µL da reação de inserção de transposon ou 0,5 µL de DNA proveniente de plasmídeo purificado.

A mistura foi transferida para o interior de uma cubeta de eletroporação de 0,4 cm (BioRad). As cubetas foram submetidas a choque elétrico de 2,5 kV

no interior da câmara de eletroporação utilizando equipamento eletroporador *Gene Pulser II (BioRad)*. As células foram ressuspensas em 900 µL de meio LB e a mistura foi transferida para um frasco de 10mL previamente esterilizado e levada à agitação de 180rpm por 30 minutos à 37°C. Após o tempo de recuperação das células, as mesmas foram plaqueadas em meio sólido LA com antibióticos específicos para as resistências relacionadas e 30µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) que é reconhecido como substrato para enzima β-galactosidase. As placas foram incubadas em estufa à 37°C por 24 horas.

4.7 CONSTRUÇÃO DAS SUB-BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS

As sub-bibliotecas metagenômicas foram construídas utilizando o vetor pUC19 (Invitrogen) em cinco etapas consecutivas sendo elas: 1º Análise dos clones em pCC2FOS, 2º Extração do vetor fosmidial pCC2FOS recombinante, 3º comparação dos perfis de restrição, 4º Fragmentação dos fosmídeos selecionados e 5º Clonagem em vetor plasmidial pUC19. As etapas estão descritas adiante.

4.7.1 ANÁLISE DOS CLONES EM pCC2FOS

Foi feito o cultivo dos clones das sub-bibliotecas PL1A e PL2A em meios de cultura LB contendo ágar, arabinose 0,001% (m/v), cloranfenicol 12,5 µg/ml e três tipos de triacilgliceróis isoladamente: tributirina 1%, trioleína 1% ou trioctanato1%.

4.7.2 EXTRAÇÃO DO VETOR FOSMIDIAL pCC2FOS RECOMBINANTE

Esta etapa foi realizada através da multiplicação das bactérias em meios de cultivo líquido. As bactérias que apresentaram halos de hidrólise em trioleína 1% foram inoculadas em frascos de cultivo de 25 mL contendo 5mL de meio Luria-Bertani (LB), cloranfenicol 12,5 µg/mL para seleção e 0,001% de L-arabinose para aumento do número de cópias do fosmídeo. A incubação foi feita por aproximadamente 16 horas em agitador orbital (*shaker*) à 37°C. O DNA fosmidial foi purificado de acordo com o protocolo de lise alcalina (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

4.7.3 COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE RESTRIÇÃO

A reação de restrição foi composta por 5 µL de DNA fosmidial purificado pelo método de lise alcalina (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989) 2 µL do tampão apropriado, 0,5 µL da enzima *Bam*HI 10U/µL (Fermentas) e 12,5 µL de água ultrapurificada, o sistema foi levado a incubação à 37°C por 24 horas.

O vetor utilizado para a construção da biblioteca metagenômica (pCC2FOS) apresenta dois sítios de restrição para *Bam*HI que flanqueiam o sítio de clonagem. A utilização desta enzima, portanto, libera o inserto do vetor. Para confirmação dos perfis de restrição, os fosmídeos que apresentaram semelhança quando digeridos com *Bam*HI foram digeridos com 0,5 µL da enzima *Eco*RI 10U/µL (Fermentas) e seus perfis foram novamente comparados.

Foi feita eletroforese em gel de agarose 1% utilizando 8 µL da solução de restrição e 4 µL de FSuds (Sambrook *et al.*, 1989), com a finalidade de avaliar os perfis de digestão de cada clone para que fossem eliminados aqueles que apresentaram perfis iguais.

4.7.4 FRAGMENTAÇÃO DOS FOSMÍDEOS SELECIONADOS

Os fosmídeos purificados foram submetidos novamente ao processo de digestão com a enzima de restrição *Eco*RI com objetivo de se obter fragmentos de DNA com tamanhos variados entre 3 e 10 kb para que fossem utilizados como insertos para clonagem em vetor pUC19. O DNA foi submetido em um sistema contendo 10µL de DNA fosmidial, 3,0µL de tampão apropriado, 0,5µL de enzima de restrição *Eco*RI e água ultrapura q.s.p 16,5µL. A digestão do DNA fosmidial foi feita em tubos de 1,5mL por um período de 2 horas à 37°C.

4.7.5 CLONAGEM EM VETOR PLASMIDIAL pUC19

Os fragmentos de DNA obtidos pela digestão dos fosmídeos selecionados foram utilizados como insertos para clonagem no vetor pUC19 linearizado com a enzima de restrição *Eco*RI. Após ligação, a solução foi utilizada para transformar bactéria *E. coli* estirpe Top10 (Sambrook *et al.*, 1989). A seleção dos transformantes foi realizada na presença de 250 µg/ml de ampicilina e 30 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-

gal) e 1% de tributirina. As colônias que continham o DNA recombinante apresentaram coloração esbranquiçada e ainda apresentaram halo de hidrólise da tributirina adicionada ao meio de cultivo.

4.8 ARMAZENAMENTO DOS CLONES TRANSFORMADOS

As colônias das novas bibliotecas foram inoculadas em placas do tipo ELISA contendo 100 µL de meio de cultura líquido LB contendo ampicilina 250 µg/ml e levadas a incubação à 37°C durante 12 horas. Após a incubação foi adicionado 100µL de glicerol 50% às culturas e as mesmas foram armazenadas em freezer à -20°C.

4.9 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES EM pUC19

O sequenciamento dos clones que apresentaram atividade de lipases compreendeu três etapas, sendo elas: 1º mutagênese aleatória por inserção de transposon, 2º amplificação dos genes por reação em cadeia da polimerase (PCR), 3º Sequenciamento do produto obtido pela PCR e 4º análise das sequências obtidas.

4.9.1 MUTAGÊNESE ALEATÓRIA COM TRANSPOSON

Todos os clones positivos para atividade lipolítica foram submetidos à mutagênese aleatória com transposon. A mutagênese foi realizada utilizando um kit de inserção de transposon EZ:TN <KAN-2> EPICENTRE de acordo com instruções do fabricante. O sistema continha aproximadamente 500 ng de DNA dupla fita, 1 µL de tampão de reação (Tris-acetato pH 7,5 0,5 M, acetato de potássio 1,5 M, acetato de magnésio 0,1 M e espermidina 0,04 M) concentrado 10X, 0,3 µL de transposase (1 U/µL), 0,3 µL de transposon (0,1 pmol/µL) e água ultrapura para um volume final de 10 µL.

A reação foi incubada a 37°C durante 4 horas. Após o término desse período foi adicionado 1 µL de solução de parada (SDS 1% m/v) e a reação levada a incubação à 70°C durante 20 minutos. O sistema de reação foi transformado em *E. coli* estirpe TOP10 e os transformantes foram selecionados em placas de meio sólido LA contendo 50 µg/mL de canamicina. Os clones coletados nessa etapa foram testados em meio sólido contendo 1% de

tributirina (m/v) para seleção de clones que não são capazes de produzir halo de hidrólise indicando que a inserção ocorreu no gene da lipase.

4.9.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Os clones que perderam a atividade lipolítica (indicativo de inserção do transposon em região do gene importante para atividade lipolítica) tiveram seu DNA plasmidial extraído pelo método de lise alcalina conforme SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989) e foram submetidos a reação de PCR utilizando os primers <KAN 2> FP-1 e <KAN 2> RP -1 (tabela 4) fornecidos juntamente com o kit de inserção de transposon EZ:TN <KAN-2> EPICENTRE. A reação foi realizada conforme protocolo *BigDye® Terminator* indicado pelo fabricante *Applied Biosystems*.

TABELA 4- PRIMERS <KAN-2> RP-1 E FP-1

Primer	Orientação
5' - ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC - 3'	Forward (FP-1)
5' - GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG - 3'	Reverse (RP-1)

4.9.3 SEQUENCIAMENTO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO.

As regiões de inserção do transposon foram determinadas por sequenciamento de DNA a partir de suas extremidades. Foi utilizado o método de terminação de cadeia utilizando didesoxirribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977) conforme protocolo *BigDye® Terminator – Applied Biosystems* em seqüenciador automático 3500xL *GeneticAnalyzer*, as seqüências obtidas foram analisadas utilizando a plataforma *Basic Local Alignment Search Tool - BLAST®*.

4.9.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

A identificação de fases de leitura aberta (*Open Reading Frames* ou ORFs), a partir dos contigs reconstruídos, foi realizada com o auxílio do programa Artemis (RUTHERFORD, 2000). O Artemis consiste em um programa anotador de seqüências de DNA que permite a visualização das seis fases de leitura dentro da seqüência submetida a ele. A identificação de ORFs pelo Artemis é realizada basicamente pela procura entre códons de início (início de tradução) e códons de parada (parada de tradução).

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-se o programa BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Sequências de aminoácidos foram comparadas utilizando-se o programa BLASTp (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Em ambos os casos foi utilizado o banco de dados de proteínas não redundantes (nr). A presença de peptídeo sinal foi determinada pelo programa SIGNALIP-4.1 (Petersen *et al.*, 2011). Os dendogramas filogenéticos foram construídos no programa MEGA 6.0 (Tamura, Peterson *et al.*, 2013) utilizando o modelo de distância p. O valor de reamostragem (“bootstrap”) foi de 1000 repetições.

4.10 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES POR REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR)

Nesta etapa foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) para os genes identificados através do sequenciamento utilizando a ferramenta *IDToligoanalyzer* versão 3.1 (tabela 5). O peptídeo sinal presente foi identificado utilizando a ferramenta SIGNALIP-4.1 (Petersen *et al.*, 2011). Esta determinação possibilitou o desenho de primers para clonagem da lipase inteira e truncada (sem o peptídeo sinal).

Os genes codificadores de lipases foram amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em um sistema contendo 1U de Taq DNA polimerase (produção própria), 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 μ M de dNTP, 5 μ L de tampão de reação (Tris-HCl pH 8,4 e KCl 500 mM) concentrado 10X, 1 μ L de MgSO₄ 50 mM, aproximadamente 10 ng de DNA molde (plasmídeo) e água ultrapura para um volume total de 50 μ L. A reação foi realizada em termociclador. Nesta etapa foi escolhida para superexpressão a lipase originária do sub-clone E7EcoRI.

TABELA 5 – “PRIMERS” PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES

Produto	Primer	Orientação	Nomenclatura utilizada	Sítio de Restrição
Lipase	5'ATGGAC <u>CATATG</u> AAAA AATGGCTATTGGTGCTG	Forward	LipE7	<i>NdeI</i>
Lipase	5'GCCATG <u>GAATTC</u> TCAT AACCCAGTCTCTG	Reverse	LipE7	<i>EcoRI</i>
Lipase truncada	5'GGG <u>CATATG</u> GCAGGT TATACCCAG	Forward	LipE7-Trunc	<i>NdeI</i>
Lipase truncada	5'GCCATG <u>GAATTC</u> TCAT AACCCAGTCTCTG	Reverse	LipE7-Trunc	<i>EcoRI</i>
Chaperona	5'ACTGGG <u>CATATG</u> AAC AAGGCATGGCTGATG	Forward	ChapE7	<i>NdeI</i>
Chaperona	5'TTATTG <u>GAATTC</u> TCAC TCGCCAGCCTGAGC	Reverse	ChapE7	<i>EcoRI</i>
Lipase	5'ATGGAC <u>CATATG</u> AAAA AATGGCTATTGGTGCTG	Forward	LipE7	<i>NdeI</i>
Lipase	5'GCCATG <u>GGTACC</u> TCA TAACCCAGTCTCTG	Reverse	LipE7	<i>KpnI</i>
Lipase truncada	5'GGG <u>CATATG</u> GCAGGT TATACCCAG	Forward	LipE7-Trunc	<i>NdeI</i>
Lipase truncada	5'GCCATG <u>GGTACC</u> TCA TAACCCAGTCTCTG	Reverse	LipE7-Trunc	<i>KpnI</i>
Chaperona	5'ACTGGG <u>CATATG</u> AAC AAGGCATGGCTGATG	Forward	Chap-E7	<i>NdeI</i>
Chaperona	5'TTATTG <u>GGTACC</u> TCAC TCGCCAGCCTGAGC	Reverse	Chap-E7	<i>KpnI</i>

5 RESULTADOS

A partir de uma biblioteca metagenômica construída a partir de solo de uma lagoa de efluentes de gordura animal de uma indústria de alimentos (Glogauer *et al.*, 2011) foram isolados 192 clones com potencial atividade lipolítica. Estes clones foram mantidos em placas de 96 poços e indicadas como sub-bibliotecas PL1A e PL2A. Neste trabalho foram analisadas essas bibliotecas a fim de identificar novas lipases.

5.1 ANÁLISES DOS CLONES DAS SUB-BIBLIOTECAS PL1A E PL2A

Inicialmente os clones das sub-bibliotecas PL1A e PL2A foram inoculados em meios de cultivo suplementados com três diferentes tipos de triacilgliceróis: tributirina, trioctanoína e trioleína. A formação de halo de hidrólise permite verificar a atividade de degradação do triacilglicerol adicionado ao meio.

As lipases consideradas verdadeiras são aquelas que possuem a capacidade de hidrolisar triacilglicerol de cadeia longa, sendo esta a característica central de diferença com as esterases. A finalidade desta etapa foi verificar quais clones oriundos das sub-bibliotecas PL1A e PL2A eram capazes de hidrolisar os diferentes tipos de triacilglicerol e ainda identificar quais deles apresentavam atividade de uma lipase verdadeira (figuras 8 a10). Os clones que apresentaram os maiores halos de hidrólise contra trioleína (maior cadeia carbônica) foram selecionados para as etapas seguintes.

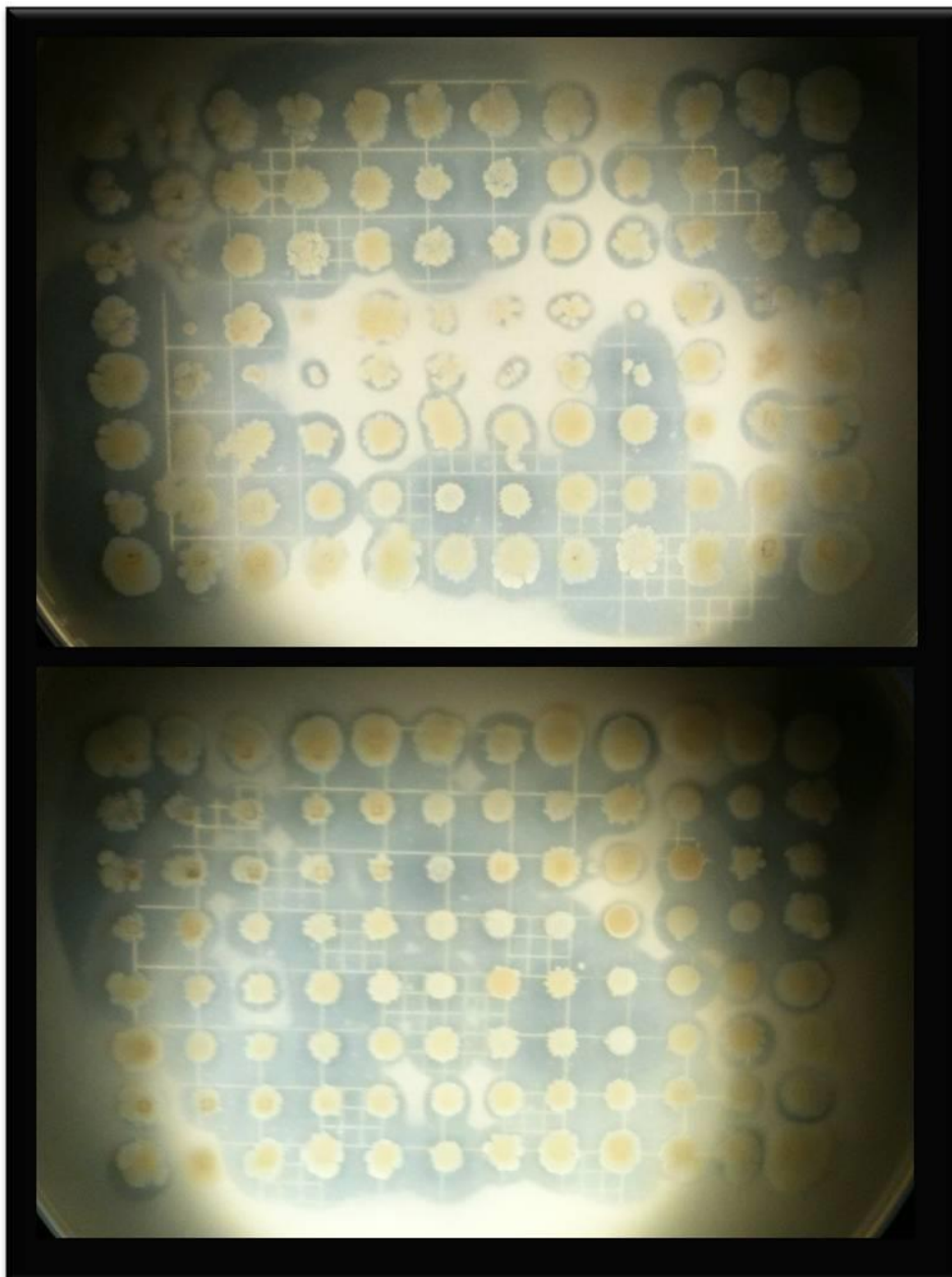


FIGURA 8. CLONES DAS SUB-BIBLIOTECAS PL1A E PL2A (SUPERIOR E INFERIOR RESPECTIVAMENTE) CULTIVADAS EM MEIO LA CONTENDO 1% DE TRIBUTIRINA. AS PLACAS FORAM CULTIVADAS A 37°C POR 72 HORAS E AS REGIÕES TRANSLÚCIDAS CORRESPONDEM AO HALO DE HIDRÓLISE DA TRIBUTIRINA.

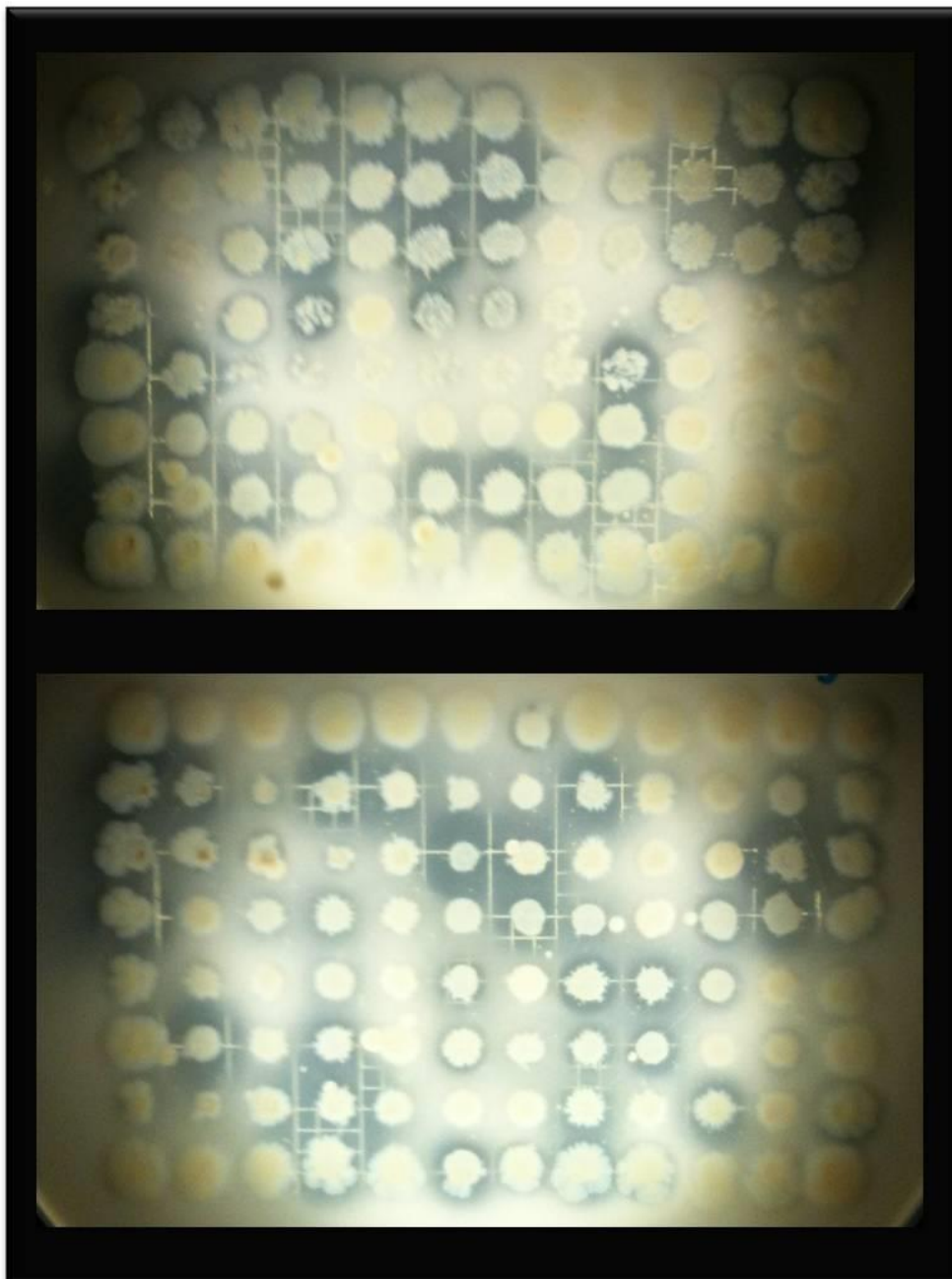


FIGURA 9. CLONES DAS SUB-BIBLIOTECAS PL1A E PL2A (SUPERIOR E INFERIOR RESPECTIVAMENTE) CULTIVADAS EM MEIO LA CONTENDO 1% DE TRIOCTANOÍNA. AS PLACAS FORAM CULTIVADAS A 37°C POR 72 HORAS E AS REGIÕES TRANSLÚCIDAS CORRESPONDEM AO HALO DE HIDRÓLISE DO TRIOCTANOÍNA.

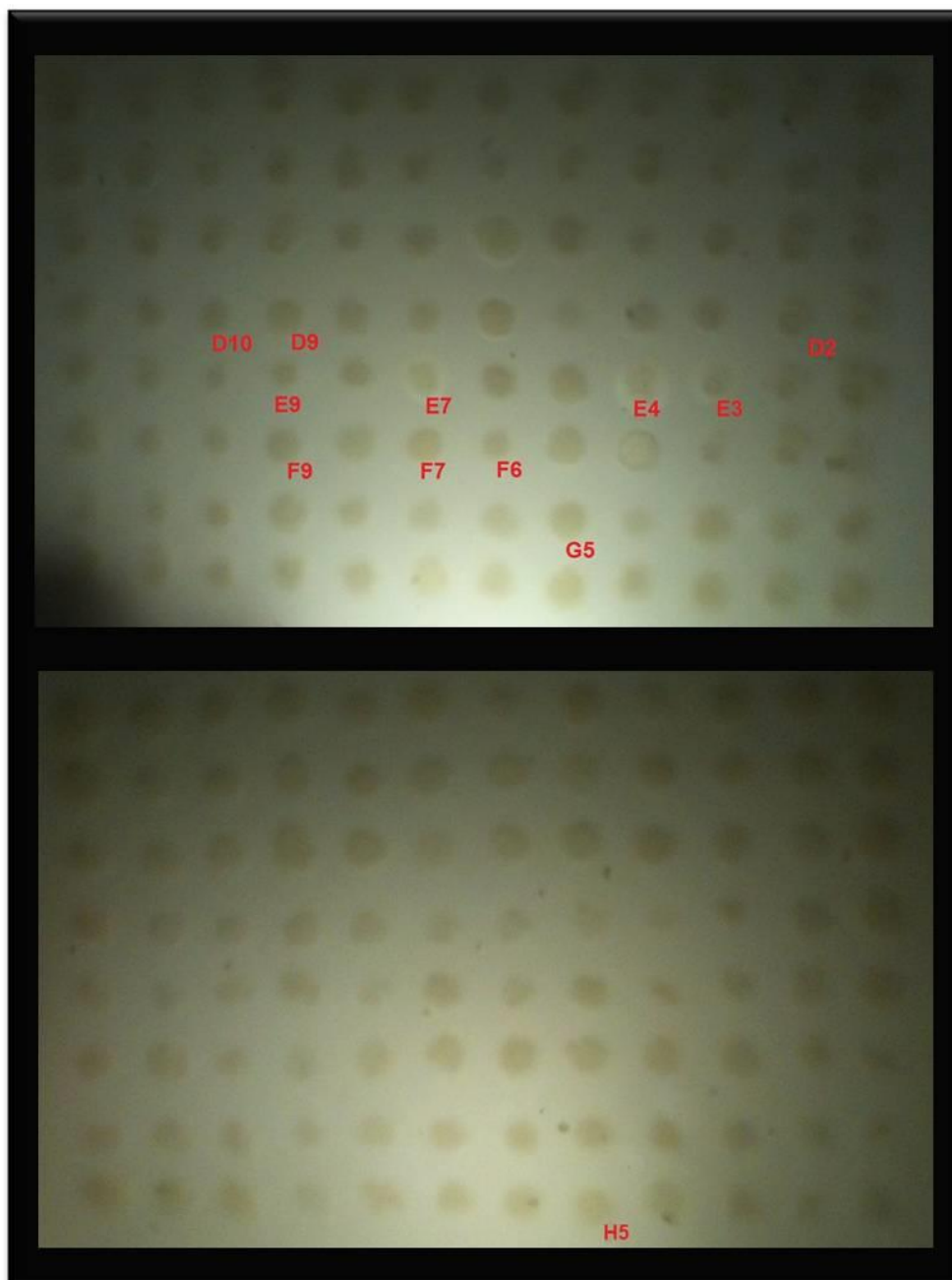


FIGURA 10. CLONES DAS SUB-BIBLIOTECAS PL1A E PL2A (SUPERIOR E INFERIOR RESPECTIVAMENTE) CULTIVADAS EM MEIO LA CONTENDO 1% DE TRIOLEÍNA.

AS PLACAS FORAM CULTIVADAS A 37°C POR 72 HORAS E AS REGIÕES TRANSLÚCIDAS CORRESPONDEM AO HALO DE HIDRÓLISE DA TRIOLEÍNA. EM VERMELHO ESTÃO INDICADOS OS CLONES ESCOLHIDOS PARA CONTINUAR OS ESTUDOS.

Foram selecionados os clones D2, D10, D9, E3, E4, E7, E9, F6, F7, F9 e G5 oriundos da biblioteca PL1A e o clone H5 oriundo da biblioteca PL2A para dar continuidade às próximas etapas.

5.2 ANÁLISES DOS CLONES SELECIONADOS

Após a seleção dos clones das sub-bibliotecas PL1A e PL2A realizou-se a extração dos fosmídeos a fim de verificar uma possível duplicidade de clones utilizando perfil eletroforético. Os fosmídeos purificados foram digeridos com a enzima de restrição (*Bam*HI e *Eco*RI) e os perfis obtidos foram comparados (figuras 11 e 12).

A enzima de restrição *Bam*HI corta o fosmídeo pCC2FOS em duas localizações distintas 353 e 407, liberando o inserto clonado, além de cortar o inserto nas sequências de reconhecimento da enzima distribuídos em sua extensão. O perfil de restrição da enzima *Bam*HI é apresentado na figura 10.

Os fosmídeos oriundos dos clones E7, E4, F6, E9, F7, e F9 apresentaram certa semelhança no perfil de bandas quando digeridos com a enzima de restrição *Bam*HI, portanto estes foram selecionados para digestão com a enzima de restrição *Eco*RI a fim de verificar se realmente eram idênticos (figura 12).

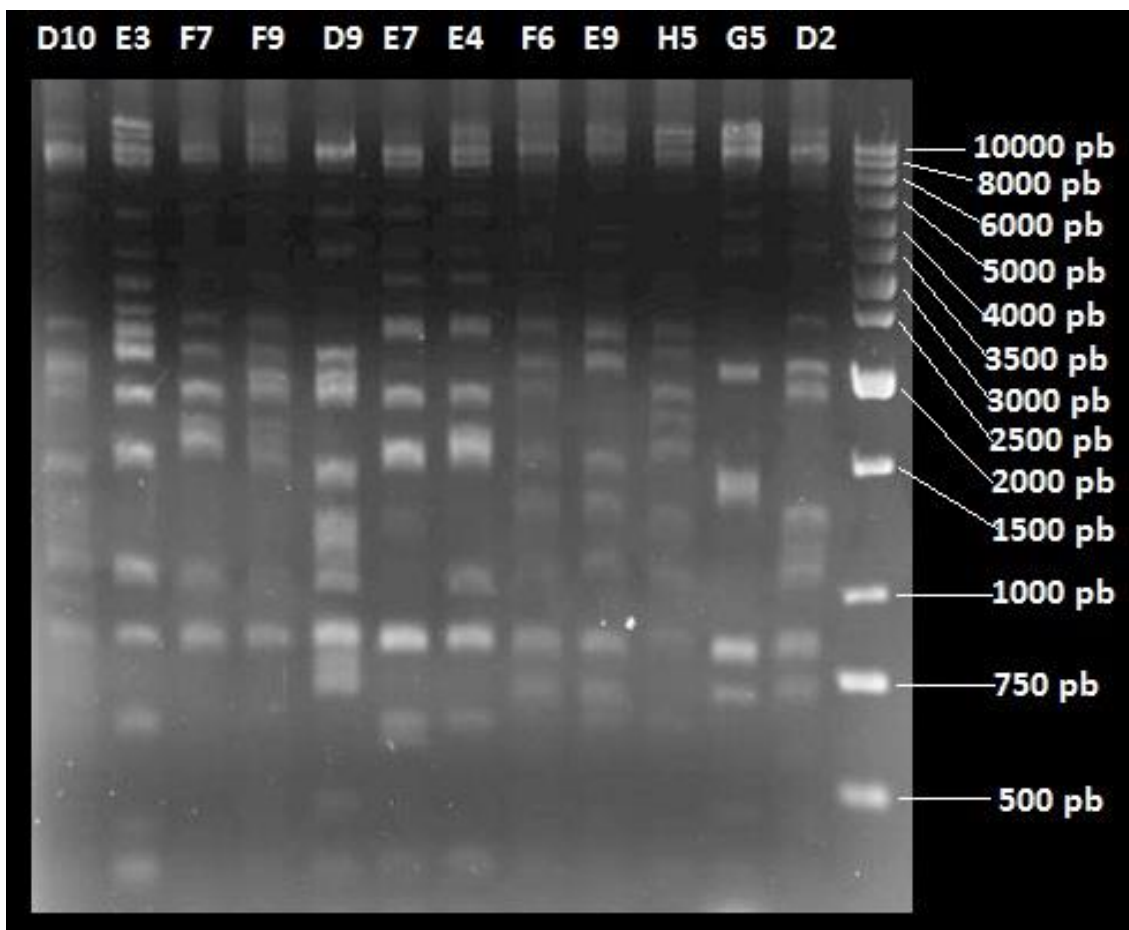


FIGURA 11. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DOS FOSMÍDEOS DIGERIDOS COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bam*HI.

OS FOSMÍDEOS EXTRAÍDOS DOS CLONES ISOLADOS DAS SUB-BIBLIOTECAS PL1A E PL2A ESTÃO INDICADOS BEM COMO O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 1KB LADDER. O GEL FOI CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO E A IMAGEM REGISTRADA UTILIZANDO SISTEMA DE FOTODOCUMENTAÇÃO UVP.

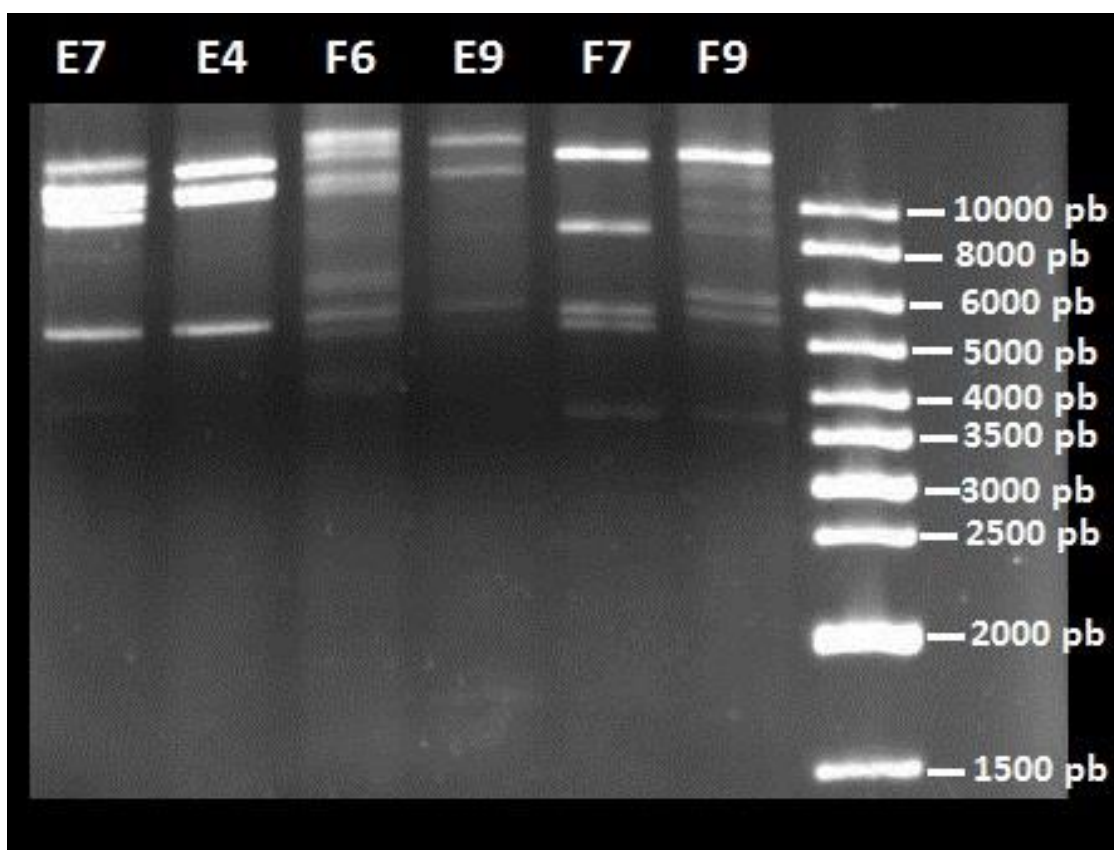


FIGURA 12. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DOS FOSMÍDEOS DIGERIDOS COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *EcoRI*.

OS CLONES ESTÃO INDICADOS BEM COMO O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 1KB LADDER. O GEL FOI CORADO COM BROMETO DE ETIDEO E A IMAGEM REGISTRADA UTILIZANDO SISTEMA DE FOTODOCUMENTAÇÃO UVP.

Os foscídeos extraídos dos clones isolados das sub-bibliotecas PL1A e PL2A que apresentaram perfis semelhantes quando digeridos com a enzima de restrição *Bam*HI foram novamente digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI a fim de verificar se realmente eram iguais. A restrição com a enzima *Eco*RI indicou que os foscídeos possuem perfis diferentes, sugerindo portanto que todos os 12 clones isolados das sub-bibliotecas PL1A e PL2A são potencialmente distintos.

5.3 CONSTRUÇÃO DAS SUB-BIBLIOTECAS A PARTIR DOS FOSMÍDEOS ISOLADOS.

Os foscídeos isolados apresentam insertos da ordem de 40kb, dificultando o sequenciamento e a identificação do gene da lipase. Diversas tentativas foram realizadas a fim de construir bibliotecas utilizando clonagem tipo “shot-gun”, porém, sem sucesso (dados não mostrados). Desta forma a estratégia utilizada foi a clonagem de fragmentos dos foscídeos após digestão

com a enzima *EcoRI*. Esses fragmentos foram clonados em vetor pUC19 e os clones foram analisados quanto a capacidade de formarem halo de hidrólise de triacilgliceróis.

A construção das sub-bibliotecas foi executada em três etapas distintas, sendo elas: 1º Fragmentação dos fosmídeos das bibliotecas PL1A e PL2A, 2º Ligação dos fragmentos do DNA fosmidial ao vetor pUC19 e seleção dos clones contendo DNA recombinante e 3º Armazenamento dos clones transformados.

5.3.1 DIGESTÃO DOS FOSMÍDEOS DAS BIBLIOTECAS PL1A E PL2A.

Os fosmídeos foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* a fim de obter fragmentos de DNA com tamanhos variados entre 3 e 10 kb, para que esses fragmentos gerados fossem utilizados como insertos na ligação com o novo vetor pUC19. Nesta etapa foram selecionados apenas os clones E7, E4 e D2 oriundos das bibliotecas PL1A. Esta escolha foi feita, pois esses clones apresentaram os maiores halos de hidrólise quando cultivados em meio contendo trioleína.

5.3.2 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO DNA FOSMIDIAL AO VETOR pUC19 E SELEÇÃO DOS CLONES COM DNA RECOMBINANTE

Os fragmentos de DNA obtidos dos clones E7, E4 e D2 foram então clonados no vetor pUC19 linearizado com a enzima de restrição *EcoRI*. Após a ligação, este sistema foi utilizado para transformar bactéria *E. coli* estirpe Top10 (Sambrook *et al.*, 1989). A seleção dos clones transformantes foi realizada na presença de 250 µg/mL de ampicilina e 30 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal) e 1% de tributirina. O X-gal permitiu diferenciar os clones transformantes que possuíam o vetor pUC19 recombinante. Esta diferenciação ocorre, pois o X-gal é utilizado como substrato pela enzima β-galactosidase, como o vetor pUC 19 possui em seu sítio de policlonagem o gene LacZ os clones que não possuíam o vetor recombinante continuariam capazes de utilizar o X-gal como substrato apresentando assim uma coloração azulada, logo os clones que possuíam o vetor recombinante não seriam capazes de hidrolisar o composto X-gal e conseqüentemente não apresentando a coloração azulada.

O meio de cultivo também foi suplementado com tributirina nesta seleção, para visualização de halo de hidrólise do triacilglicerol. A escolha da tributirina é justificada pois a formação do halo de hidrólise ocorre em um período mais curto de incubação quando comparado a trioleína ou trioctanoína. Assim as colônias que possuíam o DNA recombinante contendo sequências de DNA que eram capazes de expressar uma lipase apresentaram coloração esbranquiçada e ainda apresentaram halo de hidrólise da tributirina adicionada ao meio de cultivo, conforme ilustrado na figura 13.

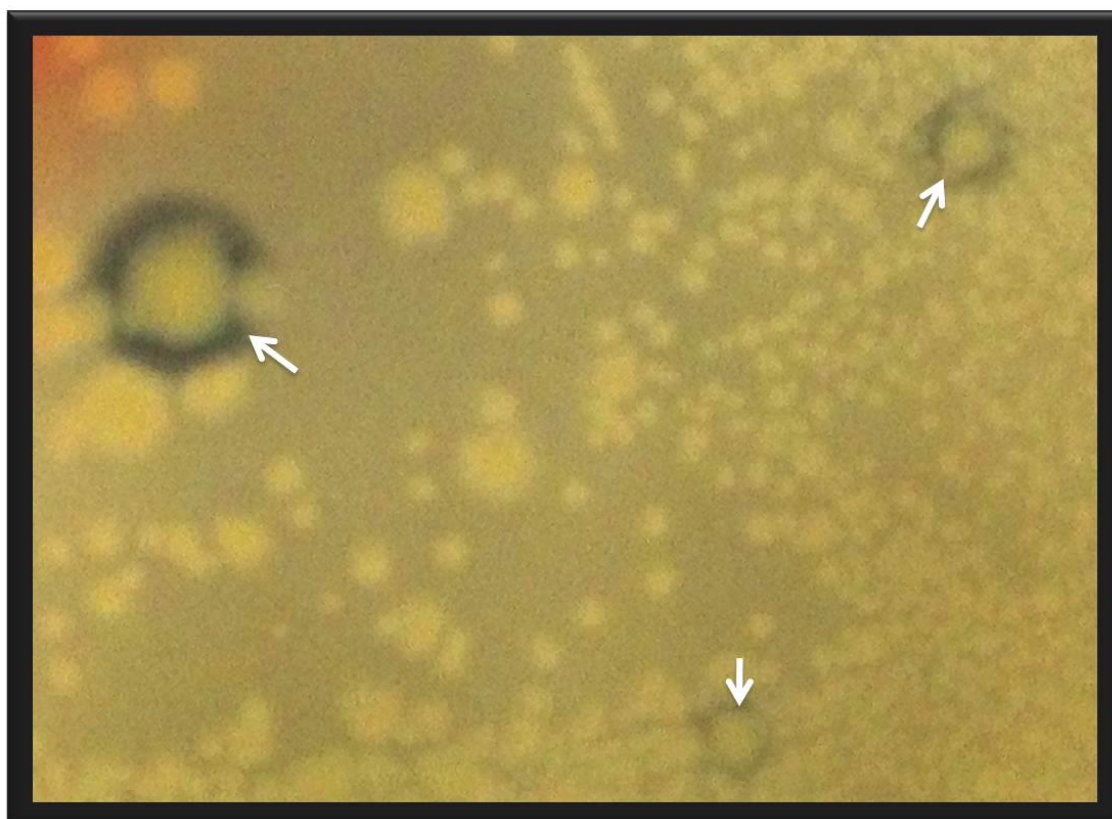


FIGURA 13. TRANSFORMANTES OBTIDOS DA SUBCLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA DO FOSMÍDEO E7.

APÓS A TRANSFORMAÇÃO A SUSPENSÃO BACTERIANA FOI PLAQUEADA EM MEIO LA CONTENDO 1% DE TRIBUTIRINA NA PRESENÇA DE X-GAL E AMPICILINA. APÓS 24 HORAS DE CULTIVO A 37°C OS TRANSFORMANTES FORAM ANALISADOS. PODE-SE OBSERVAR A COLORAÇÃO ESBRANQUIÇADA DAS COLÔNIAS DEVIDO A PERDA DA ATIVIDADE β -GALACTOSIDASE E AINDA A FORMAÇÃO DO HALO DE HIDRÓLISE (INDICADO PELAS SETAS) DA TRIBUTIRINA ADICIONADA AO MEIO DE CULTIVO.

As colônias das novas bibliotecas foram inoculadas em placas do tipo ELISA de 96 poços contendo 100uL de meio de cultura líquido LB suplementado com ampicilina 250 μ g/ml e levadas à incubação a 37°C durante 12 horas. Após este período foi adicionado 100 μ L de glicerol 50% às culturas.

Para cada fosmídeo previamente selecionado, D2, E4 e E7, subclones foram isolados gerando as sub-bibliotecas D2EcoRI (96 clones), E4EcoRI (96 clones) e E7EcoRI (192 clones). Cada sub-biblioteca apresenta clones com ou sem atividade de hidrólise de tributirina com objetivo de permitir a obtenção da sequência dos fosmídeos D2, E4 e E7.

A construção dessas sub-bibliotecas que apresentam insertos da ordem de 10 kb e vetor de alto número de cópias facilita as etapas subsequentes de sequenciamento.

5.4 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DOS SUB-CLONES EM pUC19

Com o objetivo de identificar as lipases codificadas pelos fosmídeos D2, E4 e E7, o sequenciamento foi realizado primeiramente com os subclones que apresentaram atividade de hidrólise de tributirina. O sequenciamento foi executado em duas etapas consecutivas: 1º Mutagênese aleatória por inserção de transposon e cultivo dos transformantes em meio suplementado com tributirina 1%; 2º Sequenciamento e análise das sequências obtidas.

5.4.1 MUTAGÊNESE ALEATÓRIA POR INSERÇÃO DE TRANSPOSON E CULTIVO DOS TRANSFORMANTES EM MEIO SUPLEMENTADO COM TRIBUTIRINA 1%.

A finalidade central desta etapa foi o sequenciamento dos genes de expressão da lipase através da inserção do transposon nesta região, fazendo com que os clones inicialmente ativos perdessem a atividade após a mutagênese, conforme ilustrado nas figuras 14 e 15.

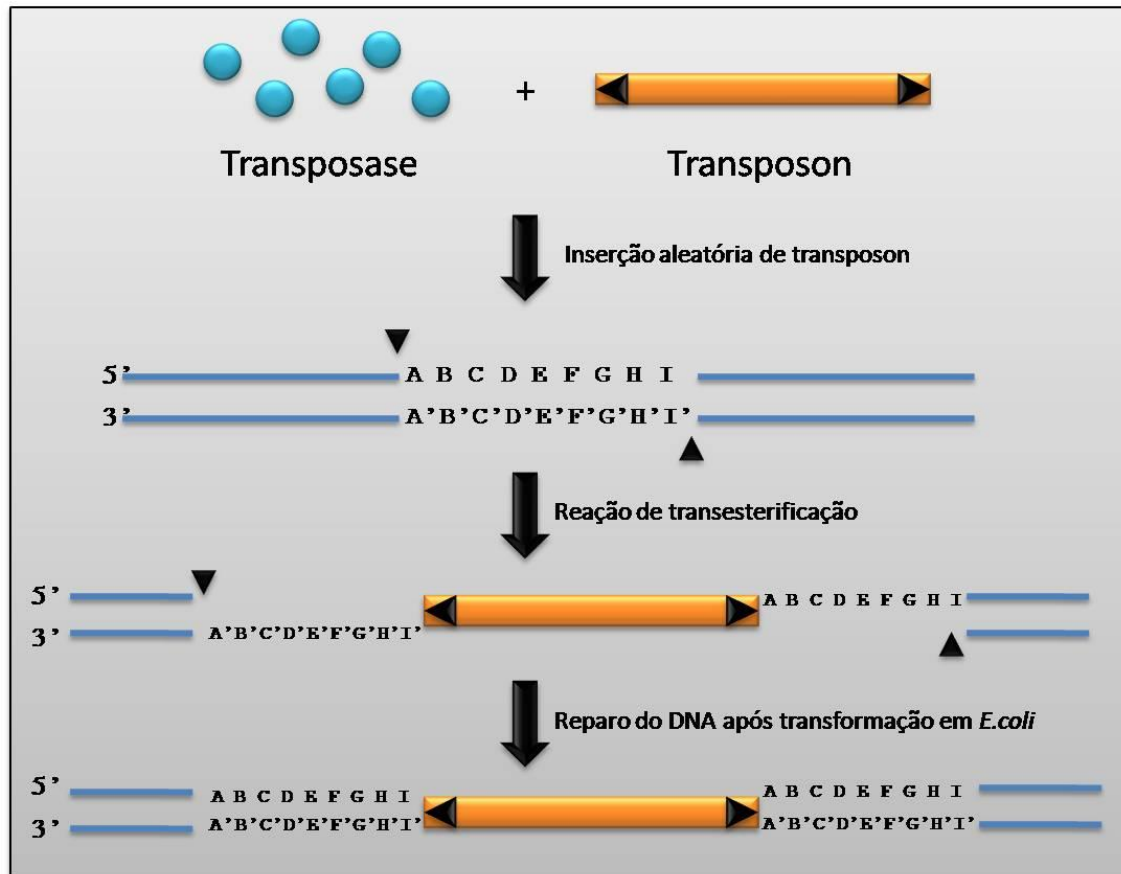


FIGURA 14. ESQUEMA DO PROCESSO DE MUTAGENESE ALEATÓRIA POR INSERÇÃO DE TRANSPOSON.

A COMPOSIÇÃO DO SISTEMA COMPREENDE O DNA ALVO, TRANSPOSON E TRANSPOSASE, POSTERIORMENTE OCORRE UMA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO INSERINDO O TRANSPOSON NO DNA ALVO, APÓS A TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DE *E.coli* O DNA É REPARADO FAZENDO COM QUE O CLONE INICIALMENTE ATIVO PERCA SUA ATIVIDADE LIPOLÍTICA, CASO O TRANSPOSON SEJA INSERIDO NA REGIÃO DE EXPRESSÃO DA LIPASE.

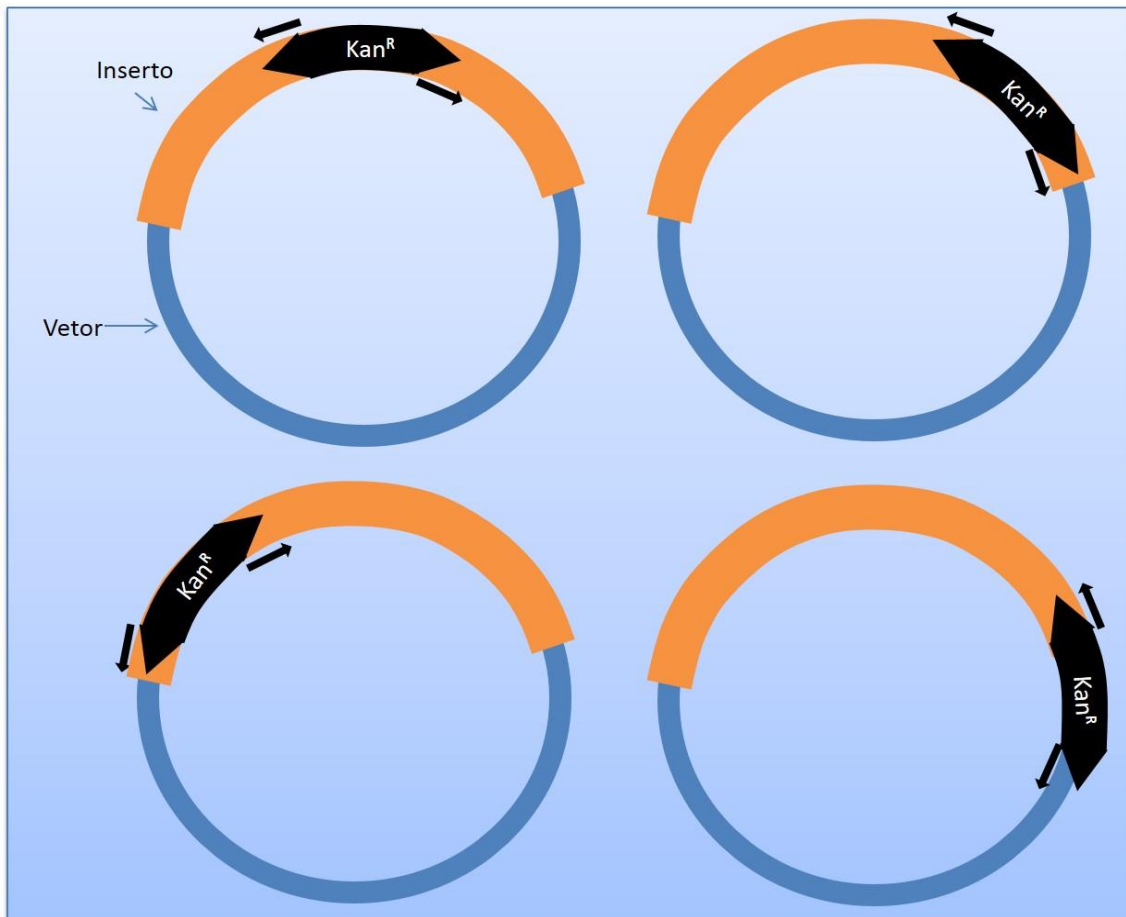


FIGURA 15. ESQUEMA DE INSERÇÃO DE TRANSPOSON EM DIFERENTES REGIÕES DO DNA ALVO.

O TRANSPOSON KanR É INSERIDO EM DIVERSAS REGIÕES DO VETOR RECOMBINANTE POSSIBILITANDO O SEQUENCIAMENTO A PARTIR DE SUAS EXTREMIDADES, A INSERÇÃO PODERÁ OCORRER EM UMA REGIÃO IMPORTANTE PARA EXPRESSÃO DA LIPASE FAZENDO COM QUE O TRANSFORMANTE ORIGINALMENTE ATIVO SE TORNE INATIVO.

O transposon utilizado <KAN-2> possui gene que confere resistência ao antibiótico canamicina. Após a transformação foi feito o cultivo em meios suplementados com canamicina e tributirina para seleção dos transformantes quanto à resistência ao antibiótico e ainda a atividade lipolítica do triacilglicerol adicionado ao meio de cultivo, conforme mostrado pela figura 16.

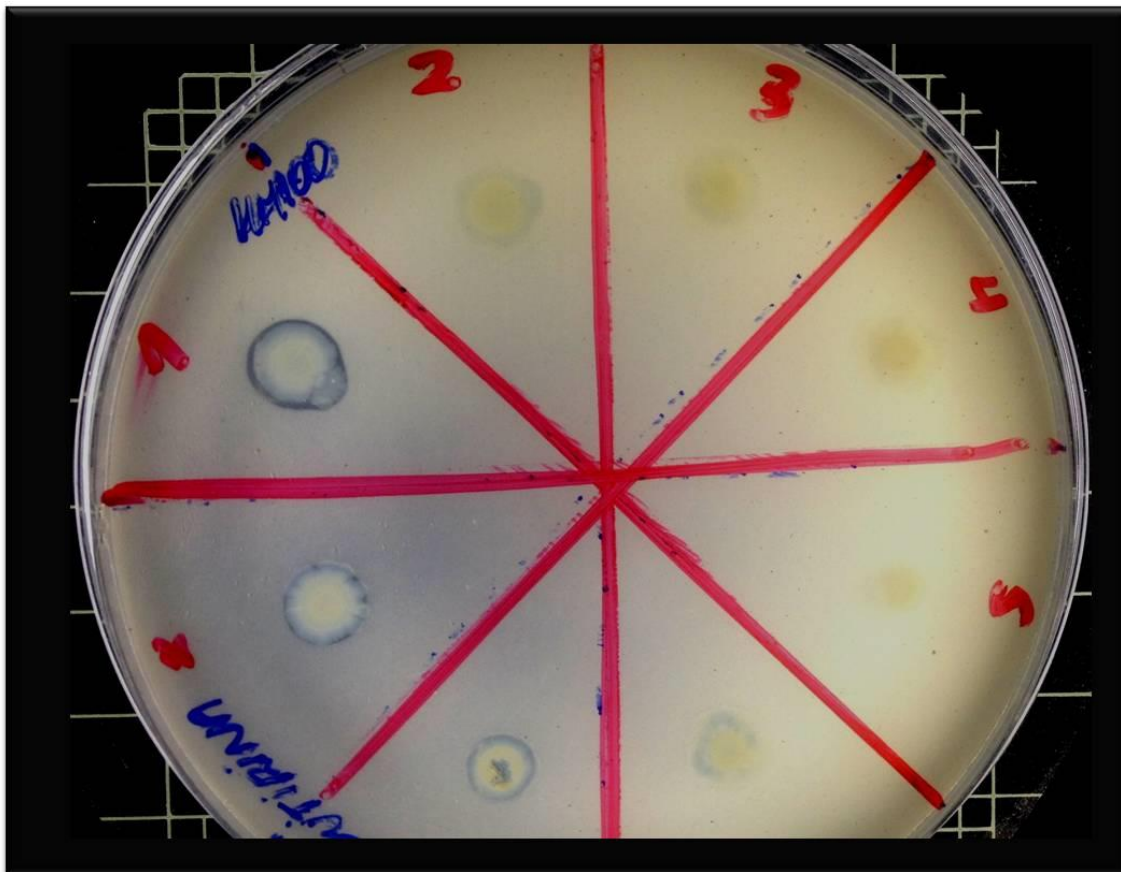


FIGURA 16. TRANSFORMANTES RESISTENTES A CANAMICINA CULTIVADOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM TRIBUTIRINA 1%.

AS PLACAS FORAM MANTIDAS EM INCUBAÇÃO A 37°C POR 48 HORAS. OBSERVA-SE QUE FORAM OBTIDOS CLONES COM OU SEM ATIVIDADE DE DEGRADAÇÃO DE TRIBUTIRINA, OS CLONES QUE APRESENTAM ATIVIDADE TIVERAM O TRANSPOSON FORA DO GENE DE EXPRESSÃO DA LIPASE E AQUELES QUE SOFRERAM PERDA DE ATIVIDADE POSSUEM O TRANSPOSON INSERIDO NUMA REGIÃO IMPORTANTE PARA ATIVIDADE DA LIPASE, SENDO ESSES SELECIONADOS PARA ETAPA DE SEQUENCIAMENTO DE DNA.

Todos os transformantes com inserção de transposon sejam eles ativos ou não foram estocados em novas placas de 96 poços, dando origem a novas bibliotecas denominadas E7EcoRI – Trans, E4EcoRI –Trans e D2EcoRI – Trans.

5.4.2 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUENCIAS OBTIDAS.

O sequenciamento dos transformantes que perderam atividade lipolítica foi feito a partir das extremidades do transposon. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando “primers” específicos que se anelavam nas extremidades do transposon. Nesta etapa 10 clones da

biblioteca E7EcoRI – Trans, 10 clones da E4EcoRI - Trans e 5 clones da biblioteca D2EcoRI – Trans foram utilizados.

Todas as sequências obtidas foram analisadas e anotadas a partir dos contigs reconstruídos com o auxílio do programa Artemis (figura 17). Análise de comparação pelos programas *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST® indicou que os sub-clones E7EcoRI e E4EcoRI codificam para o mesmo gene de uma lipase e o sub-clone D2EcoRI para o gene de outra lipase já identificada anteriormente em outro trabalho (dados não mostrados) assim o sub-clone E7EcoRI foi então selecionado para caracterização. Os resultados do sequenciamento indicaram uma *orf* de 903pb que codifica para uma lipase de 301 aminoácidos e uma ORF de 741pb que codifica para uma chaperona de 247 aminoácidos (figura 18). A comparação realizada pelo programa BLASTx indicou que tanto a lipase quanto a chaperona possuem 98% de identidade com as da espécie *Aeromonas hydrophila*. Através da análise de sequência da LipE7 foi constatada que ela está inserida na família I de lipases bacterianas dependentes de chaperona (*Lipase-specific-foldase*) baseados na classificação proposta por ARPIGNY e JAEGER (1999) e atualizada por JAEGER e EGGERT (2000).

A lipase e chaperona objeto deste trabalho foram denominadas LipE7 e ChapE7 respectivamente.

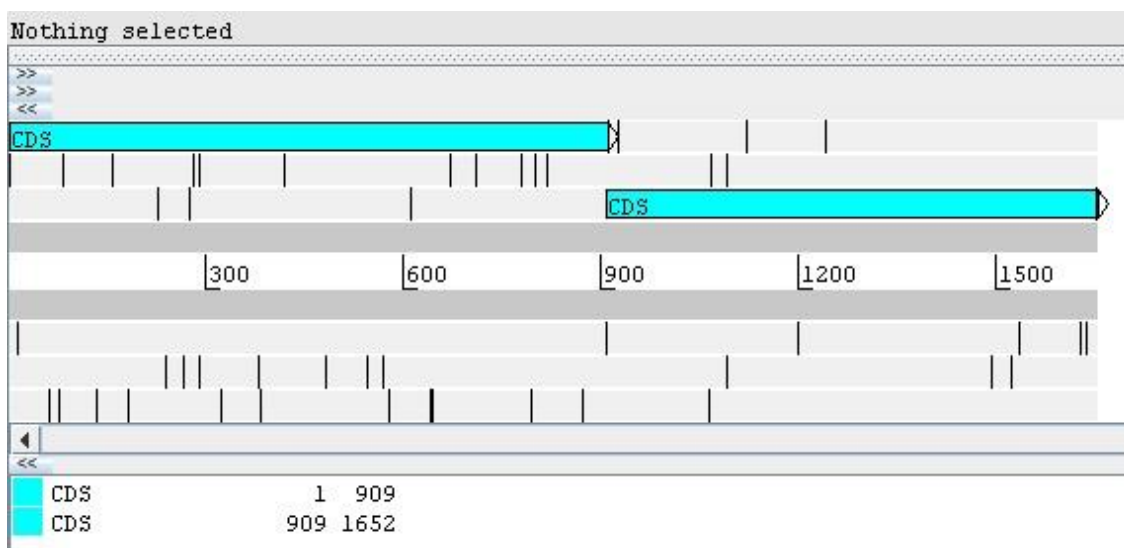


FIGURA 17. ANOTAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PELO PROGRAMA ARTEMIS.

A PRIMEIRA ORF (CDS) DA ESQUERDA PARA DIREITA CORRESPONDE A LIPASE E ESTÁ CONTIDA NA PRIMEIRA FASE DE LEITURA, ADJASCENTE A LIPASE ESTÁ A ORF REFERENTE AO GENOMA CHAPERONA CONTIDA NA TERCEIRA FASE DE LEITURA, FOI CONSTATADA QUE EXISTE UMA SOBREPOSIÇÃO DE TRES NUCLEOTIDEOS (FINAL DA LIPASE E INICIO DA CHAPERONA)

1 atgaaaaaatggctattggtgctgttggtgcgccctgccatgctgggccaggcggcaggt 60
 M K K W L L V L L C A L P M L G Q A A G F1

61 tataccagacccgctaccccatagtgctgggtgcacggcctggtcggttcgacaagctg 120
 Y T Q T R Y P I V L V H G L F G F D K L F1

121 ctcggggtcgactacttgtacggcattccccaggcgtgacccgggacggcgccagggtc 180
 L G V D Y L Y G I P Q A L T R D G A R V F1

181 tacgtggcccaggctctccgccaccagagctcggaaactgcgcggtgagcagctgctcaag 240
 Y V A Q V S A T Q S S E L R G E Q L L K F1

241 caggtacagcaggtgctcgccatcaccggggctgagaaggtgaacctcataggccactcc 300
 Q V Q Q V L A I T G A E K V N L I G H S F1

301 cacggcggccccaccattcgctacgttgctcggtcgccccgagctggtcgctccgcc 360
 H G G P T I R Y V A S V A P E L V A S A F1

361 accagcgtgggggggtcaactacggctcggagatcgccgatctggtacggcgccaacgtg 420
 T S V G G V N Y G S E I A D L V R A N V F1

421 acagcgggctcgggtggccgagaagctggcgggtggccgcgcctcgccctgtccggggtc 480
 T A G S V A E K L A V A A A S A L S G V F1

481 atctcgctgctctccggggcagccagctgcccagcagatccccctcgccgcctcgacgcc 540
 I S L L S G G S Q L P Q D P L A A L D A F1

541 ctcaccagcgcggcgcccagcgttcaaccagcgtatccggaagggttgccagccag 600
 L T S A G A Q R F N Q R Y P E G L P S Q F1

601 tattgcggtgaagggcccatgcagccgccaacgggtctactacttctcctggagcggg 660
 Y C G E G P M Q A A N G V Y Y F S W S G F1

661 cgcggtaccatgaccaacatcctggatccgggtggatccggcgctggcgctgaccggcagc 720
 R G T M T N I L D P V D P A L A L T G S F1

721 ttcttcgaggagcccaacaacggcctggtcgggggtggtgcagcagccacctcggaaggt 780
 F F E E P N N G L V G V C S S H L G K V F1

781 atcggcaccgactaccggatgaaccacctggacgaggtgaaccagtcggttcggcattcgc 840
 I G T D Y R M N H L D E V N Q S F G I R F1

841 cacctggttcgagaccgacccggctcggcctctatcgccagcagccaaccgctgcagaga 900
 H L F E T D P V G L Y R Q H A N R L Q R F1

901 ctggggttatgaacaaggcatggctgatggccgctccactgggagcggccctgctgctgg 960
 L G L *

M N K A W L M A A P L G A A L L L G F3

961 ggggttgccagctgtggccccgccccgagccccgactcggccgcccccttgggcgcaagagg 1020
 G W Q L W P A P S P D S A A P L A Q E A F3

1021 ccgggcccggcctccccctcgcccggcaggccgcttccctcgtcagatgagcactcgctgc 1080
 G P A S P L A R Q A A S S S D E H S L Q F3

1081 aggctcgctatgaggcctttcttgcgcgaaagcagcctgacgggtgccgaccgaccggg 1140
 A R Y E A F L A A E S S L T V P T D P G F3

1141 gcctggccagcctgcagggtgctgttcgaccagcgcgagcagttgcccagcagagcttca 1200
 L A S L Q V L F D Q R E Q L R Q Q S F T F3

1201 ccccggccgagcaggagcagctgtttgcccaggatcggctgatggagcagtgaccctgc 1260
 P A E Q E Q L F A E D R L M E Q W T L R F3

1261 gccgcaaggcgtggcgaggctggcgatgccgacaagccgctgctggcgagcagctcg 1320
 R K A L A E A G D A D K P L L A S E L E F3

1321 agctctggctggcgagcagccccagtggtttcgggaggcggaggccaacagccgctgc 1380
 L W L A E Q P Q W F R E A E A N S R L L F3

```

1381 tcggcgatctgcagagtctggagcgactgcccggcgccgagcgcgacgccgtgctgcgcg 1440
      G D L Q S L E R L P A A E R D A V L R E F3
1441 agcagctgggaccggaggcgccggaccggctgcaccagctggcgagagtcagcaggggt 1500
      Q L G P E A A D R L H Q L A E S Q Q G F F3
1501 tcgagcagcagctggccggctatctggccgaactcaagcccctgcccggcagcggcggg 1560
      E Q Q L A G Y L A E L K P L P A E R R A F3
1561 ccgagcagcagccggagatcctggcgcgctggttcgagcccggccagtgggcgacgggtgg 1620
      E Q Q P E I L A R W F E P G Q W R R V E F3
1621 aagccctcaccggctcagggtggcgagtga 1652
      A L T R L R L G E * F3

```

FIGURA 18. SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS (EM LETRAS MINÚSCULAS) REFERENTE AS *orfs* QUE CODIFICAM PARA A LIPASE E A CHAPERONA.

A NUMERAÇÃO INDICA A POSIÇÃO DE CADA BASE. O PRODUTO DE TRADUÇÃO DE CADA *orf* ESTÁ INDICADA EM LETRAS MAIÚSCULAS ABAIXO DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS. A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA LIPASE ESTÁ INDICADA EM AZUL E A DA CHAPERONA É INDICADA EM VERMELHO. F1 E F3 INDICAM A FASE DE LEITURA DE CADA *orf*. * INDICA O CÓDON DE PARADA DE TRADUÇÃO.

Foram estimadas as regiões na sequência de aminoácidos da LipE7 referentes a tríade catalítica, ponte de dissulfeto e sítio de ligação a cálcio. Em seguida estas regiões foram alinhadas com lipases de outras espécies bacterianas inseridas na mesma família enzimática (figura 19).

LipE7	LIGH	SHGGPT	105					
<i>A. hydrophila</i> YL17	LIGH	SHGGPT	105					
<i>A. hydrophila</i> J-1	LIGH	SHGGPT	105					
<i>A. veronii</i> B565	LIGH	SHGGPT	106					
LipE7	PSQY	CGEGPM	210	LipE7	NGLVGV	CSSHLGK	259	
<i>A. hydrophila</i> YL17	PSQY	CGEGPM	210	<i>A. hydrophila</i> YL17	DGLVGV	CSSHLGK	259	
<i>A. hydrophila</i> J-1	PSQY	CGEGPM	210	<i>A. hydrophila</i> J-1	DGLVGV	CSSHLGK	259	
<i>A. Veronii</i> B565	PSRY	CGEGPM	211	<i>A. veronii</i> B565	DGLVGV	CSSHLGK	260	
LipE7	TNIL	DPVDPA	234	LipE7	HLDEVN	QSF	GIRH	298
<i>A. hydrophila</i> YL17	TNIL	DPVDPA	234	<i>A. hydrophila</i> YL17	HLDEVN	QSF	GIRH	298
<i>A. hydrophila</i> J-1	TNIL	DPVDPA	234	<i>A. hydrophila</i> J-1	HLDEVN	QSF	GIRH	298
<i>A. Veronii</i> B565	TNLL	DPVDPA	235	<i>A. veronii</i> B565	HLDEVN	QSF	GIHH	299

FIGURA 19 REGIÕES CONSERVADAS DA LIPE7.

ALINHAMENTO ENTRE AS REGIÕES CONSERVADAS DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS REFERENTES À TRÍADE CATALÍTICA (VERMELHO), PONTES DE DISSULFETO (VERDE) E SÍTIO DE LIGAÇÃO Ca^{2+} DA LIPE7 COM OUTRAS LIPASES BACTERIANAS INSERIDAS NA MESMA FAMÍLIA ENZIMÁTICA.

Um dendrograma filogenético foi construído no programa MEGA 6.0 (Tamura, Peterson *et al.*, 2013) utilizando os 13 melhores “*hits*” após análise no

BLASTp, (figura 20). Esta análise foi feita para verificar as relações evolutivas entre a LipE7 e as demais lipases das subfamílias I, baseados na classificação proposta por ARPIGNY e JAEGER (1999) e atualizada por JAEGER e EGGERT (2000).

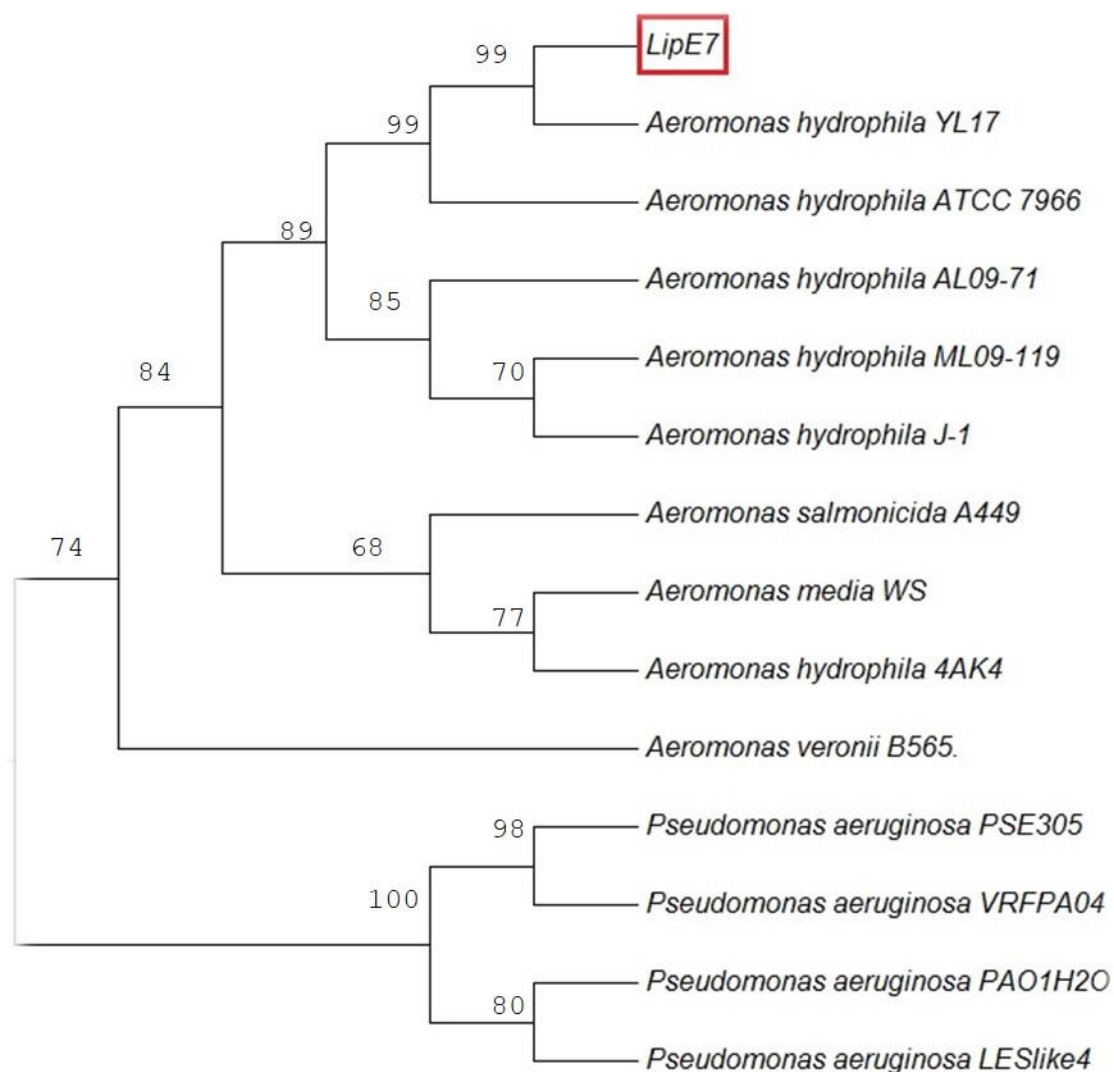


FIGURA 20. ÁRVORE FILOGENÉTICA DA LipE7

A ÁRVORE FOI CONSTRUÍDA PELO MÉTODO NEIGHBOR-JOINING UTILIZANDO O SOFTWARE MEGA 6.06. FOI CALCULADA A SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA UTILIZANDO 1.000 REPETIÇÕES DE BOOTSTRAP. UTILIZARAM-SE AS SEQUENCIAS PROTEICAS DOS 13 MELHORES "HITS" APÓS ANÁLISE NO BLASTp.

Posteriormente a sequência da lipase foi analisada para verificar a existência de uma região peptídeo sinal. Esta análise foi feita utilizando o servidor Signal IP Versão 4.1 (PETERSEN *et al.*, 2011) (figura 21).

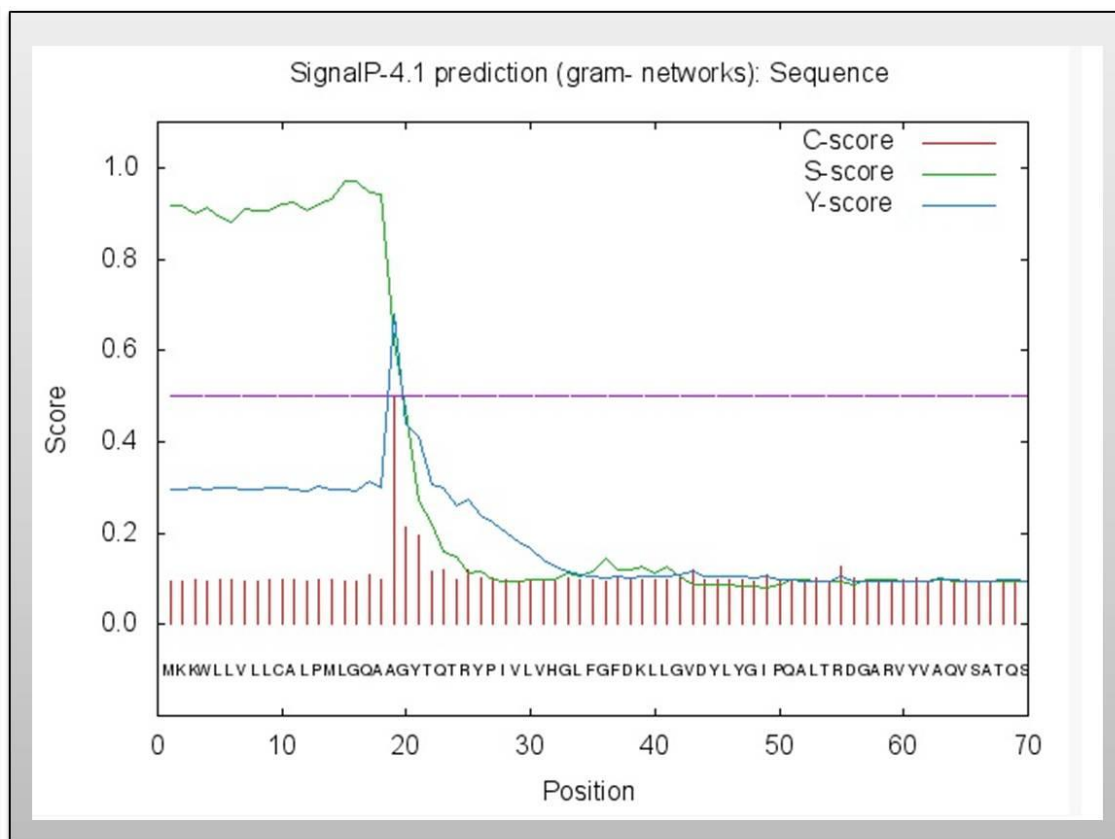


FIGURA 21. RESULTADO GERADO PELA DA FERRAMENTA SIGNALIP VERSÃO 4.1. NO GRÁFICO É INDICADO PELA MAIOR LINHA VERTICAL EM VERMELHO O TÉRMINO DA REGIÃO PEPTÍDEO SINAL.

Nesta análise são estabelecidos 3 diferentes scores, em vermelho está determinado o C-score que indica a posição exata do término da região peptídeo sinal e início da região da proteína madura que é indicada pela maior linha vertical vermelha, o S-score é calculado utilizando uma série de algoritmos em um banco de dados para bactérias gram-negativas determinando um posicionamento ótimo para clivagem da sequência de aminoácidos que se inicia no ponto em que a linha de tendência verde decai, finalmente o Y-score é obtido através de uma correlação entre o S-score e C-score determinando assim uma média entre estes valores descrita na linha de tendência azul, a figura 22 apresenta a sequência de aminoácidos da lipase (LipE7) indicando a região peptídeo sinal (PETERSEN *et al.*, 2011).

Peptídeo sinal

MKKWLLVLLCALPMLGQA AGYTQTRYPIVLVHGLFGFDKLLGVDYLYGIPQALTRDGARV
 YVAQVSATQSSSELRGEQLLKQVQQVLAITGAEKVNLIGHSHGGPTIRYVASVAPELVASATSV
 GGVNYGSEIADLVRANVTAGSVAEKLAVAAASALSGVISLLSGGSQLPQDPLAALDALTSAGA
 QRFNQRYPEGLPSQYCGEGPMQAANGVYVYFSWSGRGTMTNILDVPDPAALALTGSFFEEP
 NGLVGVCSHGLGKVIKTDYRMNHLDEVNQSFGRHLFETDPVGLYRQHANRLQLGL

FIGURA 22. SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DA LipE7.

EM AZUL ESTÁ INDICADA A REGIÃO REFERENTE AO PEPTÍDEO SINAL, A SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DA LIPASE SEM A REGIÃO PEPTÍDEO SINAL FOI DENOMINADA LipE7Tr.

Posteriormente foi estimada uma região transmembrana responsável pela ancoragem da chaperona (ChapE7) a membrana interna bacteriana com auxílio da ferramenta TMHMM Server v. 2.0 (figura 23).

 α -Hélice transmembrana

MNKAWLMAAPLGAALLGGWQLWPAPSPDSAAPLAQEAGPASPLARQAASSSDEH
 SLQARYEAFLLAESSLTVPTDPGLASLQVLFQDREQLRQQSFTPAEQEQLFAEDRLMEQ
 WTLRRKALAEAGDADKPLLASELELWLAEQPQWFREAEANSRLLGDLQSLERLPAAER
 DAVLREQLGPEAADRLHQLAESQQGFQQLAGYLAELKPLPAERRAEQQPEILARWFE
 PGQWRRVEALTRLRLGE

FIGURA 23. SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DA ChapE7.

EM VERMELHO ESTÁ INDICADA A REGIÃO REFERENTE A α -HÉLICE TRANSMEMBRANA RESPONSÁVEL PELA ANCORAGEM DA CHAPERONA A MEMBRANA INTERNA BACTERIANA.

5.5 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DA LIPASE (LipE7) E CHAPERONA (ChapE7)

Inicialmente foi feita análise para mapeamento dos sítios de restrição contidos nas sequências de nucleotídeos da LipE7 e ChapE7, com a finalidade de delinear uma estratégia contundente para superexpressão destas enzimas. Para esta tarefa foi utilizada a ferramenta NebCutter Versão 2.0 oferecida no pacote de programas pela BioLabs® *inc.* Após esta identificação, foram desenhados “primers” específicos para amplificação dos genes através da reação em cadeia da polimerase (Tabela 5), o produto desta reação foi submetido a análise eletroforética para verificação do conteúdo obtido, conforme ilustrado pela figura 24.

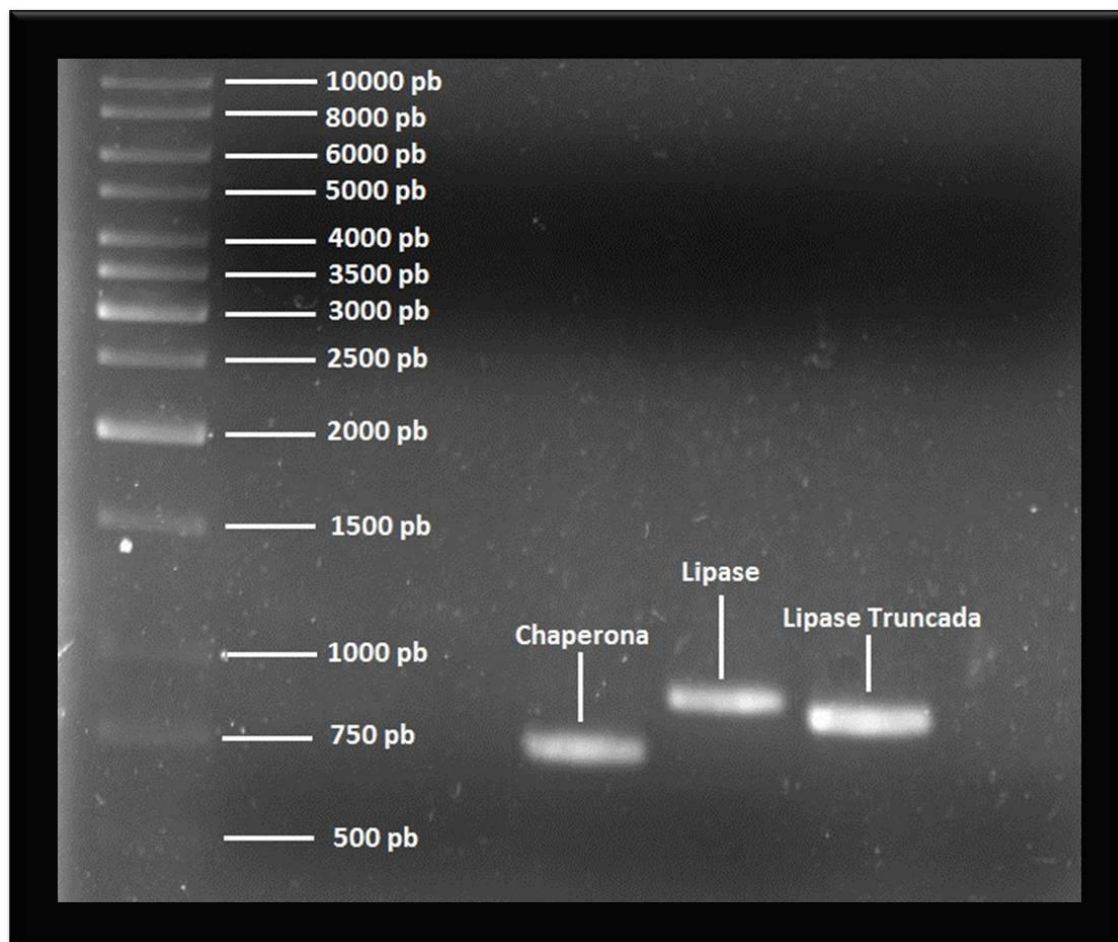


FIGURA 24. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DO PRODUTO DE PCR DO GENE QUE CODIFICA PARA A LIPASE E CHAPERONA.

AS BANDAS REFERENTES AOS FRAGMENTOS QUE CODIFICAM PARA CHAPERONA (ChapE7), LIPASE (LipE7) E LIPASE TRUNCADA ESTÃO INDICADAS BEM COMO O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 1KB LADDER. O GEL FOI CORADO COM BROMETO DE ETIDEO E A IMAGEM REGISTRADA UTILIZANDO SISTEMA DE FOTODOCUMENTAÇÃO UVP.

Os resultados indicam que os fragmentos que codificam para ChapE7 (741 nucleotídeos), LipE7 (903 nucleotídeos) e LipE7Tr (849 nucleotídeos) foram amplificados e poderão ser clonados nos vetores apropriados.

6 CONCLUSÃO

Uma nova lipase e chaperona denominadas LipE7 e ChapE7 foram identificadas a partir de uma sub-biblioteca metagenômica e tiveram seus genes amplificados por PCR. A análise de sequência demonstrou identidade de 98% com uma lipase da espécie *Aeromonas hydrophyla*. A análise indica que os genes da lipase e chaperona fazem parte de um operon considerando que existe uma sobreposição entre o códon de parada de síntese da lipase e o códon de início de tradução da chaperona.

6.1 PERSPECTIVAS

Os genes da LipE7 e ChapE7 serão clonados em vetores de expressão, permitindo a expressão das proteínas em *E.coli*. As proteínas superexpressas poderão ser purificadas e a atividade estudada.

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.

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 polyhydroxyalkanoatedepolymerases. **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.

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 enantioselectiva 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.

HUGHES D.S; FELBECK H.; STEIN J. A histidine protein kinase homolog from endosymbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftiapachyptila*. **Applied and environmental microbiology**, 3494-3498, 1997.

De LONG E.F; PACE N.R, Environmental Diversity of Bacteria and Archea. **Society of Systematic Biology**, p 470-477, 2001

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.

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.

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. **Environmental Microbiology Rep** 2011, 3:750-755.

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.

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.

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

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.

HARDEMAN, 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 oil seed materials to produce eco-friendly products. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 81, n. 12, p. 1077-1103, 2004.

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.

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.

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 enantio selective 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.

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.

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

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.

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.

LENFANT N., HOTELIER T., VELLUET E., BOURNE Y., MARCHOT P., CHATONNET A. ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions **Nucleic Acids Research** 41: D423-9, 2013.

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.

MICHAEL J. BRUMLIK; THOMAS BUCKLEY. Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. **Journal of bacteriology**, 1996

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.

PETERSEN T.N; BRUNAK S.; VON HEIJNE G.; NIELSEN H. Signal IP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, **nature methods** 785-789; 2011

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 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.

PAUWELS. K.; LORIS R.; VANDENBUSSCHE G.; RUYSSCHAERT J.M.; WYNS L.; VAN GELDER P. Crystallization and crystal manipulation of a steric chaperone in complex with its lipase substrate. **Structural Biology and Crystalization Communications**, 2005

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** 66: 2541-2547, 2000.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**. v. 16, p. 944-945, 2000.

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

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, p. 258–268, 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.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 548-556, 2002.

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.

STEIN, J. L.; MARSH, T. L.; WU, K. Y.; SHIZUYA, H., DeLONG, E. F. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 591–599, 1997.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30, 2725-2729, 2013.

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.L., Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil Biology & Biochemistry** 12, 1980.

TORSVIK V. L., GOKSOYRJ. Determination of bacterial DNA in soil. **Soil Biology and Biochemistry** 10, 7-12

OGRAM A, SAYLER GS, BARKAY T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Journal of microbiological methods** 7, p57-66, 1978.

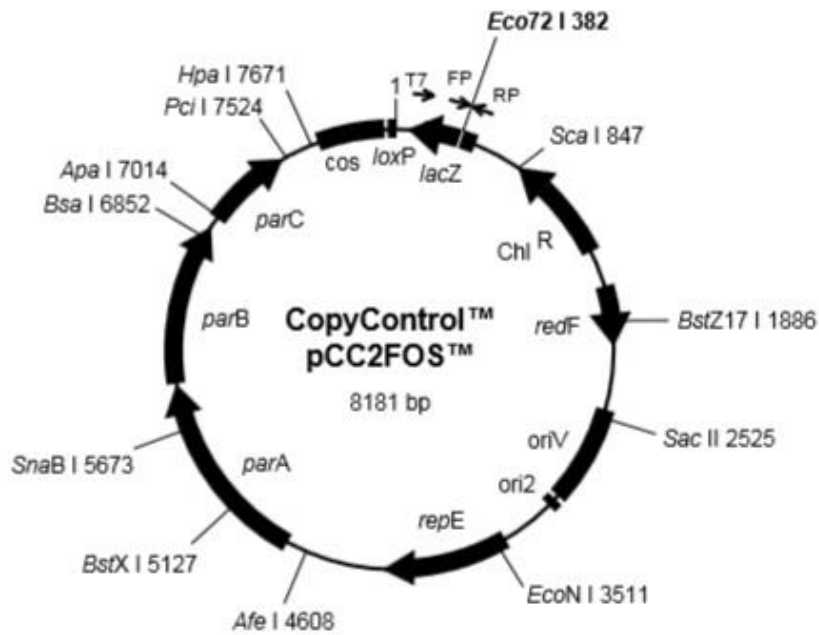
TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

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

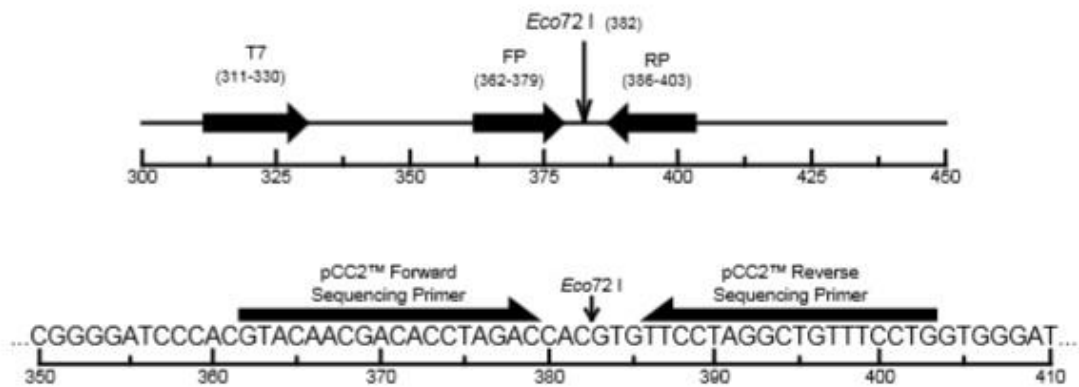
VOGET, S.; LEGGEWIE, C.; UESBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K. E.; STREIT, W.R. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6235-6242, 2003.

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

7.2 ANEXO 2 - MAPA DO VETOR pCC2FOS



Note: Not all restriction enzymes that cut only once are indicated above.
See Appendix F for complete restriction information.
Primers are not drawn to scale.



FP = pCC2™ Forward Sequencing Primer 5' GTACAACGACACCTAGAC 3'
 RP = pCC2™ Reverse Sequencing Primer 5' CAGGAAACAGCCTAGGAA 3'
 T7 = T7 Promoter Primer 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'