

CECÍLIA FONSÊCA CARVALHO

**Caracterização Funcional e Estrutural
de uma enzima Lipolítica encontrada na
Biblioteca Metagenômica de Solo de
Terra Preta de Índio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo
2015

CECÍLIA FONSÊCA CARVALHO

**Caracterização Funcional e Estrutural
de uma enzima Lipolítica encontrada na
Biblioteca Metagenômica de Solo de
Terra Preta de Índio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Microbiologia

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo
Carvalho

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB
quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações
da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Carvalho, Cecília Fonsêca.

Caracterização funcional e estrutural de uma enzima lipolítica encontrada na Biblioteca Metagenômica de Solo de Terra Preta de Índio / Cecília Fonsêca Carvalho. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Biologia molecular e estrutura de proteínas.

Versão do título para o inglês: Functional and structural characterization of lipolytic enzyme present in Soil Metagenomic Library of Terra Preta de Índio.

1. Esterase 2. Metagenômica 3. Tributirina 4. Cristalografia raio-X
I. Carvalho, Profa. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB071/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cecília Fonsêca Carvalho.

Título da Tese: Caracterização funcional e estrutural de uma enzima lipolítica encontrada na Biblioteca Metagenômica de Solo de Terra Preta de Índio.

Orientador(a): Profa. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

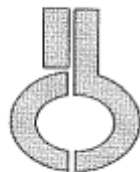
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **601/13** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização de genes codificadores de Lipases encontrados na biblioteca metagenômica de solo de terra preta de índio*" sob a responsabilidade de **Cecília Fonseca Carvalho**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 26 de abril de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

***A Deus, meus pais, tia, irmãos e amigos,
que me fizeram ser forte, quando ser
forte era a minha única escolha,
DEDICO.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, sem a minha fé Nele depositada, nada do que conquistei até aqui seria possível. Obrigada por escutar e atender as nossas preces!

Aos meus pais, Dr. Nilson Luiz Carvalho e Auxiliadora Carvalho, pela confiança e esforços depositados em mim. Vocês foram os que mais acreditaram em mim quando até eu mesmo perdi a fé. Investiram no meu aprendizado, pois essa é a maior herança que poderia receber. Amo vocês, muito obrigada!

À minha tia, madrinha e segunda mãe, Vera Maria Carvalho, que sem sua ajuda, meu caminho teria sido difícil. Sua contribuição na minha vida estará sempre gravada no meu coração.

Aos meus irmãos, Lidianne e Eduardo Carvalho, pela amizade, confiança e cumplicidade em vários momentos dessa nossa jornada.

A minha orientadora, Dra. Cristiane Carvalho Guzzo, pela acolhida no momento mais delicado da minha carreira acadêmica, por aceitar esse desafio na realização e conclusão da minha tese. Obrigada por acreditar em mim.

À prof. Dra. Elisabete José Vicente, por me receber em São Paulo e acolher na sua equipe de pesquisa.

Aos prof. Dr. Gabriel Padilla e a prof. Dra. Irma Nelly (in memoriam) por me escutarem e apoiarem com palavras quando achei que algo era impossível.

À prof. Dra. Solange Sakata pela amizade e confiança.

Aos meus eternos amigos de laboratório, intitulados, grupo Atλέtica, Dra. Taís Kuniyoshi, Felipe Almeida, Bruno Spinetti, Dra. Jéssica Navaro, Dr. Bruno Oishi e Igor Fernández pelas gargalhas, pipocas no fim de tarde, jogos de vôlei e corridas na USP, pequenos momentos que tornavam nosso ambiente de trabalho mais relaxante e convidativo. Em especial, aos amigos Dr. Diogo Robl e Carla Montanari Mergel pela cumplicidade, amizade e pelo ombro amigo, vocês sabiam dizer exatamente o que eu precisava escutar (Gabrieeela!!!). A todos muito obrigado pela amizade ao longo desses cinco anos.

À amiga Karina Regueira, porque foi ela quem dividiu comigo as batalhas e lutas para vencer os desafios que nos foram impostos diariamente. Kaká, Nós Conseguimos!!! Obrigada pela companhia.

Ao amigo Victor Pimentel, que apesar de tudo, sua alegria era sempre uma festa!!! Sua amizade é pra sempre!!!

A Norminha e Kazui por me adotarem como filha e cuidar de mim com tanto carinho e atenção ao longo dos nossos anos de convivência.

A Zita Gregório pelas inúmeras conversas e conselhos em todos os momentos. Sempre que precisava de uma opinião, era a você quem ia primeiro. Obrigado pelo carinho e apoio.

Aos amigos “de corredor”, os brasileiros e os colombianos, pelos vários momentos do café e bate-papo no corredor, momentos para “escapar” para colocar em dia os papos e espairecer a mente, em especial as amigas Amanda Flora, Bianca Peres e Simone Ichiwaki pelo carinho.

A minha “nova família” do LEEP, prof. Dr. Robson Francisco de Souza, Elaine Costa, Flávia Gomes, Débora Savino, Nikolas Maciel, Lígia Colombo e Rodrigo Barreiro por serem parceiros para todas as horas, trabalhar com vocês fica mais leve e divertido. Obrigada pelas risadas!

À Dra. Fernanda Nogales, uma das primeiras pessoas que conheci no ICB e que passou por tantos desafios quanto eu. Obrigada pela ajuda com os ensaios de proteína, pela paciência e pela palavra amiga.

Aos amigos Dr. Raphael Teixeira e Edgar Llontop pela disposição de vocês em me ajudarem com ensaios de cristalização e sempre responderem prontamente aos meus questionamentos sobre esse assunto tão novo para mim.

Ao amigo Dr. Karel Olivarria pela ajuda com a realização dos ensaios enzimáticos, pela paciência e ótima didática para explicar sobre cinética enzimática.

À secretária da Pós-Graduação, Gisele Santana, por me ajudar muito, por torcer por mim e não me deixar perder os prazos. Obrigada Gi!

Ao Prof. Dr. Carlos Taborda pela força nessa etapa de finalização da tese!

Aos meus amigos “fora USP” que me proporcionaram momentos agradáveis, por estarem presentes nos dias bons e não tão legais assim, e por tornarem minha vida em São Paulo mais familiar e os dias mais alegres.

Aos meus amigos de Manaus, por estarem sempre presente ao longo desses anos, mandando energia positiva e mensagens de carinho. Nunca deixando esquecer que amizades verdadeiras são cultivadas mesmo que haja uma longa distância separando-nos. Amo todos vocês!!!

Aos meus familiares, que torcem por mim. Família é TUDO!!! Amo Muito!

Agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram presentes nessa etapa da minha vida! Concluo mais um ciclo levando comigo histórias, aprendizados e principalmente, muitos amigos queridos! Obrigada São Paulo.

“O caminho é longo, mas a vitória é certa, basta simplesmente ter FÉ.”
(Paulinho Gonçalves)

“Lutar, nunca desistir, ter fé, pois fácil não é nem vai ser, tentar até se esgotar suas forças”.

RESUMO

CARVALHO, C. F. **Caracterização Funcional e Estrutural de uma enzima Lipolítica encontrada na Biblioteca Metagenômica de Solo de Terra Preta de Índio**. 2015. 161 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O solo é um habitat com elevada diversidade bacteriana e com alto potencial biotecnológico pouco explorado na busca por enzimas de interesse industrial. Devido à incapacidade de muitos micro-organismos crescerem em meios de cultivo tradicionais, técnicas que possibilitam o acesso a essas informações, por meio da extração do DNA total das amostras ambientais e construção de bibliotecas metagenômicas foram desenvolvidas. As enzimas são catalisadores naturais produzidas por seres vivos, e dentre estas, as hidrolases, grupo que inclui as lipases e as esterases, possuem posição proeminente por promoverem a hidrólise de matérias-primas de alto valor agregado. As enzimas lipolíticas consistem do terceiro maior grupo entre as enzimas de importância industrial, e o crescimento exponencial da sua utilização, na fabricação de biopolímeros, biodiesel, e nas indústrias de alimentos, laticínios, roupas e de medicamentos são indicadores da crescente demanda pela necessidade de isolar novos genes com diferentes características bioquímicas. Os genes codificadores das lipases microbianas são mais estáveis e de fácil manipulação genética do que os correspondentes em plantas e animais, e podem ser encontrados em uma variedade de habitats, incluindo solos e sedimentos. Dentro deste cenário, a busca por novas lipases/esterases e seu estudo bioquímico podem gerar novos produtos de interesse industrial.

Neste trabalho, uma triagem funcional da Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio revelou 4 clones com atividade triacil-hidrolásica, designados Fos1, Fos2, Fos3 e Fos4. O gene lipolítico *lip4*, proveniente do clone fosmidial Fos4, apresentou o maior halo de degradação em meio ágar tributirina, e foi selecionado para estudos mais detalhados, para isto o gene foi sequenciado e apresentou similaridade com um domínio conservado da enzima β -ceto adipato enol-lactona hidrolase, participante na via β -ceto adipato de degradação de ésteres aromáticos. A enzima Lip4 possui uma cadeia polipeptídica de 268 aminoácidos e massa molecular de 29 kDa, e foi identificada como membro da família V das lipases bacterianas, da subfamília V.2. O gene *lip4* foi clonado em vetor de expressão

pET28a, super-expresso na cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) RP e a purificação foi realizada por cromatografia de afinidade, e submetidos a ensaios de cristalização.

Cristais de Lip4 difrataram até 2.3 Å de resolução, pertencendo ao grupo espacial P2₁2₁2₁, com 4 moléculas na unidade assimétrica, ensaios de cromatografia de exclusão por tamanho mostrou que Lip4 é um monômero. A estrutura tridimensional da Lip4 identificou a presença do dobramento conservado das α/β hidrolases e de uma sequência de α -hélices na porção mais flexível da molécula, possivelmente sendo o domínio CAP, além da localização da tríade catalítica, Ser⁹⁴-Asp²¹⁷-His²⁴⁵. Dois mutantes foram construídos mudando a serina do sítio ativo por uma alanina Lip4_{S94A}, e por uma cisteína, Lip4_{S94C}. Estes mutantes foram analisados por ensaios de dicroísmo circular e atividade hidrolítica em placa, e foi observado a perda da atividade enzimática, entretanto a conformação da estrutura secundária manteve-se inalterada.

Testes cinéticos preliminares usando como substrato ésteres *p*-nitrofenila octanoato (pNPC8) indicaram que Lip4 tem preferência por pHs alcalinos, com melhor atividade entre os pHs 8 e 9. Estes resultados apresentados sugerem que Lip4 é uma nova esterase e a segunda enol-lactona hidrolase cristalizada e caracterizada, possibilitando um melhor conhecimento sobre o mecanismo catalítico dessas enzimas cruciais na via β -cetoadipato

Palavras-chave: Esterase. Metagenômica. Tributirina. Cristalografia de raio-X

ABSTRACT

CARVALHO, C. F. **Functional and Structural Characterization of lipolytic enzyme present in Soil Metagenomic Library of Terra Preta de Índio**. 2015. 161 p. Ph.D. Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Soil environment has a big bacterial diversity and the biotechnological potential has been underexplored in the search for industrial interest enzymes. Due to the inability of many microorganisms grow in traditional culture medium, special techniques have been developed to give access to ecosystem information, one of those techniques is made based in extracting of total DNA from the environment without prior cultivation, and metagenomics libraries have been developed using this techniques. Enzymes are able to catalyse different biochemistry reaction as hydrolases, that includes lipases and esterases, and these class of enzymes have important position for promoting raw material hydrolysis with added values. Lipolytic enzymes comprises the third largest group among enzymes with industrial value, and the exponential growth in the biopolymers production, biofuels and in the dairy, food, clothing and medicines industry, indicate the need to discovery new genes that codes enzymes with different biochemical characteristics. Those genes encoding microbial lipases are more stable and easily manipulated than the corresponding genes in plants and animals, and can be found in a variety of habitats, including soil and sediments. In this overview, a search for new lipases/esterases and their biochemical understanding could promote new industrial interest products.

In this work, a functional screening of soil metagenomic library of Terra Preta de Índio revealed four clones with triacyl hydrolysis activity named as Fos1, Fos2, Fos3 and Fos4. The lipolytic gene *lip4*, isolated from fosmidial clone Fos4, showed the major hydrolysis degradation halo in tributyrin agar, and was selected to further studies. This gene was sequenced and showed similarity with a conserved domain of 3-oxoadipate enol-lactone hydrolase, integrant in the β -keto adipate pathway in the aromatic esters degradation. The Lip4 enzyme has a polypeptide chain with 268 residues and molecular weight of 29 kDa. Analysis of the sequence of Lip4 showed that it belongs to family V of bacterial lipases, subfamily V.2. The *lip4* gene was

cloned into expression vector pET28a, the enzyme was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) RP cells, purified by nickel affinity column chromatography and subjected to crystallization trials.

Lip4 crystals diffracted to 2.3 Å resolution, belonging to spacial group P2₁2₁2₁, with 4 molecules in the asymmetric unit, exclusion chromatography analysis demonstrated that Lip4 is a monomer in solution. Three dimensional structure of Lip4 identified a conserved α/β hydrolase backbone and a α-helices sequence in the most flexible portion of the protein suggesting to be the CAP domain. The catalytic triad Ser⁹⁴-Asp²¹⁷-His²⁴⁵ was identified. Two mutants were built by changing the serine residue of active site to an alanine (Lip4_{S94A}) and to a cysteine (Lip4_{S94C}). Circular dichroism and hydrolytic activities were performed using the mutants and showed a loss of enzymatic activities, despite the secondary structure remained the same than the wild type protein.

Preliminary kinetic tests using p-nitrophenyl octanoate esters as substrate (pNPC8) indicated that Lip4 acts preferentially in alkaline pH, with better activity between pH 8 and 9. In conclusion, Lip4 is a new esterase and it is the second enol-lactone hydrolase with the three dimensional structure solved. The biochemistry assays together with the three dimensional structure will give us the better understanding of enzymatic catalytic mechanism that belongs to the β-ketoadipate pathway.

Keywords: Esterase. Metagenomic. Tributyrin. X-ray Crystallography

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Localização das áreas de solos de Terras Pretas de Índio no Brasil.....	22
FIGURA 2 – Diversidade bacteriana dos solos de TPI.....	24
FIGURA 3 – Vias periféricas na degradação de compostos aromáticos.....	26
FIGURA 4 – Degradação aeróbica do benzoato em bactérias e fungos como exemplo de uma clivagem do anel aromático.....	27
FIGURA 5 – Comparação entre as vias orto-clivagem β -cetoadipato e orto-clivagem modificada codificada em plasmídeos.....	29
FIGURA 6 – Fórmula estrutural da tributirina.....	36
FIGURA 7 – Esquema do fenômeno de ativação interfacial nas lipases.....	38
FIGURA 8 – Diagrama da estrutura secundária do dobramento canônico das α/β hidrolases.....	39
FIGURA 9 – Reações de regioespecificidade catalisadas por lipases.....	40
FIGURA 10 – Esquema do fenômeno da ativação interfacial nas lipases.....	41
FIGURA 11 - Diagrama da estrutura secundária do dobramento canônico das α/β hidrolases.....	42
FIGURA 12 - Mecanismo de catálise das lipases	44
FIGURA 13 – Visão da estrutura de uma lipase verdadeira com a tampa cobrindo sítio ativo.	45
FIGURA 14 - Estruturas tridimensionais de membros da família IV.....	48
FIGURA 15 – Dados da coleta do Solo de Terra Preta de Índio.....	55
FIGURA 16 - Reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenil.....	77
FIGURA 17 – Clones <i>E. coli</i> recombinantes na Biblioteca Metagenômica de TPI.....	80
FIGURA 18 - Eletroforese da extração fosmidial dos clones lipolíticos da Biblioteca Metagenômica.	81
FIGURA 19 - Eletroforese dos perfis de restrição dos clones fosmídeos recombinantes da Biblioteca Metagenômica digeridos com <i>NotI</i>	82
FIGURA 20 – Eletroforese da cinética de tempo da digestão dos clones fosmídeos recombinantes Fos1 e Fos4.....	83
FIGURA 21 – Clone pSUBL4 clonado em vetor plasmídeo pUC18 expressando atividade lipolítica... ..	84
FIGURA 22 – Eletroforese da Extração e Digestão do sub-clone pSUBL4 com <i>HindIII</i>	85
FIGURA 23 - Perfis de migração em gel de agarose 0,8% submetido a eletroforese.....	86
FIGURA 24 - Perfis de migração em gel de agarose submetido a eletroforese.....	87
FIGURA 25 – Avaliação da atividade lipolítica em meio PEX contendo tributirina 0,5% a partir da sub-biblioteca construída no plasmídeo pUC18.	88
FIGURA 26 – Perfil de migração em gel de agarose submetido a eletroforese do fragmento amplificado por PCR do gene Lip4 a partir das extremidades do vetor pUC18.....	89
FIGURA 27 – Perfis de migração em gel de agarose 0,8% submetido a eletroforese dos fragmentos amplificados por PCR do plasmídeo recombinante derivado de pLip4.....	90
FIGURA 28 – Árvore filogenética <i>Neighbor-Joining</i> das famílias lipolíticas bacterianas e Lip4.	92
FIGURA 29 – Árvore filogenética <i>Neighbor-Joining</i> das enzimas lipolíticas da família V e Lip4.....	93
FIGURA 30 – Alinhamento da sequência da enzima Lip4 com outras lipases da Família V.....	94
FIGURA 31 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% do gene da enzima Lip4 e pET28a(+).	95
FIGURA 32 – Gel SDS-PAGE 12% da Mini-indução realizada com cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) RIL, BL21 (DE3) RP e BL21 (DE3) Star em temperaturas 28 °C e 37 °C.....	96
FIGURA 33 - Gel SDS-PAGE 12% das frações obtidas no teste de solubilidade da cepa BL21(DE3)RP expressa à 37 °C.....	97
FIGURA 34 - Visualização do halo de hidrólise em meio sólido com tributirina 0,5% dos clones transformados geneticamente em BL21(DE3) RP	98

FIGURA 35 - Visualização do halo de hidrólise em meio sólido com tributirina 0,5% dos clones transformados geneticamente em ArticExpress (DE3).....	99
FIGURA 36 - Gráfico do tamanho do halo de degradação da Tributirina em meio ágar pelos clones da cepa BL21 (DE3) RP.....	100
FIGURA 37 - Gráfico do tamanho do halo de degradação da Tributirina em meio ágar pelos clones da cepa ArticExpress (DE3).....	100
FIGURA 38 – Gel de SDS-PAGE 12% da Purificação de Lip4 por Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel.....	102
FIGURA 39 – Mutantes de Lip4, Lip4 ^{S94A} e Lip4 ^{S94C}	104
FIGURA 40 - Crescimento em meio de cultivo LB ágar com 0,5% Tributirina do clone Lip4 e mutantes Lip4 ^{S94A} e Lip4 ^{S94C}	105
FIGURA 41 – Atividade enzimática da enzima Lip4 e das mutantes Lip4 ^{S94A} e Lip4 ^{S94C} em ágar suplementado com substratos naturais.....	106
FIGURA 42 – Atividade enzimática em placa das enzimas purificadas em meio ágar suplementado com ésteres de pNP de diferentes comprimentos de cadeia de carbono.....	107
FIGURA 43 – Curva de Calibração da Absorbância em relação a concentração de pNP.....	108
FIGURA 44 – Efeito da concentração da enzima Lip4 na velocidade da reação.....	109
FIGURA 45 – Determinação do pH ótimo da reação enzimática.....	110
FIGURA 46 – Gráfico da cinética enzimática para os cálculos dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) de Lip4.....	112
FIGURA 47 – Os primeiros cristais obtidos de Lip4.....	113
FIGURA 48 – Imagem do cristal de Lip4 obtidos pela co-cristalização com 4 mM de Tributirina.....	114
FIGURA 49 – Gel SDS-PAGE 12% da Lip4 induzida com Selênio-metionina.....	115
FIGURA 50 – Alinhamento da Lip4 com o modelo PcaD (PDBID: 2XUA) usado na substituição molecular.....	117
FIGURA 51 – Ramachandran plot da estrutura da enzima Lip4.....	118
FIGURA 52 – Enzima Lip4 mostrando as quatro moléculas presentes na unidade assimétrica.	119
FIGURA 53 – Eluição da enzima Lip4 na coluna de Gel Filtração Superdex 75	120
FIGURA 54 - Representação esquemática da estrutura secundária da enzima Lip4 mostrando a estrutura conservada da família das α/β hidrolases.....	121
FIGURA 55 – Representação esquemática da estrutura da Lip4 destacando o motivo conservado Gly-X-Ser-X-Gly.....	123
FIGURA 56 – Esquema representativo da tríade catalítica Ser ⁹⁴ - Asp ²¹⁷ - His ²⁴⁵	124
FIGURA 57 – Representação esquemática do Domínio CAP da molécula Lip4.....	125
FIGURA 58 – Esquema representativo das interações de hidrogênio da tríade catalítica em Lip4....	127
FIGURA 59 – Estrutura da Lip4 colorida segundo o valor do fator-B.....	128
FIGURA 60 – Sobreposição estrutural da Lip4 com modelo PcaD (PDBID: 2XUA).....	129
FIGURA 61 – Espectro de dicróismo circular da Lip4 e das linhagens mutantes.....	130
FIGURA 62 – Esquema representativo da mutagênese <i>in silico</i> mostrando a possível interação de pontes dissulfeto.....	132
FIGURA 63 – Representação da estrutura molecular em 3D da lipase de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 (PDBI:2XUA).....	138
FIGURA 64 – Organização genética da via β -cetoacil-CoA.....	140

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Classificação internacional das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).....	37
TABELA 2 - Subdivisão da Família (Subf.) I das Lipases Bacterianas.....	46
TABELA 3 - Classificação das Famílias II a VIII das Lipases Bacterianas.....	47
TABELA 4 – Descrição das novas Famílias das Lipases Bacterianas descobertas pela metagenômica funcional.....	49
TABELA 5 - Exemplos de aplicações industriais das enzimas lipolíticas.....	51
TABELA 6 - Linhagens de <i>E.coli</i> utilizadas neste trabalho e suas respectivas características genotípicas.....	57
TABELA 7 – Vetores empregados neste trabalho com suas características genotípicas.....	58
TABELA 8 - Iniciadores de PCR utilizados para ampliações de fragmentos do DNA	58
TABELA 9 – Crescimento dos clones da Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio em meio PEX com diferentes concentrações do substrato natural Tributirina.....	81
TABELA 10 – Sequência da enzima lipolítica Lip4.....	90
TABELA 11 – Medida dos halos de hidrólise dos clones induzidos	101
TABELA 12 – Efeito dos íons metálicos sobre a atividade enzimática	111
TABELA 13 - Processamento dos dados de difração de raios-X de Lip4 com tributirina.	116
TABELA 14 – Média de temperatura (T _m) da Estabilidade térmica da enzima Lip4 e das linhagens mutantes Lip4 _{S94A} e Lip4 _{S94C} nos 3 diferentes tampões testados	131

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABH	$\alpha\beta$ hidrolase
Abs	Absorbância
BLAST	<i>Basic Local Alignment Sequence Tool</i>
BSA	Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD	Dicroísmo circular
CV	Volume de Coluna (<i>Column volume</i>)
dNTP	Dinucleosídeo trifosfato
DLH	Dienelactona hidrolase
DO	Densidade óptica
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELH	Enol-lactona hidrolase
IPTG	Isopropil--D-thiogalactopiranosídeo
Kb	quilobases
KDa	quilodáltons
LB	Meio de cultivo Luria-Bertani
MAD	Dispersão Anômala Múltipla (<i>Multi-wavelength Anomalous Dispersion</i>)
MM	Massa Molecular
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	Região Codificadora de Proteína (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	pares de base
PcaD	Enzima β -cetoalcoól enol-lactona hidrolase
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	Banco de Dados de Proteína (<i>Protein Data Bank</i>)
PEG	Polietileno Glicol
pET	vetor de expressão plasmidial
PEX	Meio de cultivo Peptona e Extrato de Levedura
pl	Ponto isoelétrico
pNP	p-nitrofenol
pNPC4	p-nitrofenol butirato
pNPC8	p-nitrofenol octanoato
pNPC16	p-nitrofenol palmitato
pUC	Vetor de clonagem
rpm	rotações por minuto
r.s.m.d	Raiz quadrada do quadrado do desvio padrão médio
SAD	Dispersão Anômala Simples (<i>Single-wavelength Anomalous Dispersion</i>)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Sel-Met	Selênio-metionina
Tm	Temperatura média
TPI	Terra Preta de Índio
UV	Radiação Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 O Solo como fonte da Diversidade de Microrganismos	20
1.2 Solo de Terra Preta de Índio (TPI)	21
1.3 Compostos aromáticos	24
1.3.1 Degradação de compostos aromáticos.....	25
1.3.2 Via β -cetoadipato.....	28
1.3.3 Via orto-clivagem modificada e a enzima Dienelactona hidrolase (DLH).....	30
1.3.4 Aplicações favoráveis da via β -cetoadipato.....	31
1.4 Metagenômica	32
1.4.1 Bibliotecas Metagenômicas.....	32
1.4.2 Técnicas de Análise do Metagenoma.....	33
1.4.3 Importância da Metagenômica na descoberta de novos biocatalisadores.....	34
1.4.4 Tributirina como substrato.....	35
1.5 Enzimas	36
1.6 Lipases e esterases	37
1.6.1 Estrutura das enzimas lipolíticas.....	41
1.6.2 Classificação das lipases e esterases bacterianas.....	44
1.6.3 Aplicações Industriais das enzimas lipolíticas.....	49
1.6.4 Enzimas lipolíticas obtidas pela abordagem metagenômica.....	52
1.7 Área de Estudo do Projeto	54
2 OBJETIVOS	56
3 MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1 Linhagens bacterianas e vetores utilizados	57
3.2 Iniciadores de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	58
3.3 Meios de cultivo bacteriano	59
3.4 Análise dos clones selecionados	59
3.4.1 Triagem de Clones com Atividade Lipolítica.....	59
3.4.2 Determinação da concentração de Tributirina para visualização dos halos.....	60
3.4.3 Extração e Purificação dos Vetores.....	60
3.4.4 Análise eletroforética de DNA em gel de agarose e purificação de fragmentos.....	61
3.4.5 Preparação de células eletrocompetentes.....	61
3.4.6 Transformação de bactérias por eletroporação.....	62
3.4.7 Confirmação dos clones fosmidiais recombinantes que excretam lipase.....	62
3.4.8 Análise dos perfis de restrição dos fosmídeos recombinantes.....	62
3.5 Construção de sub-biblioteca de DNA fosmidial em pUC18	63
3.5.1 Cinética da Digestão dos DNAs fosmidiais	63
3.5.2 Clonagem dos insertos no vetor pUC18.....	63
3.5.3 Confirmação da atividade hidrolítica.....	64
3.5.4 Amplificação por PCR, sequenciamento e análise filogenética dos subclones.....	65
3.5.4.1 Sequenciamento com oligonucleotídeos universais $M13_{Rv}$ e $M13_{Fw}$	65
3.5.4.2 Genoma Walking.....	65
3.5.4.3 Análise da sequência da lipase Lip4 e construção da árvore filogenética.....	66
3.6 Clonagem, expressão e purificação do gene Lip4	67
3.6.1 Desenho e clonagem do gene em vetor de expressão pET28(a).....	67
3.6.2 Teste de indução da expressão e avaliação da solubilidade.....	68
3.6.3 Teste de Expressão em cepa <i>E. coli</i> ArticExpress (DE3).....	69

3.6.4 Superexpressão e purificação da proteína recombinante.....	69
3.6.5 Incorporação de selênio-metionina (Sel-Met) na proteína recombinante.....	71
3.6.6 Cromatografia de gel filtração analítica.....	71
3.7 Cristalização e determinação da estrutura tridimensional.....	71
3.7.1 Ensaios de cristalização da enzima purificada.....	71
3.7.2 Cristalização da enzima Lip4.....	72
3.7.3 Coleta e processamento dos dados da difração de raio-X.....	72
3.7.4 Refinamento dos dados e obtenção da estrutura da Lip4.....	73
3.8 Ensaios Funcionais.....	73
3.8.1 Mutação sítio-dirigida no sítio ativo Lip4.....	73
3.8.2 Clonagem, superexpressão e purificação das linhagens mutantes.....	74
3.8.3 Teste de atividade em meio de cultivo sólido.....	74
3.8.4 Ensaios de dicroísmo circular e estabilidade térmica.....	75
3.9 Determinação espectrofotométrica da atividade lipolítica utilizando ésteres de p-nitrofenila (pNP) como substrato.....	76
3.9.1 Ensaio padrão.....	76
3.9.2 Determinação da melhor concentração de substrato.....	77
3.9.3 Determinação da concentração de enzima para estudo.....	77
3.9.4 Efeito do pH sobre a atividade lipolítica da Lip4.....	78
3.9.5 Efeitos dos íons metálicos na atividade da enzima Lip4.....	78
3.9.6 Determinação do K_m e $V_{máx}$ da proteína Lip4.....	78
4 RESULTADOS.....	79
4.1 Construção da Sub-biblioteca, Expressão, Purificação e Caracterização da Enzima Lip4.....	79
4.1.1 Curva de crescimento dos clones <i>E. coli</i> recombinantes que expressam enzimas lipolíticas.....	80
4.1.2 Análise dos perfis de restrição dos insertos fosmidiais.....	81
4.1.3 Confirmação da enzima lipolítica nos clones selecionados.....	82
4.1.4 Construção de sub-biblioteca dos fosmídeos.....	83
4.1.4.1 Digestão dos clones <i>Fos1</i> e <i>Fos4</i> com enzimas de restrição.....	83
4.1.4.2 Digestão de <i>Fos4</i> com enzima de restrição <i>XbaI</i> e confirmação da atividade hidrolítica.....	85
4.1.5 Sequenciamento do subclone pLip4 por genoma “walking”.....	88
4.1.6 Análise da sequência gerada por meio de ferramentas de bioinformática.....	90
4.1.7 Clonagem, Expressão, Purificação e Caracterização da Lip4.....	95
4.1.7.1 Clonagem, Expressão e Teste de solubilidade.....	95
4.1.7.2 Superexpressão e Purificação da Lip4.....	101
4.1.8 Determinação da atividade pela mutação no sítio ativo da Lip4.....	102
4.1.8.1 Mutação sítio dirigida do resíduo catalítico Ser ⁹⁴	102
4.1.8.2 Atividade hidrolítica da Lip4 e dos Mutantes Lip4 ^{S94A} e Lip4 ^{S94C}	103
4.1.9 Determinação da atividade lipolítica utilizando substratos naturais e artificiais.....	105
4.1.9.1 Visualização da especificidade da enzima lipolítica Lip4 em meio sólido com diferentes substratos.....	105
4.1.9.2 Curva de calibração.....	108
4.1.9.3 Determinação da melhor concentração da enzima Lip4.....	108
4.1.9.4 Efeito de diferentes valores de pH sobre a atividade de Lip4.....	110
4.1.9.5 Avaliação da atividade enzimática em diferentes concentrações de íons metálicos.....	110
4.1.9.6 Determinação do k_m e $V_{máx}$ da enzima Lip4.....	111
4.2 Determinação Estrutural da Esterase Lip4 por Cristalografia e Difração de Raio-X.....	112
4.2.1 Cristalização e determinação da estrutura tridimensional.....	112
4.2.1.1 Ensaios de cristalização.....	112

4.2.1.2 Estratégias para derivatização dos cristais da proteína Lip4.....	113
4.2.1.3 Coleta e processamento dos dados de difração de raio-X.....	115
4.2.1.4 Refinamento dos dados e obtenção da estrutura tridimensional.....	116
4.2.1.5 Análise estrutural da enzima Lip4.....	121
4.2.2 Estudos Funcionais.....	130
4.2.2.1 Dicroísmo circular e estabilidade térmica da Lip4 e mutantes.....	130
5 DISCUSSÃO.....	133
5.1 Construção da Sub-biblioteca, Expressão, Purificação e Caracterização da Enzima Lip4	133
5.2 Determinação Estrutural da Esterase Lip4 por Cristalografia e Difração de Raio-X.....	136
5.2.1 Enol-lactona hidrolase (PcaD) de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	137
5.2.2 Organização gênica da via β -cetoadipato.....	139
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	142
REFERÊNCIAS.....	145
ANEXOS.....	156
ANEXOS 1: Mapa do vetor pCC1FOS.....	156
ANEXOS 2: Mapa do vetor pUC18.....	157
ANEXOS 3: Mapa do vetor pET28a.....	158
ANEXOS 4: Ensaio 1 – Estabilidade Térmica: Tampão de diálise.....	159
ANEXOS 5: Ensaio 2 – Estabilidade Térmica: Tampão de Atividade com íon Ca^{2+}	160
ANEXOS 6: Ensaio 3 – Estabilidade Térmica: Tampão de Atividade sem adição íon Ca^{2+}	161

1 INTRODUÇÃO

1.1 Solo como fonte de diversidade de Micro-organismos

A fertilidade dos solos foi associada, na última década, a existência de uma alta diversidade de micro-organismos nesse habitat (ZILLI et al., 2003). Os solos constituem um dos principais ecossistemas com uma extensa variedade microbiana, principalmente de procaríotos, que ainda não foi bem caracterizada (WARD, 2003). É sabido que um grama de solo pode conter mais de dez mil espécies de bactérias, arqueias, vírus e micro-organismos eucarióticos (TORVISK; OVREAS, 2002), entretanto, apenas 1% do total, é conhecido e cultivado em meio de cultura por técnicas tradicionais de cultivo (CURTIS; SLOAN, 2005). O avanço na área molecular com desenvolvimento de novos mecanismos de rastreamento por genes ainda não descritos, vem reduzindo essas limitações e difundindo uma nova compreensão sobre a diversidade microbiana, indicando que a caracterização da microbiota não-cultivável, utilizando-se de métodos de biologia molecular é uma importante ferramenta para a identificação e conhecimento da distribuição e funções destes no meio ambiente (RONDON et al., 1999). Recentemente foi descoberto um novo composto antibiótico, a partir de bactérias não-cultiváveis de solo, nomeado teixobacina, empregando uma nova técnica que permite a recuperação de até 50% das bactérias crescidas em uma câmara de difusão *in situ*, do que em comparação com o 1% do crescido em meio rico (LING et al., 2015).

Os micro-organismos presentes nos solos, estão sujeitos a estresses bióticos (competição, parasitismo) e abióticos (flutuações de temperatura, níveis de umidade), levando a um ecossistema dinâmico, promovendo uma variedade de interações e funções microbianas (KAKIRDE et al., 2010). Estão envolvidos em muitos processos no ecossistema, incluindo biodegradação, decomposição e mineralização, ciclagem de nutrientes inorgânicos e remoção de poluentes (BROSSI et al., 2014). A existência de um enorme conjunto genético e biológico presente nos solos ainda a ser explorado para a descoberta de novos genes, vias metabólicas inteiras e seus produtos funcionais (COWAN, 2000), e devido principalmente ao seu histórico como fonte de moléculas comercialmente importantes nas áreas químicas, farmacêuticas e biotecnológicas, tornaram esse habitat alvo de estudos metagenômicos (DANIEL, 2005; MACNEIL et al., 2001). Os solos são um dos

principais focos da era biotecnológica na busca de soluções nos setores alimentícios, de saúde e industrial, levando a uma necessidade de aumentar o conhecimento sobre a biodiversidade e bioprospecção de novos micro-organismos.

As condições ambientais da Amazônia favorecem altas atividades metabólicas e o elevado crescimento microbiano, o que é útil para encontrar novos e bons recursos enzimáticos. Setenta e cinco clones positivos para atividade lipolítica, foram isoladas de solos Amazônicos, demonstrando o grande potencial do recurso microbiano nesta área (WILLERDING et al., 2011), indicando ser uma rica fonte de diversidade genética ainda não totalmente caracterizada e com um enorme potencial a ser desvendado sobre enzimas e compostos bioativos úteis à sociedade humana.

1.2 Solo de Terra Preta de Índio (TPI)

Os solos de Terra Preta Antropogênica (TPA), localmente conhecida como Terra Preta de Índio (TPI), apresentam ampla distribuição na região Amazônica (FIGURA 1), ocorrendo principalmente na periferia de áreas não inundáveis, representados pelas florestas de terra-firme (LIMA, 2002). São encontrados sob a forma de manchas espessas não contínuas de coloração pretas ou marrom escuras, ao longo das margens do rio Amazonas, com elevado teor de nutrientes, destacando-se os íons cálcio e fósforo, e com vegetação formada por latossolo amarelo (TEIXEIRA; MARTINS, 2003). Possuem uma alta fertilidade quando comparado aos solos adjacentes, devido ao elevado teor de matéria orgânica depositada e da intensa atividade biológica presente nesse habitat (LEHMANN et al., 2003). A matéria orgânica do solo compreende componentes vivos e não-vivos. Os vivos são as raízes de plantas e os organismos do solo, constituindo aproximadamente 4% do total. Os componentes não-vivos, que correspondem a grande maioria, representam a matéria macroorgânica, constituída de resíduos de plantas em decomposição, e substâncias de coloração escura, apresentando alto teor de carbono formado principalmente por estruturas aromáticas, denominado de material húmico (PRIMO et al., 2011). A formação dos solos de TPI ocorreu pelo depósito progressivo de materiais e compostos orgânicos, como carvão vegetal, ossos e cerâmicas, que gradualmente modificaram as propriedades físicas e químicas desses solos, tendo como resultado, uma conversão de solos Amazônicos

relativamente inférteis em manchas altamente férteis, aumentando a capacidade de troca de cátions e conteúdo dos nutrientes, bem como promovendo a estabilidade da estrutura física (BROSSI et al., 2014)

Essa estabilidade da matéria orgânica proporcionada pela presença das estruturas químicas com elevada quantidade de carbono presente nos ácidos húmicos, manteve-se ao longo dos séculos, mesmo após ações de decomposição e lixiviação sofridas pelos solos de TPI (CUNHA et al., 2009). O acúmulo de carbono pirogênico ou carvão, resultante de queimas naturais ou da ação antrópica datada deste o período pré-colombiano, tornou esses solos altamente férteis, além de fazer distinção física entre esses solos e os localizados adjacentes. A presença deste carvão além de acentuar a coloração escura do solo, contribui para o melhoramento das propriedades físico-químicas, e conseqüentemente biológicas dos solos das Terras Pretas, tendo papel importante na biogeoquímica do carbono global (GLASER et al., 2001; LIANG et al., 2010)).

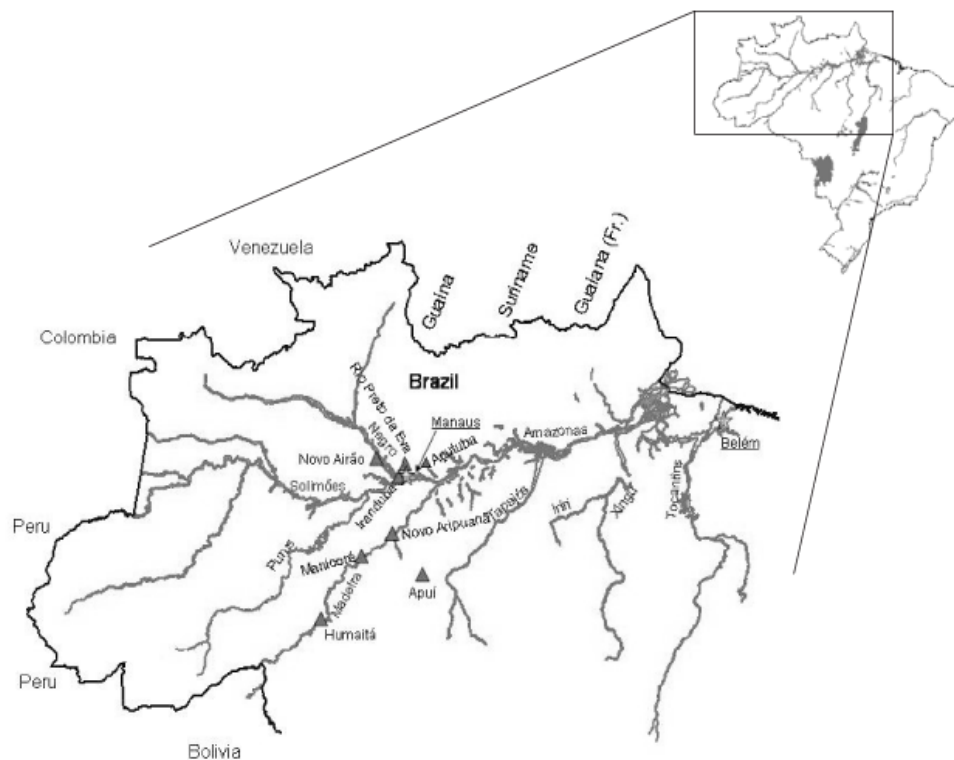


FIGURA 1 – Localização das áreas de solos de Terras Pretas de Índio no Amazonas. Os centros administrativos dos municípios estão destacadas por triângulos (▲). FONTE: Adaptado Cunha et al., (2009).

Caracterizam-se por serem solos ácidos com pH em torno de 5,2 a 6,4. A coloração escura é resultante de uma intensa decomposição de material orgânico depositado pelo homem. Vestígios de ocupação humana, primeiramente indígena, devido facilidade de colher tudo o que foi plantado, e posteriormente pela ocupação colonialista, podem-se ser confirmados pela presença de restos de materiais, como cerâmicas, carvão e artefatos líticos encontrados nessas áreas (GLASER et al., 2001). Resíduos de origem vegetal (folhas, sementes, cascas de frutos e talos de árvores) e animal (ossos, carapaças de quelônios, detritos humanos e gordura animal), além de grande quantidade de carvão vegetal (cinzas e restos de fogueiras) contribuíram enormemente para tornar o solo de TPI fértil (MADARI et al., 2010).

A presença de um solo que sofreu diversas ações antropogênicas durante os anos, pode ter permitido o surgimento de bactérias transitórias, ou seja, não pertencem normalmente ao solo, mas apareceram no habitat devido às condições favoráveis e a formação de substratos específicos, e assim, tornaram o solo mais útil para a agricultura (DROZDOWICZ, 1997; HANDELSMAN et al., 1998). Provavelmente, os solos de Terras Pretas constituem micro-ecossistemas próprios, que não se exaurem rapidamente, mesmo sob constante exposição das condições climáticas tropicais ou uso na agricultura, garantindo com isso, o desenvolvimento de pesquisas sobre a diversidade microbiana presente no solo de TPI.

Entretanto estudos de diversidade do solo de TPI utilizando o marcador filogenético 16S rRNA, permitiram averiguar os micro-organismos do Domínio Bactéria presentes nesse tipo de solo (FIGURA 2), onde pode-se observar que a maioria apresentada foi de bactérias não cultivadas, seguido de bactérias do gênero *Acidobacteria*, que englobam as bactérias ácido-tolerantes, o que corrobora com o fato de solo de TPI ter pH ácido (BATISTA, 2009).

Em solos com origem antropogênica, é previsível que comunidades microbianas distintas possam apresentar funções únicas e especializadas, com a capacidade de reter carbono altamente instável. Com base nisso, genes codificando importantes passos no ciclo do carbono, continuam escassos. A biodegradação por meio da atividade bacteriana é um dos mais importantes processos ocorrendo nos solos em relação a reciclagem de matéria orgânica, envolvendo genes que atuam em passos chaves no ciclo do carbono, bem como a degradação de poluentes no

ecossistema (Iwai et al., 2010). Esses resultados promovem bases para investigação de novas enzimas com potencial uso na biodegradação e biotecnologia industrial.

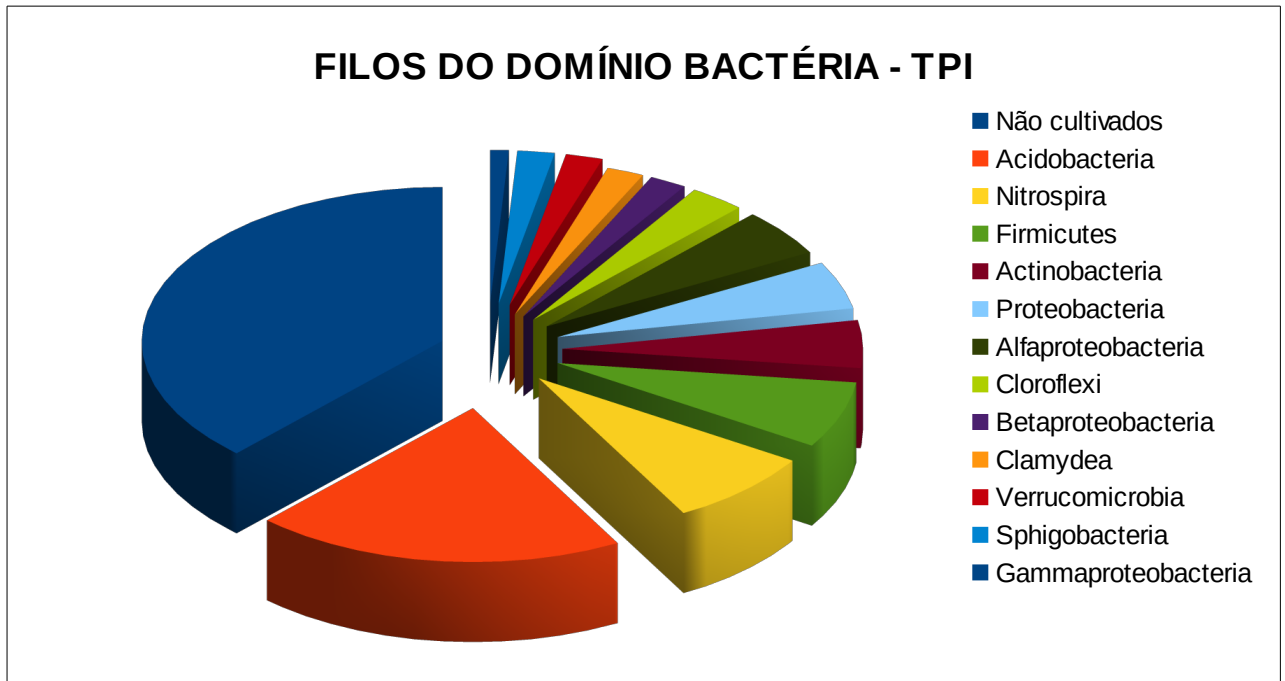


FIGURA 2 – Diversidade bacteriana dos solos de TPI.

Análises dos clones obtidos de uma biblioteca genômica de 16S rRNA nos solos de TP.

FORTE: Adaptado BATISTA (2009).

1.3 Compostos aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos são estruturalmente diversos e são uma abundante fonte de carbono e energia para crescimento de micro-organismos que os utilizam como substratos, sendo encontrado em todos organismos na forma de três aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). Representam cerca de 20% da biomassa de plantas terrestre devido a uma grande variedade de produtos secundários que estas produzem, e também pela presença do polímero aromático lignina, que é formada por unidades de fenilpropano, cuja a transformação incompleta resulta na formação de húmus, tornando o solo fértil. Embora sejam as plantas as principais produtoras dos compostos aromáticos, estas não possuem vias de degradação para reciclagem do carbono, necessitando do auxílio de bactérias degradadoras aeróbias e anaeróbias, que possuem um papel central na reciclagem

do carbono a partir de compostos que contém em sua fórmula anéis aromáticos (FUCHS et al., 2011).

A degradação microbiológica de compostos aromáticos tem sido extensivamente estudada devido à sua importância no ciclo do carbono bioquímico. Uma vez que muitos compostos aromáticos estão entre os principais poluentes ambientais derivados do petróleo (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), a sua detecção e remoção de locais contaminados são de grande interesse biotecnológico (DÍAZ et al., 2013). Primeiro ocorre a conversão dos compostos cíclicos estáveis e insaturados em intermediários capazes de entrar na via metabólica central. Entretanto, a estabilidade química dos hidrocarbonetos torna difícil sua metabolização pelos micro-organismos, a não ser que eles possuam vias de biodegradação alternativas especializadas envolvendo enzimas que catalisam reações químicas, ativando os anéis aromáticos e fragmentando-os em produtos mais facilmente metabolizados (HADDOCK, 2010). As estratégias usadas pelas bactérias para ativar e clivar os anéis aromáticos, dependem primeiramente da biodisponibilidade de oxigênio, onde na ausência de O₂, ocorrem reações de redução, e no catabolismo aeróbio, o átomo de oxigênio atua tanto quanto aceptor final quanto co-substrato para alguns processos específicos (FUCHS et al., 2011).

1.3.1 Degradação de compostos aromáticos

A degradação de compostos aromáticos por bactérias aeróbias encontradas no ambiente geralmente demandam de uma transformação inicial de vias periféricas convergindo de diferentes compostos iniciais para um número limitado de substratos derivados de dihidroxi-benzeno como, catecol ou protocatecoate, como pré-requisito para clivagem do anel (FIGURA 3) (SCHLÖMANN et al., 1994).

A desassimilação aeróbia para reciclagem do carbono ocorre em 3 etapas como pode ser observado na FIGURA 4. No primeiro estágio, o substrato sofre mudanças no grupo substituinte pela introdução de grupos hidroxilas por uma mono ou dioxigenase, para produzir um metabólito diidroxiaromático. Esses metabólitos, geralmente catecóis ou protocatecoates, estão presentes no catabolismo aeróbico de todos os substratos aromáticos (WILLIAMS; SAYERS, 1994).

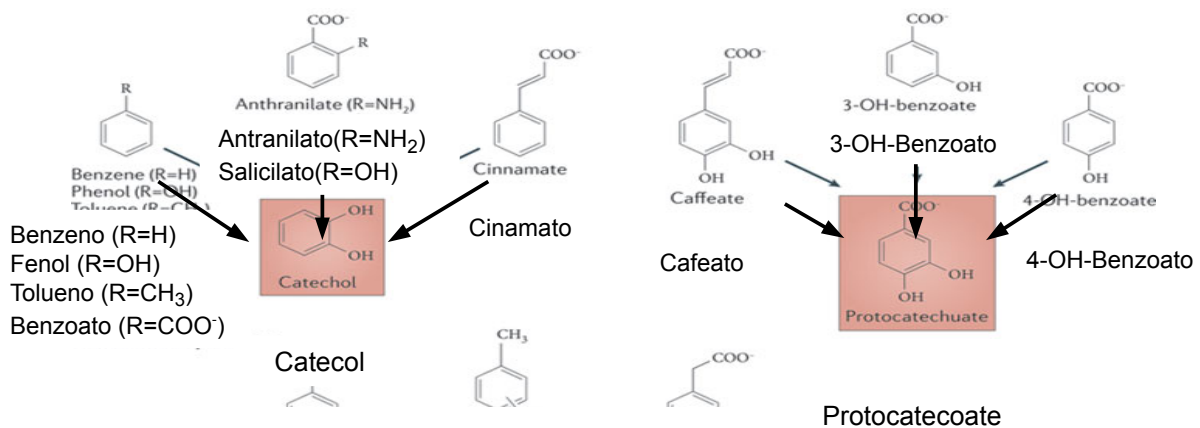


FIGURA 3 – Vias periféricas na degradação de compostos aromáticos.

Algumas vias aeróbias produzem catecol e protocatecoate como intermediários centrais, utilizados como substratos pelas dioxigenases para clivagem do anel. FONTE: Adaptado Fuchs; Boll; Heider (2011).

Os catecóis são substratos do segundo estágio do catabolismo, a abertura do anel, que ocorre pela quebra de um dos esqueletos carbono-carbono do anel pela adição de uma molécula de oxigênio, produzindo um ácido alifático insaturado. A clivagem do anel catalisada por dioxigenases é conhecida como orto-clivagem quando ocorre entre grupos hidroxilas (clivagem intradiol) e meta-clivagem quando ocorre adjacente a um dos anéis hidroxila (extradiol clivagem). O terceiro estágio consiste na conversão do produto do anel clivado em pequenos compostos alifáticos intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico, que são direcionados para o metabolismo central. Essa descircularização do anel aromático permite ao produto ser canalizado nas vias do metabolismo central celular e apoiar crescimento microbiano (WILLIAMS; SAYERS, 1994).

O interesse em estudar o metabolismo microbiano de compostos aromáticos decorre de seu importante papel no ciclo global do carbono e seu impacto direto na biorremediação de ecossistemas poluídos. Além disso, muitas das enzimas envolvidas nas vias de degradação são catalisadores chave em biotecnologia industrial (ISMAIL; GESCHER, 2012).

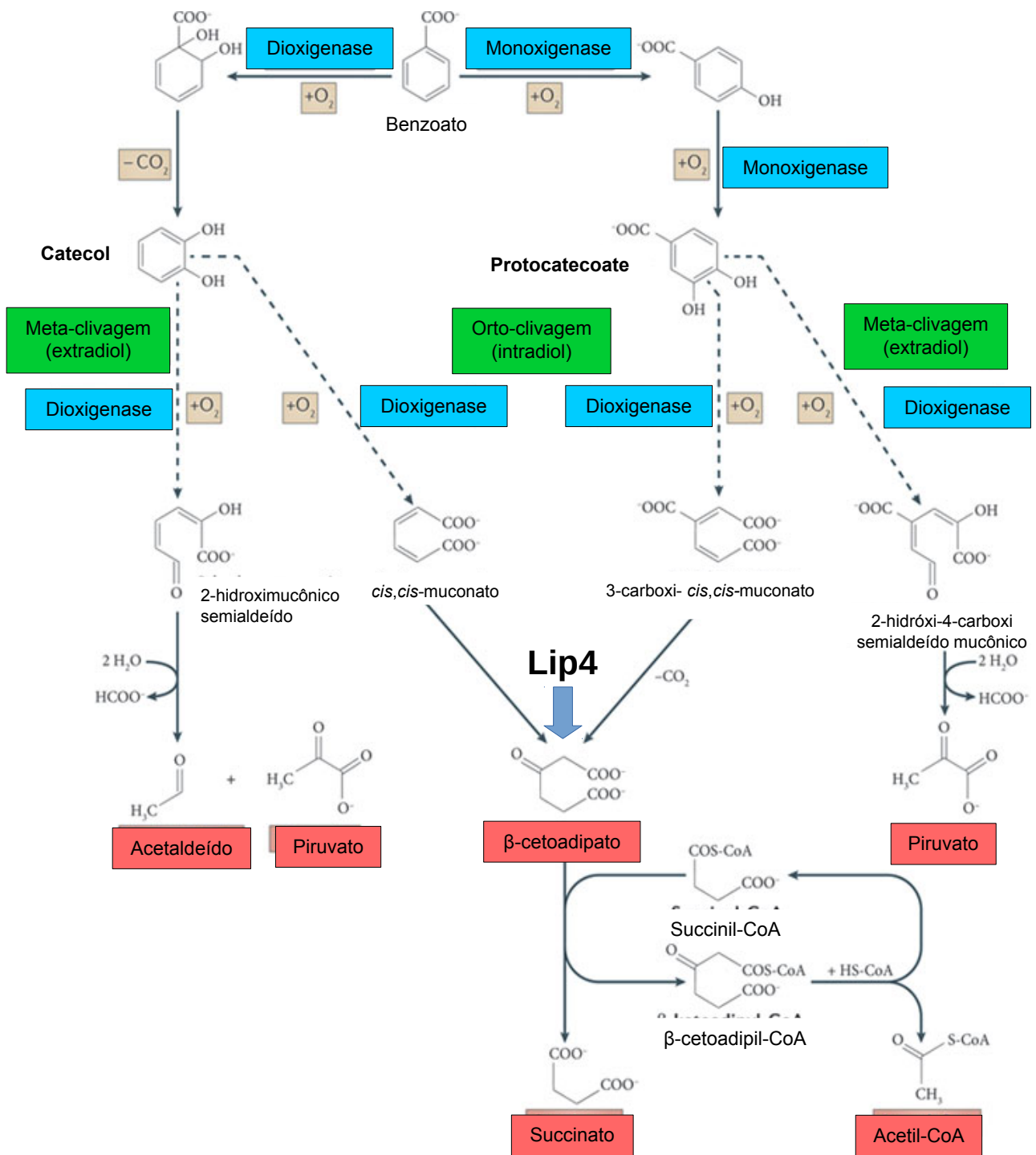


FIGURA 4 – Degradação aeróbica do benzoato em bactérias e fungos como exemplo de uma clivagem do anel aromático.

A clássica estratégia da clivagem do anel aromático na presença de O_2 , onde o benzoato é convertido a protocatecoate por mono ou dioxigenases, enquanto a grande maioria forma catecol. A clivagem do anel pela dioxigenase na via central pode ser entre dois grupos hidroxilas (orto-clivagem ou via β -cetoadipato) ou próximo a um dos grupos hidroxilas (meta-clivagem). FONTE: Adaptado Fuchs; Boll; Heider (2011).

1.3.2 Via β -cetoadipato

A via β -cetoadipato é uma via codificada cromossomalmente tanto em micro-organismos aeróbios quanto anaeróbios degradadores de compostos aromáticos, amplamente distribuída entre espécies de eubactérias e fungos, não sendo descrita entre membros das arqueias. A rota catabólica aeróbia é bem melhor estabelecida e conhecida por ser um intermediário chave entre as duas vias distintas na degradação de compostos aromáticos, o protocatecoate e o catecol. Na ortoclivagem, um ramo converte o substrato protocatecoate, que é um produto derivado de compostos fenólicos. A clivagem inicia-se pela ação da enzima 3,4-dioxigenase (E.C. 1.13.11.3) (gene *pcaA*), seguida de cinco enzimas adicionais, como a 3-carboxi-*cis,cis*-muconato cicloisomerase (E.C. 5.5.1.2) (gene *pcaB*), 4-carboximuconolactona decarboxilase (E.C. 4.1.1.44) (gene *pcaC*), β -cetoadipato enol-lactona hidrolase (E.C. 3.1.1.24) (gene *pcaD*), succinil-CoA: β -cetoadipato CoA-transferase (E.C. 2.8.3.6) (gene *pcaI/J*), e 3-oxoadipil-CoA-tiolase (gene *pcaF*), que convertem a clivagem do anel em produtos intermediários do ciclo do ácido carboxílico (FIGURA 4) (EULBERG et al., 1998). O outro ramo converte o substrato catecol, gerado a partir de vários hidrocarbonetos aromáticos, compostos aromáticos aminados, e monômeros de lignina. A clivagem do anel começa pela ação da enzima 1,2-dioxigenase (E.C. 1.13.11.1) (codificada pelo gene *catA*), seguida das enzimas *cis,cis*-muconato cicloisomerase (E.C. 5.5.1.1) (gene *catB*) e Mucolactona isomerase (E.C. 5.3.3.4) (gene *catC*), e então a abertura do anel lactona pela β -cetoadipato enol-lactona hidrolase (E.C. 3.1.1.24) e formação do produto β -cetoadipato (FIGURA 5) (HARWOOD; PARALES, 1996; ISMAIL; GESCHER, 2012).

Essa via foi identificada quase que exclusivamente em micro-organismos de solo, como forte representação em grupos de bactérias que estão associadas com plantas, tendo em vista o grande número de compostos fenólicos sintetizados por estas durante o crescimento, como por exemplo a lignina, que é um polímero encontrado na madeira (HARWOOD; PARALES, 1996).

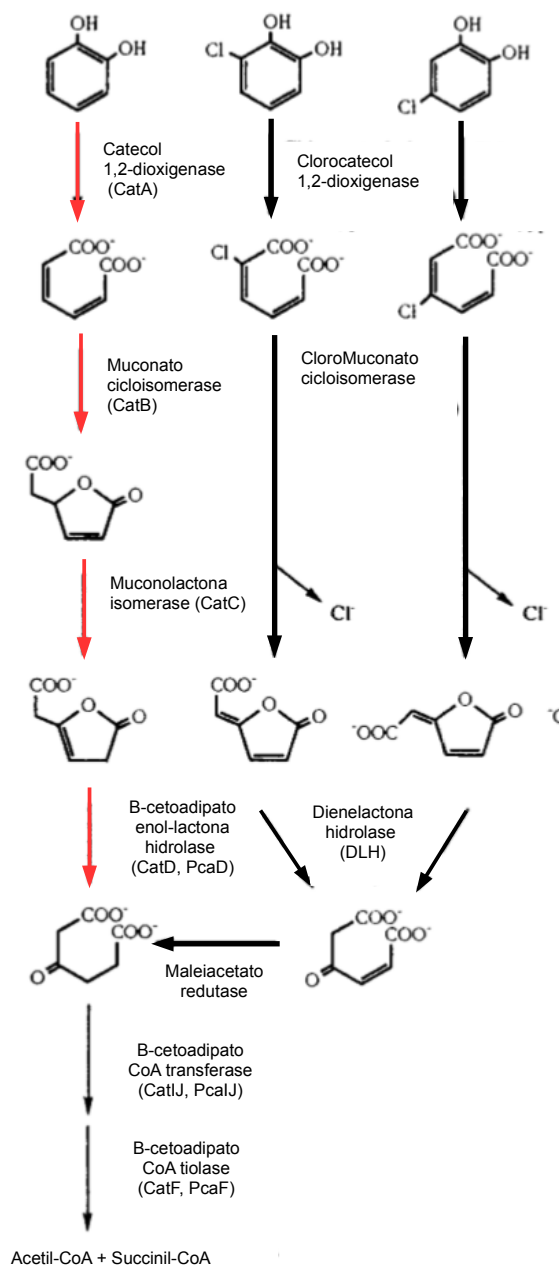


FIGURA 5 – Comparação entre as vias orto-clivagem β -cetoadipato e orto-clivagem modificada codificada em plasmídeos.

Vias paralelas para degradação do catecol (seta vermelha) e alguns clorocatecóis (seta preta). FONTE: Adaptado Harwood e Parales (1996).

1.3.3 Via orto-clivagem modificada e a enzima Dienelactona hidrolase (DLH)

O ramo catecol da via β -cetoadipato é precursor evolutivo de partes de uma terceira via de degradação de compostos aromáticos, conhecida como a via do clorocatecol, que catalisa a quebra de hidrocarbonetos aromáticos metilados como tolueno e xileno. É chamada também de via orto-clivagem modificada, e sua transmissão entre micro-organismos, ocorre por plasmídeos. A dienelactona hidrolase (DLH) é a terceira enzima participante do ramo do clorocatecol e catalisa a hidrólise de do substrato dienelactona entre as formas enantiômeras (*E*) e (*Z*) (KIM et al., 2005). Na fase inicial de preparação do anel para as subseqüentes clivagens, ocorre a decloração do anel e formação de uma dienelactona, enzima correspondente a β -cetoadipato enol-lactona formada na via β -cetoadipato. As enzimas que catalisam o passo de hidrólise do anel lactona demonstram diferenças significativas. Embora a dienelactona hidrolase da via orto-clivagem modificada e a β -cetoadipato enol-lactona hidrolase da via β -cetoadipato sejam relacionadas, dados de seqüência mostram que ambos grupos de enzimas não compartilham de uma identidade na seqüência de aminoácidos (HARWOOD; PARALES, 1996), apesar de ambas apresentarem características do dobramento das α/β hidrolases (OLLIS et al., 1992).

A DLH foi primeiramente identificada na espécie bacteriana *Pseudomonas* sp. B13 com uma massa molecular de 25,5 kDa e a tríade catalítica consistindo de uma cisteína nucleofílica (C¹²³), aspartato (D¹⁷¹) e histidina (H²⁰²) (OLLIS; NGAI, 1985). Mutações no resíduo catalítico para uma serina (DLH_{C123S}) tornaram a enzima pouco ativa para catálise do anel lactona do substrato dienelactona, mas capaz de interconverter entre as formas isoméricas (*E*) e (*Z*) (WALKER; EASTON; OLLIS, 2000). Embora haja uma semelhança estrutural da β -cetoadipato enol-lactona e dienelactona, a enol-lactona hidrolase (ELH) não foi aparentemente adaptada para converter dienelactonas da via clorocatecol durante a evolução das proteobactérias (SCHLÖMANN et al., 1990).

Uma comparação entre uma β -cetoadipato enol-lactona hidrolase, obtida a partir de uma *Burkholderia xenovorans* LB400 (PDBID: 2XUA), conhecida como PcaD, e uma dienelactona hidrolase (DLH) permitiu observar diferenças significativas na composição e estrutura do domínio CAP entre essas duas enzimas.

Essas regiões divergentes são intrigantes, pois o ramo catecol foi precursor evolucionário de partes da via clorocatecol (HARWOOD; PARALES, 1996). A PcaD possui um sítio ativo mais ocluso, onde a tríade catalítica está numa conformação mais torcida e menos exposta a solventes, permitindo apenas o acesso de um substrato pequeno e naturalmente torcido, oposto da DLH que possui um sítio ativo mais raso, favorecendo a ligação de um substrato linear como a diene lactona (BAINS et al., 2011).

É importante salientar que a degradação do clorocatecol para utilização como fonte de carbono e energia pelas células bacterianas, requer duas enzimas da via β -cetoadipato, que não são codificadas em plasmídeos na via da orto-clivagem modificada, sendo necessário que a via β -cetoadipato esteja presente e ativa na célula hospedeira (FIGURA 48) (HARWOOD; PARALES, 1996).

1.3.4 Aplicações favoráveis da via β -cetoadipato

Uma compreensão melhorada dos efeitos dos poluentes ambientais causados por compostos aromáticos originados por resíduos industriais, agrícolas, médicos e municipais tem estimulado pesquisas a respeito de um efetivo tratamento desses contaminantes e elaboração de estratégias de biorremediação. Micro-organismos capazes de degradar o anel aromático pela via β -cetoadipato estão tendo suas rotas catabólicas estudadas com objetivo de conhecer o processo de degradação microbiana e a subsequente conversão desses produtos em metabólitos favoráveis e com valor agregado (OLANIRAN; IGBINOSA, 2011).

Aplicações recentes discutiram a incorporação da via β -cetoadipato como meio para converter resíduos aromáticos de lignocelulose da parede celular de plantas em lipídios apropriados usados como combustível renovável e biodegradável, o biodiesel (WELLS; RAGAUSKAS, 2012). Os lipídios acumulados durante o processo de biossíntese metabólica dos ácidos graxos podem ser transesterificados com álcoois de cadeia curta (etanol ou metanol) em ácidos graxos etil ou metil ésteres que são convenientes para aplicações como alternativas de energia sustentável (KOSA; RAGAUSKAS, 2011).

O potencial uso da via β -cetoadipato para produção de bioenergia a partir de uma plataforma suplementar sustentável pode suprir a crescente demanda por

energia primária que tende a crescer aproximadamente 35% até 2040 (EXXONMOBIL, 2015). As modernas técnicas denominadas “ômicas” possibilitaram investigar o potencial catabólico dos micro-organismos sem a necessidade de cultivá-los por técnicas tradicionais de cultivo, e assim resgatar atividades enzimáticas que são relevantes para degradação de poluentes no ecossistema (oxigenases, hidrolases, esterases), por meio da extração do DNA total do ambiente de estudo e construção de uma biblioteca de genes capazes de serem rastreados para as mais diversas funções.

1.4 Metagenômica

As limitações impostas pelas técnicas de cultivo propiciam uma elevada taxa de redescoberta de compostos e enzimas já relatados. Visando descrever os micro-organismos que não foram cultivados e seus bioprodutos, foi desenvolvida uma técnica baseada na extração total do DNA a partir da coleção dos genomas da microbiota total de um habitat (HALEY et al., 1995), sendo mais tarde o termo cunhado de metagenômica (HANDELSMAN et al., 1998). Essa estratégia permite um maior acesso às informações genéticas dos micro-organismos, sendo considerada uma poderosa ferramenta com o objetivo de explorar a vasta biodiversidade das comunidades microbianas e possibilitar uma avaliação detalhada sobre a fisiologia e função de bactérias ainda não cultivadas (DANIEL, 2005; RIESENFELD et al., 2004; STEELE; STREIT, 2005)

1.4.1 Bibliotecas Metagenômicas

A construção de bibliotecas metagenômicas baseadas no cultivo independente das comunidades microbianas, tem sido de fundamental importância para descoberta de novos bioativos a partir de fontes procarióticas (VOGET et al., 2003). A exploração de diferentes fontes de biocatalisadores, permitiram acessar um grande número de genes codificando novas enzimas ou até, outras mais eficientes do ponto de vista biotecnológico (DANIEL, 2004; LORENZ et al., 2002;)

O emprego da metagenômica associado com a construção de bibliotecas mostraram alguns resultados positivos ao longo dos anos, como no estudo de genes específicos (STREIT et al., 2004; VOGET et al., 2003), determinação de vias

biossintéticas complexas (COURTOIS et al., 2003; GILLESPIE et al., 2002) ou para descoberta de novas enzimas hidrolíticas, como as amilases (YUN et al., 2004), lipases (HENNE et al., 2000) ou proteases (GUPTA et al., 2002).

1.4.2 Técnicas de Análise do Metagenoma

Uma vez construída, as bibliotecas metagenômicas podem ser rastreadas para uma ampla variedade de fenótipos de interesse tanto ecológico quanto biotecnológico. Existem duas estratégias utilizadas para prospectar novos genes a partir das bibliotecas: o método baseado em função, e o baseado em sequências (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

A estratégia funcional seleciona os clones pela atividade onde mudanças causadas por reações enzimáticas são detectadas, sendo considerada uma técnica simples, barata e rápida, empregada nas áreas médicas, agrícolas e industriais, pois permite maior rapidez na obtenção de clones (RONDON et al., 2000; VOGET et al., 2003). Podem ser realizadas de 3 maneiras: **a.** cada clone é testado individualmente por detecção visual na função desejada (inibição do crescimento, resistência aos antibióticos ou vias bioquímicas complementares), permitindo encontrar um número limitado de clones; **b.** seleção de alta quantidade de clones, utilizando um método rápido e automatizado para separar candidatos desejados de outros clones por triagem de células fluorescentes, técnica denominada por Uchiyama et al. (2005) de SIGEX (Seleção por Expressão Gênica Substrato-Induzida); e **c.** por seleção por função, onde somente um clone raro cresce entre centenas de milhares de clones analisados, em grande parte devido a falta de eficiência de expressão dos genes nas linhagens hospedeiras (HANDELSMAN, 2005). Porém esta estratégia tem potencial para identificar novas classes de genes codificadores tanto para funções conhecidas como para novas funções (KENNEDY et al., 2011).

Já a metodologia baseada em sequências não depende da expressão dos genes clonados (DANIEL, 2004), e sim do desenho de iniciadores para a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) ou sondas de hibridização de genes alvos que são derivados a partir de regiões conservadas das famílias de genes conhecidos (ROH et al., 2007), podendo ser uma desvantagem, pois não é uma técnica seletiva para genes de grande comprimento (KNIETSCH et al., 2003), e isto pode limitar as novas

descobertas, uma vez que necessita de um amplo banco de dados para as análises (DANIEL, 2005; RIESENFELD et al., 2004; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003; YUN; RYU, 2005). Buscando contornar essa desvantagem, foi utilizada a abordagem de sequenciamento do DNA clonado, ou a partir das extremidades pela técnica de metagenoma “walking”, ou pelo sequenciamento de todo o DNA metagenômico de uma determinada amostra por meio de sequenciamento de nova geração (BRAGG; TYSON, 2014; MORIMOTO; FUJII, 2009; VENTER et al., 2004).

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de genoma “walking”, para sequenciar o fragmento com atividade hidrolítica, obtido a partir da construção da sub-biblioteca proveniente do clone fosmidial Fos4, e encontrar a sequência de nucleotídeos correspondente ao gene da esterase *lip4*.

1.4.3 Importância da Metagenômica na descoberta de novos biocatalisadores

Substâncias que aumentam a velocidade da reação química sem serem consumidos durante o processo, são conhecidos como catalisadores. A exploração da biodiversidade na busca por novos catalisadores biológicos a partir de micro-organismos está levando a descoberta de novas enzimas (CARVALHO et al., 2005). Os genomas de espécies de procariotos não cultivados codificam uma enorme reserva de novas enzimas com capacidades metabólicas ainda inexploradas (SIMON; DANIEL, 2011).

As enzimas apresentam uma função catalítica extraordinária, em geral muito maior que a dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Possuem alto grau de especificidade por seus substratos, acelerando reações químicas de uma maneira formidável e funcionam em soluções aquosas sob condições muito suaves de temperatura e pH e estas são conhecidas por serem biocatalisadores naturais (SANGEETHA et al., 2011).

O aprimoramento da moderna técnica metagenômica permitiu descobrir a partir de micro-organismos, novas enzimas hidrolíticas, como as lipases (HENNE et al., 2000; MEILLEUR et al., 2009), esterases (CHU et al., 2008; KIM et al., 2006), xilanases (HU et al., 2009), celulasas (DUAN, et al. 2009; HEALY et al., 1995;), amilases (RONDON et al., 2000; VOGET et al., 2003), quitinases (COTTRELL et al., 1999) provenientes de diversas fontes de cultivo. Dentre as enzimas hidrolíticas de

maior interesse biotecnológico, estão as lipases e esterases, que são biocatalisadores versáteis capazes de atuar em diferentes reações, tanto na presença de água, quanto em meio restrito ou insolúvel.

As lipases e esterases possuem uma gama de aplicações biotecnológicas, que vão desde indústria de alimentos até a produção de perfumes e desenvolvimento de fármacos. Por meio da ferramenta metagenômica mais de 80 novas enzimas lipolíticas foram identificadas, porém poucas foram caracterizadas, o que é de fundamental interesse para as aplicações em processos biotecnológicos (SHARMA et al., 2001). A busca novas enzimas lipolíticas com características diferenciadas para as diversas aplicações industriais, como por exemplo, a produção de energia renovável, vem crescendo ao longo dos anos, devido principalmente a modernização das técnicas moleculares (WELLS; RAGAUSKAS, 2012).

1.4.4 Tributirina como substrato

A demanda industrial por novas fontes de lipase continua a estimular o isolamento e rastreio de novos micro-organismos lipolíticos. Diferentes métodos de detecção e determinação da atividade lipolítica são empregados, e um dos mais práticos e de fácil acesso são os substratos naturais como a tributirina e a trioleína, que permitem a visualização do halo hidrolítico ao redor da colônia. A tributirina é um substrato oleoso composto de uma molécula resultado da condensação do glicerol e três moléculas de ácido butírico (FIGURA 6) (ALDRICH, 2015). Entretanto, devido a sua facilidade de dispersão em água, é mais conveniente que a trioleína, uma vez que este é insolúvel em água e sua estabilidade depende de um emulsificador uniforme (LIMA, 1991).

Portanto, o uso de tributirina é adequada para rastreios preliminares de um grande número de diferentes micro-organismos, uma vez que esse método oferece algumas vantagens como: medição fácil com surgimento de uma zona clara bem definida no meio opaco que pode ser percebida num curto período de incubação; medição da atividade durante o crescimento do cultivo; re-isolamento dos clones após ensaio; além de ser um método sensível pela detecção da hidrólise em baixas atividades (LIMA, 1991). Entretanto, como esse substrato detecta a hidrólise tanto de esterases, quanto de lipases, novos ensaios com meio de cultura suplementado

com óleo de oliva tem sido empregados na busca por colônias lipases-positivas (HUBE et al., 2000; KIM et al., 2001).

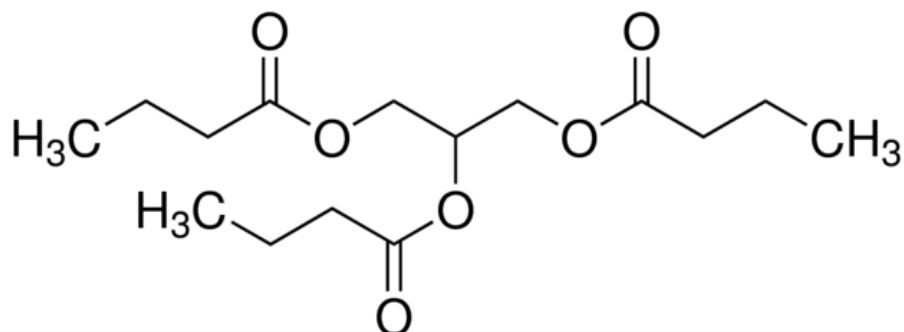


FIGURA 6 – Fórmula estrutural da tributirina. Substrato lipídico derivado de uma molécula de glicerol e três ácidos butíricos ($C_{15}H_{26}O_6$).

1.5 Enzimas

Enzimas são catalisadores naturais, possuindo propriedades únicas que as tornam altamente desejáveis na natureza para aplicações em processos industriais. Isto deve-se a sua biodegradabilidade, alta especificidade e alta eficiência catalítica. As lipases encontram-se numa posição proeminente com biocatalisadores industriais (SANGEETHA et al., 2011).

Mais de 3700 enzimas foram catalogadas até hoje e estão divididas em 6 grupos, classificados de acordo com o substrato e a reação de catálise específica pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) (1992). (TABELA 1).

TABELA 1 – Classificação internacional das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

GRUPO DE ENZIMAS	TIPO DE REAÇÃO	Nº ENZIMAS LISTADAS NO NC-IUBMB*
OXIRREDUTASES	Catalisam reações de oxidação-redução, envolvendo oxigenação ou remoção de hidrogênio.	1011
TRANSFERASES	Mediam a transferência de grupos acil, açúcares, fosforil e aldeído ou porções de cetonas de uma molécula para outra.	1057
HIDROLASES	Promovem hidrólise e formação de ésteres, glicosídeos, amidas, éteres, peptídeos e outros grupos de contêmham C-N.	1041
LIASES	Catalisam reações de adição, usualmente de HX, as duplas ligações como C=C, C=N, e C=O, e também os processos reversos.	312
ISOMERASES	Efetuem várias isomerizações, incluindo migração da ligação C=C, isomerização cis-trans e racemização.	157
LIGASES	Mediam a formação ou clivagem de C-O, C-S, C-N, C-C, e ligações ésteres fosfato, por meio de reações acopladas a quebra de ATP.	129

*Atualização Maio-2015

As hidrolases, recebem esse nome pois catalisam a clivagem de ligações numa reação com a água. Compreendem um grande grupo de enzimas, que engloba as proteases, amilases, xilanases, oxirredutases, ligases, esterases e lipases.

1.6 Lipases e esterases

O termo “enzimas lipolíticas” é usado para englobar lipases (EC* 3.1.1.3) e esterases (EC 3.1.1.1), enzimas quem atuam catalisando tanto a hidrólise quanto a

* EC = Número da Comissão de Enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

síntese de ésteres formados de glicerol e ácidos graxos (FIGURA 7) (ARPINGY; JAEGER, 1999)

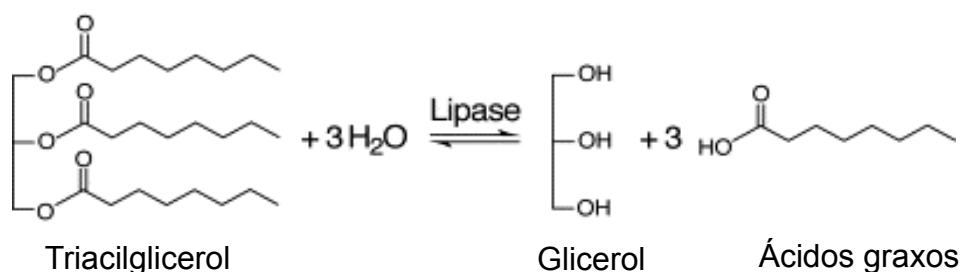


FIGURA 7 – Ação catalítica das enzimas lipolíticas.

Um triacilglicerol pode ser hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos, ou a reação reversa (síntese) pode combinar glicerol e ácido graxo para formar triacilglicerol. FONTE: Adaptada de Jaeger e Reetz (1998).

Essas enzimas têm um papel fisiológico importante, pois na presença de água, convertem triacilgliceróis para as formas mais polares, diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos livres e glicerol (JANSEN, 1983). Essa reação de hidrólise é reversível, e na presença de quantidades inferiores de água, frequentemente na presença de solventes orgânicos, as enzimas lipolíticas são eficazes catalisadoras na síntese de ésteres por esterificação e transesterificação (FIGURA 8). As reações lipolíticas ocorrem na interface lipído-água, onde substrato geralmente forma uma equilíbrio entre os estados monoméricos, miscelar e emulsificados (GUPTA et al., 2003).

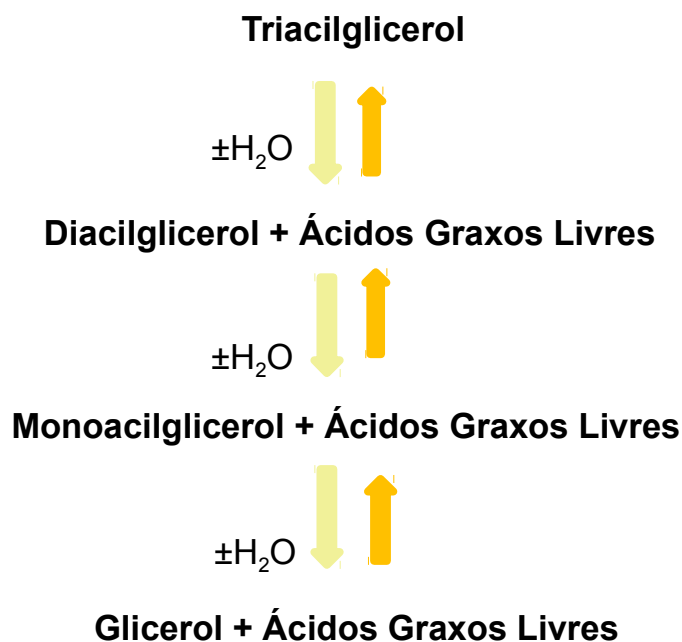


FIGURA 8 – Esquema das reações catalisadas pelas enzimas lipolíticas. O sentido direto (reações de hidrólise – seta amarela) ou sentido inverso (reações de síntese – seta laranja) são controlados pela quantidade de água presente no meio reacional. As reações hidrolíticas ocorrem em meio aquoso, enquanto as reações de esterificação e transesterificação, ocorrem em baixa quantidade de água. FONTE: Adaptada de Macrae e Hammond (1985).

A especificidade das lipases é geralmente crucial para sua aplicação para fins analíticos ou industriais. De acordo com Macrae e Hammond (1985), elas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com a regioespecificidade exibida com o substrato, ou seja, é a capacidade da enzima de selecionar a posição da ligação éster numa molécula. Lipases não específicas – catalisam a quebra completa do triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, possuem intermediários de di- e monoacilgliceróis. Não mostram especificidade em relação à posição da ligação éster na molécula de glicerol, ou na natureza do ácido graxo; Lipases 1,3 específicas – catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente nas posições 1 e 3 dos acilgliceróis (FIGURA 9). Considerando que 1,2 (2,3) diacilglicerol e 2 monoacilglicerol são quimicamente instáveis podem ser isomerizados

espontaneamente, ocorrendo hidrólise total caso a reação seja por tempo prolongado.

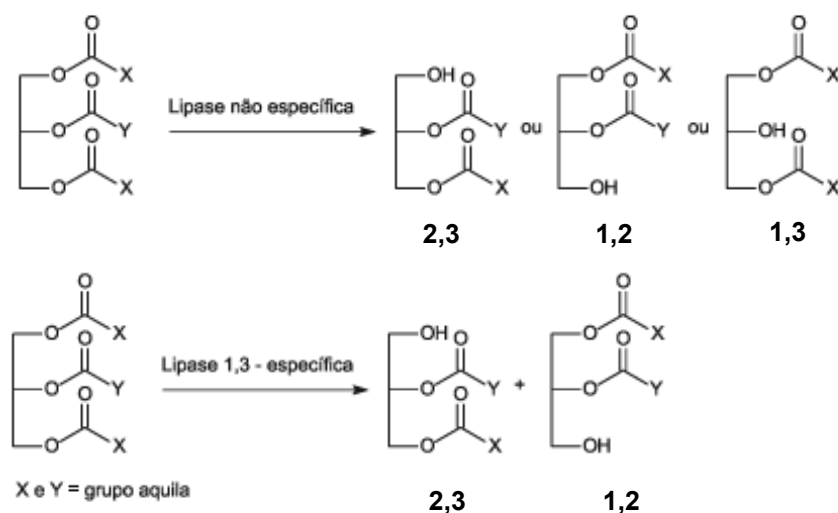


FIGURA 9 – Reações de regiospecificidade catalisadas por lipases.

(A) Tipo não-específica, que hidrolisam ésteres primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2; **(B)** Tipo 1,3 específica, que hidrolisam apenas ésteres primários, ou seja, nas posições 1 ou 3. FONTE: Retirado manuscrito de Paques e Macedo (2006)

As lipases são definidas como carboxilesterases que catalisam a hidrólise ou síntese de cadeias de acilgliceróis longas, ou seja, com ≥ 10 átomos de carbono, insolúveis em meio aquoso, já as esterases atuam hidrolisando ésteres de cadeia < 10 carbonos solúveis em água. Entretanto, a maioria das lipases são perfeitamente capazes de hidrolisar os substratos de cadeia de carbono pequena (JAEGER; DJKSTRA; REETZ, 1999).

A catálise das lipases por ocorrer numa interface lipídio-água, possibilita a maioria das lipases realizarem um fenômeno conhecido como **ativação interfacial**, no qual ocorre um aumento da atividade catalítica, observada apenas na presença de superfícies insolúveis, o que as difere das esterases. Na ativação interfacial, um laço peptídico anfifílico cobre o sítio ativo da enzima na solução, como uma tampa, tornando-o inacessível ao solvente. Quando ocorre contato da lipase com a interface lipídio/água, há um rearranjo conformacional promovendo a abertura da tampa e o acesso ao sítio ativo que contém a tríade catalítica (FIGURA 10) (WONG; SCHOTZ,

2002). Entretanto, nem todas as lipases apresentam o fenômeno da ativação interfacial, permanecendo a primeira definição como a mais abrangente.

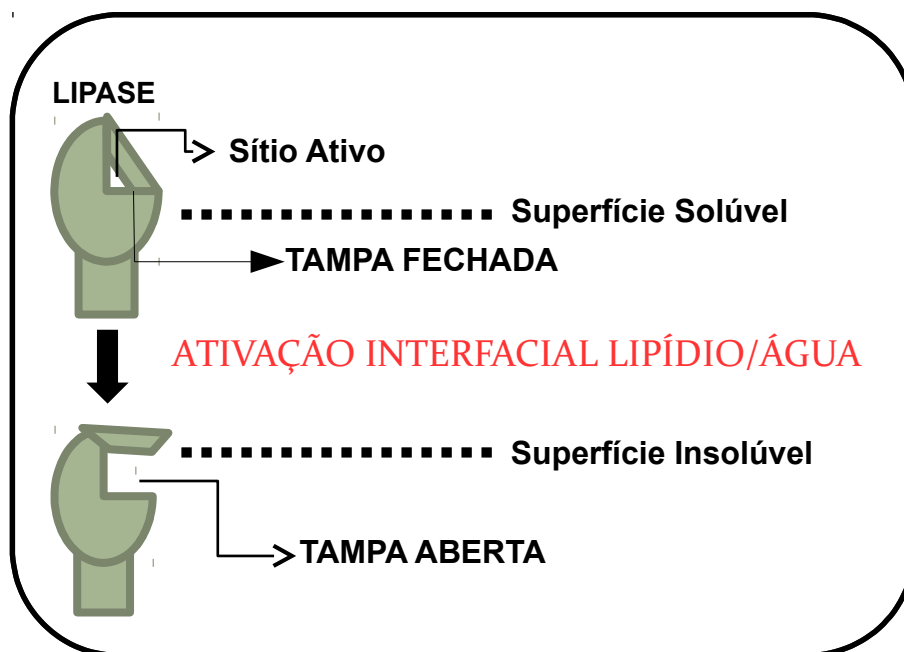


FIGURA 10 – Esquema do fenômeno da ativação interfacial nas lipases. Esse fenômeno presente apenas nas lipases, possibilita a exposição do sítio ativo da enzima na presença de uma superfície hidrofóbica. FONTE: Adaptado Maruyama et al. (2000).

1.6.1 Estrutura das enzimas lipolíticas

As “enzimas lipolíticas” possuem uma estrutura conservada composta por dobramento α/β , onde o núcleo hidrofóbico é composto por 8 β -fitas para formar uma folha- β ($\beta 1$ - $\beta 8$, onde somente a segunda β é antiparalela em relação as demais β -fitas), conectada por seis α -hélices (SCHRAG; CYGLER, 1997). Esses dobramentos admitem grandes inserções na sua estrutura, seja desde poucos resíduos de aminoácidos ou a adição de domínios extras completos, sem prejudicar a maquinaria catalítica, concedendo aos membros dessa família, uma alta habilidade evolutiva e de adaptabilidade (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

Apesar da similaridade estrutural, essas enzimas não compartilham qualquer semelhança de sequência ou não operam sob substratos parecidos, ou então não usam o mesmo sítio nucleofílico. Entretanto, elas preservam o arranjo estrutural dos

resíduos presentes no sítio ativo, sugerindo uma possível evolução, a partir de um ancestral comum (OLLIS et al., 1992). Os resíduos catalíticos que compõem a tríade altamente conservada são: um resíduo nucleofílico (Ser, Cys ou Asp), posicionado logo após a $\beta 5$, um resíduo ácido catalítico (Asp ou Glu), que é quase sempre posicionado depois da fita $\beta 7$, um resíduo de histidina, que é o único altamente conservado, embora o formato e comprimento do laço onde está localizado possa diferir consideravelmente entre os vários membros da família (FIGURA 11). Os dobramentos das α/β hidrolases formam uma espécie de abrigo estável para o sítio ativo da enzima. (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

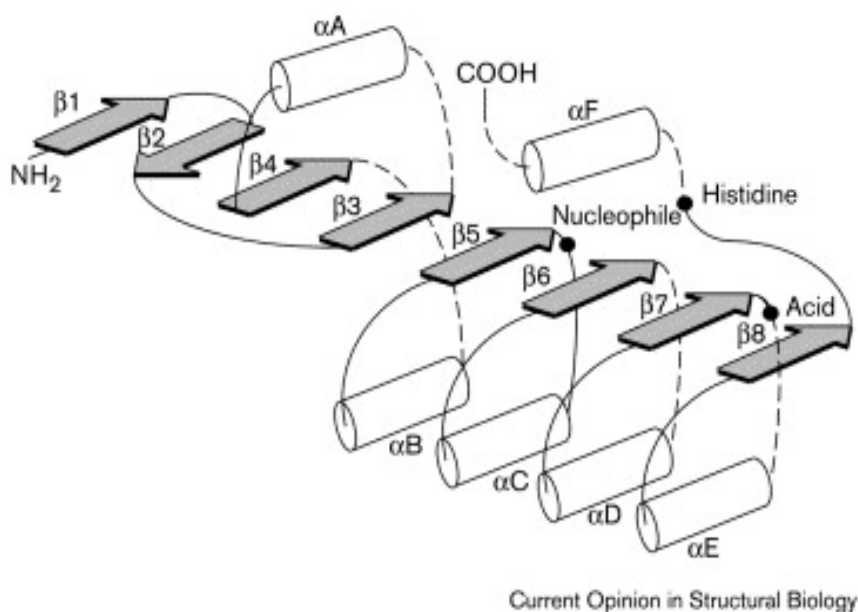


FIGURA 11 – Diagrama da estrutura secundária do dobramento canônico das α/β hidrolases.

As α -hélices estão representadas por cilindros brancos e as β -fitas por setas cinzas. A tríade catalítica está indicada por pontos pretos. As linhas rachadas indicam localização de possíveis inserções. FONTE: Adaptada de Nardini e Dijkstra (1999).

O resíduo nucleofílico está localizado numa curvatura acentuada da molécula, onde pode ser facilmente abordado pelo substrato. Essa curva é conhecida como curva nucleofílica e abriga o pentapeptídeo conservado, formado pelos aminoácidos

Gly-X-Ser-X-Gly, presente nas serina hidrolases, que abrange umas das maiores e amplamente distribuídas classes de enzimas, incluindo as lipases, esterases, peptidases e amidases, na qual utilizam um resíduo conservado de serina nucleofílica para hidrolisar substratos (JAEGER et al., 1999; SIMON; CRAVATT, 2010). A geometria da curva nucleofílica contribui para formação de uma fenda oxaniônica, que é necessário na estabilização do estado de transição da carga negativa que ocorre durante a hidrólise. A reação de hidrólise ocorre em quatro etapas: na primeira, um átomo de oxigênio do grupo hidroxila do resíduo de serina ataca o carbono carbonila do éster lipídico (FIGURA 12-A). Ocorre a formação de um intermediário tetraédrico, caracterizado por uma carga negativa no átomo de oxigênio carbonila na ligação éster e quatro átomos ligados no carbono carbonila (FIGURA 12-B). As ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio de carbonilo carregado negativamente e dois átomos de NH da cadeia principal, conhecida como fenda oxianiônica, é responsável pela estabilização na distribuição de cargas e redução da energia (JAEGER et al., 1999). Essa fenda é geralmente formado por dois átomos de nitrogênio da cadeia principal, onde o primeiro é sempre um resíduo imediatamente a seguir ao nucleofílico, já o segundo é geralmente localizado entre a fita β_3 e a hélice α_1 . (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

No terceiro passo da hidrólise, o componente ácido do substrato é esterificado pelo resíduo de serina (formando intermediário acil-enzima). (FIGURA 12-C). O passo de desacilação, um nucleófilo, geralmente molécula de água, ataca a enzima acetilada. O resíduo de histidina doa um próton para o átomo de oxigênio do resíduo de serina, a ligação éster entre serina e grupo acil é quebrada, levando a liberação do produto e regeneração do sítio catalítico (FIGURA 12-D) (JAEGER et al., 1999).

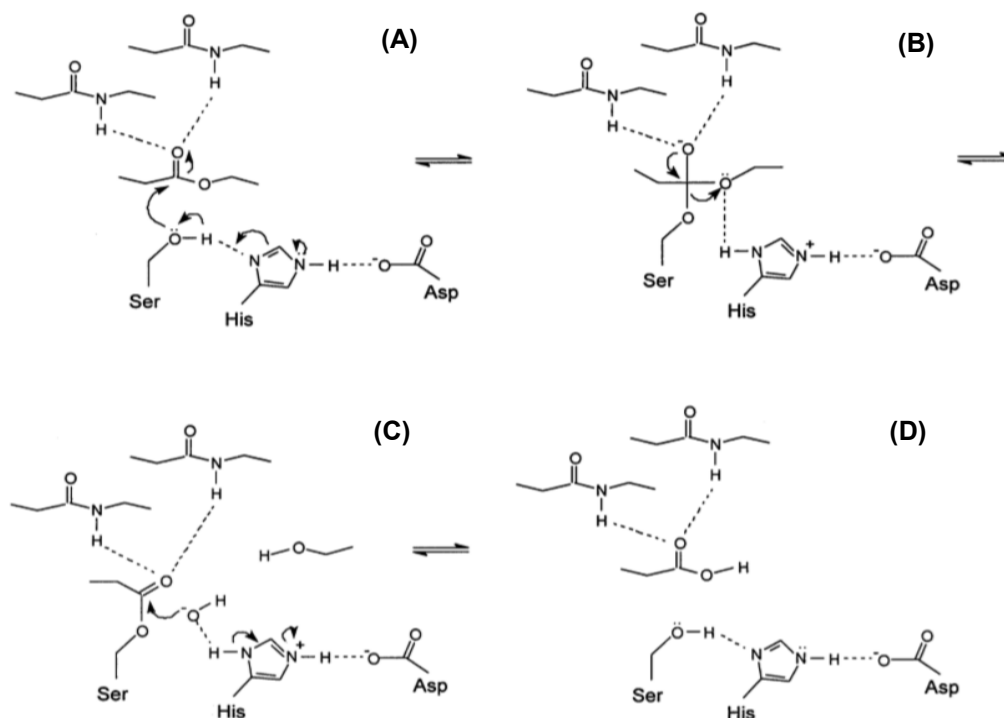


FIGURA 12– Mecanismo de catálise das lipases.

(A) Ligação do lipídio e ativação do resíduo serina nucleofílico. **(B)** Formação do intermediário tetraédrico, com estabilização do O⁻ pela interação com dois grupos NH peptídicos. **(C)** O intermediário acil-enzima é formado e sofre ataque nucleofílico por uma molécula de água. **(D)** Liberação do produto e sítio catalítico é restituído. FONTE: Retirado manuscrito Jaeger et al., 1999.

1.6.2 Classificação das lipases e esterases bacterianas

A arquitetura de domínios compartilhada pelas enzimas lipolíticas permitiu sua classificação em oito diferentes famílias baseado em suas sequências de aminoácidos conservadas e nas propriedades catalíticas de cada enzima (ARPINGY; JAEGER, 1999). Com a descoberta de novas lipases e esterases e a resolução de estruturas tridimensionais por cristalografia, Hausmann e Jaeger (2010) reformularam algumas características dos membros das famílias das lipases microbianas.

A família I está subdividida em 8 subfamílias e compreende todas as lipases consideradas verdadeiras, ou seja, aquelas enzimas ativadas em uma interface lipídio-água e que contem uma tampa cobrindo o sítio ativo, movendo-se quando em contato com a interface (FIGURA 13) (WANG et al., 2010). A tabela a seguir evidenciam características de cada subdivisão da Família I (TABELA 2).

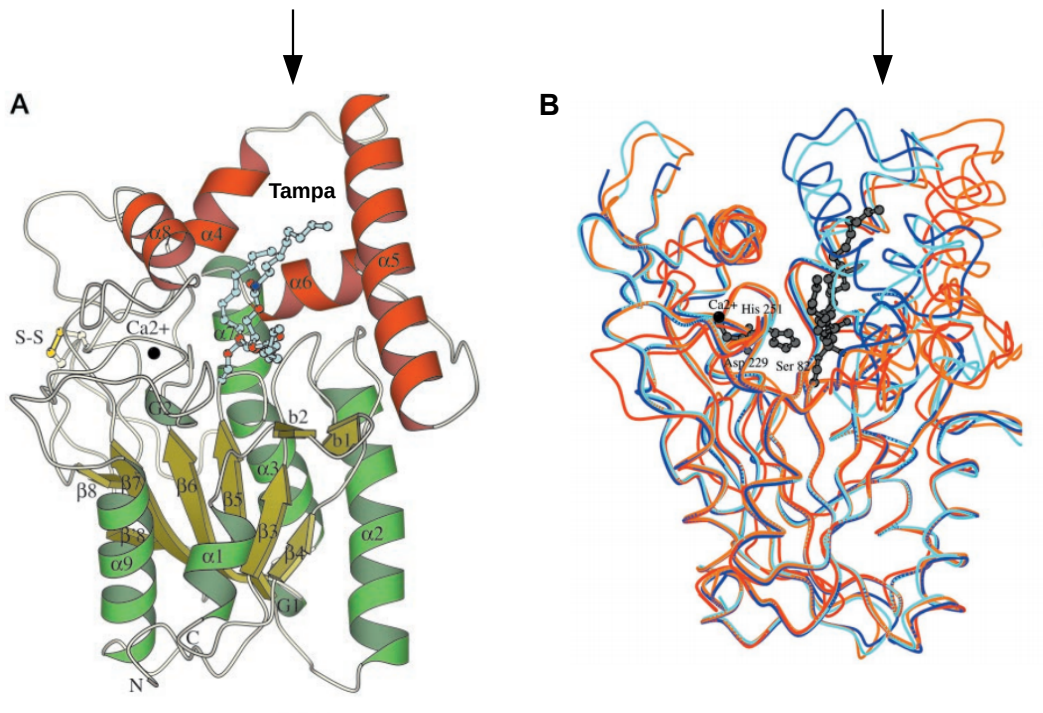


FIGURA 13 – Visão da estrutura de uma lipase verdadeira com a tampa cobrindo sítio ativo.

Lipases verdadeiras da família I das lipases bacterianas mostrando a estrutura da tampa. **(A)** Visão esquemática da estrutura secundária de *Pseudomonas aeruginosa* (PAL), onde as α -hélices pertencentes a tampa envolvida na ligação do substrato estão destacadas em vermelho. **(B)** Estrutura 3D da superimposição da lipase PAL com as lipases de *Burkholderia cepacia* (BCL), *Burkholderia glumae* (BGL) e *Chromobacterium viscosum* (CVL), onde PAL (vermelho) e BCL (laranja), estão na conformação aberta, e BGL (azul) e CVL (ciano) estão na conformação fechada. Sítio catalítico com o substrato ligado estão destacados em cinza. FONTE: Retirado manuscrito Nardini et al. (2000).

TABELA 2 – Subdivisão da Família (Subf.) I das Lipases Bacterianas (ARPINGY; JAEGER, 1999; HAUSMANN; JAEGER, 2010).

Subf.	Grupo	Descrição	Exemplos
I.1		Englobam lipases de bactérias com sistema de secreção do tipo II e a presença de dois resíduos de ácido aspártico que coordenam o cátion Ca^{+2} . Alta similaridade de sequência com as lipases de <i>Pseudomonas aeruginosas</i> e MM em torno de 30 a 32 kDa. Possui	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas wisconsinsis</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
I.2	Gram-Negativas	Características iguais membros I.1, porém seus membros possuem significativa similaridade com lipases de <i>Burkholderia glumae</i> e apresentam maior MM devido à presença de uma fita- β antiparalela adicional.	<i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>B. cepacia</i>
I.3		Possuem massa molecular de 50-60kDa e são exportadas pelo sistema de secreção Tipo I. Uma comparação entre estruturas terciárias revelou que essa enzima é mais evolutivamente relacionada às lipases eucarióticas do que lipases bacterianas.	<i>P. fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i>
I.4		Compreende muitas lipases do gênero <i>Bacillus</i> , e possui um resíduo de alanina no pentapeptídeo conservado (Ala-X-Ser-X-Gly). Consiste das menores lipases identificadas (MM de 20 kDa) e máxima atividade em pH 10-11.5.	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i>
I.5	Gram-Positivas	Lipases do gênero <i>Bacillus</i> tem apenas 15% de similaridade com as da subfam. I.4. Possuem uma grande inserção no esqueleto canônico das $\alpha\beta$ -hidrolases, formado por um sítio de ligação ao Zn^{+2} , que promove uma estabilidade contra inativação térmica. MM de 46 kDa e pH 7.5 a 9.5.	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Geobacillus sp.</i> , <i>Clostridium sp.</i>
I.6		MM de 75 kDa e carregando um domínio N-terminal com 200 aminoácidos que são necessários para uma eficiente translocação e possivelmente atuam como uma chaperona. Ampla gama de substratos e estabilidade entre pH 4 a 9.	Compreende as lipases das espécies de <i>Staphylococcus</i>
I.7	Novas inclusões	Caracterizam-se por atuarem em uma ampla gama de substratos (C_2 - C_{16}), o que possibilita exercerem funções como fatores de virulência, mediando a liberação de compostos inflamatórios	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> , <i>Propionibacterium acnes</i>
I.8		Possui apenas um membro descrito com uma MM de 51 kDa e está associado a membrana externa de bactérias, com atividade aumentada frente ésteres com cadeia acil longas.	<i>Pseudoalteromona haloplankytis</i>

As carboxilesterases foram agrupadas nas outras sete famílias (II-VIII), onde recentemente, a família VIII foi identificada por não apresenta a estrutura típica das α/β hidrolases, e sim uma estrutura de β -lactamases. A TABELA 3 apresenta uma descrição das Famílias II a VIII, baseada na classificação de Arpingy & Jaeger (1999).

TABELA 3 – Classificação das Famílias II a VIII das Lipases Bacterianas (ARPINGY; JAEGER, 1999; HAUSMANN; JAEGER, 2010).

Família		Descrição	Exemplos
II	GDSL	Apresenta um motivo conservado tetrapetídico (Gly-Asp-Ser-Leu) localizado na porção N-terminal das proteínas, ao invés do pentapetídeo convencional (Gly-X-Ser-X-Gly). A família GDSL possui 5 blocos de aminoácidos conservados, com o tetrapeptídeo posicionado no bloco 1.	Membros relacionados com virulência, como: <i>S. Typhimurium</i>
	SGNH	Proposta com base na arquitetura dos quatro blocos da GDSL na estrutura primária, e a apenas a serina catalítica conservada no tetrapeptídeo do bloco 1 (Ser-Gly-Asn-His).	<i>Photobacterium luminescens</i>
III		Engloba enzimas extracelulares com MM de 32-35 kDa e estão associadas a fatores acetilhidrolases de ativação de plaquetas.	<i>Streptomyces sp.</i> , <i>Moraxella sp.</i>
IV	Lipases Hormônio Sensíveis (HSL)	Similaridade com a família de lipases hormônio sensíveis de mamíferos, no qual, três blocos conservados foram identificados, sendo os blocos 2 e 3 contendo resíduos da tríade catalítica, mas o bloco 1 possui um motivo conservado His-Gly-Gly-Gly que envolve uma interação de hidrogênio que estabiliza a fenda oxaniônica e promove a catálise. Algumas estruturas já resolvidas dessa família identificaram a presença de um domínio CAP que difere da tampa encontrada nas lipases verdadeiras (FIGURA 14).	<i>A. acidocaldarius</i> , <i>E.coli</i> , <i>Archeoglobus fulgidus</i> , <i>Alcaligenes eutrophus</i>
V		Diferentes gêneros de organismos psicrófilos (vivem em temperatura baixa), mesófilos (média) e termófilos (altas). Compartilham homologia com outras enzimas bacterianas, como epóxido hidrolases, dehalogenases e haloperoxidases. Aminoácidos conservados localizados em três distintos blocos.	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Haemophilus sp.</i> , <i>Moraxella sp.</i>
VI		Classificadas como pequenas proteínas (23-26 kDa), possuem similaridade de 40 % com lisofosfolipases	<i>P. aeruginosa</i> PAO1

	eucarióticas. Apresentam-se como dímeros.	
VII	Esta família inclui acetilcolina esterases e carboxilesterases similares com as do intestino/fígado de eucariotos, possuem MM de 55 kDa.	<i>Arthrobacter oxydans</i>
VIII	Difere significativamente da estrutura típica das hidrolases, mostrando similaridade com β -lactamases. A Ser nucleofílica não faz parte da tríade catalítica, onde uma Tyr foi identificada como essencial para atividade.	<i>P. marginata</i> <i>Burkholderia gladioli</i>

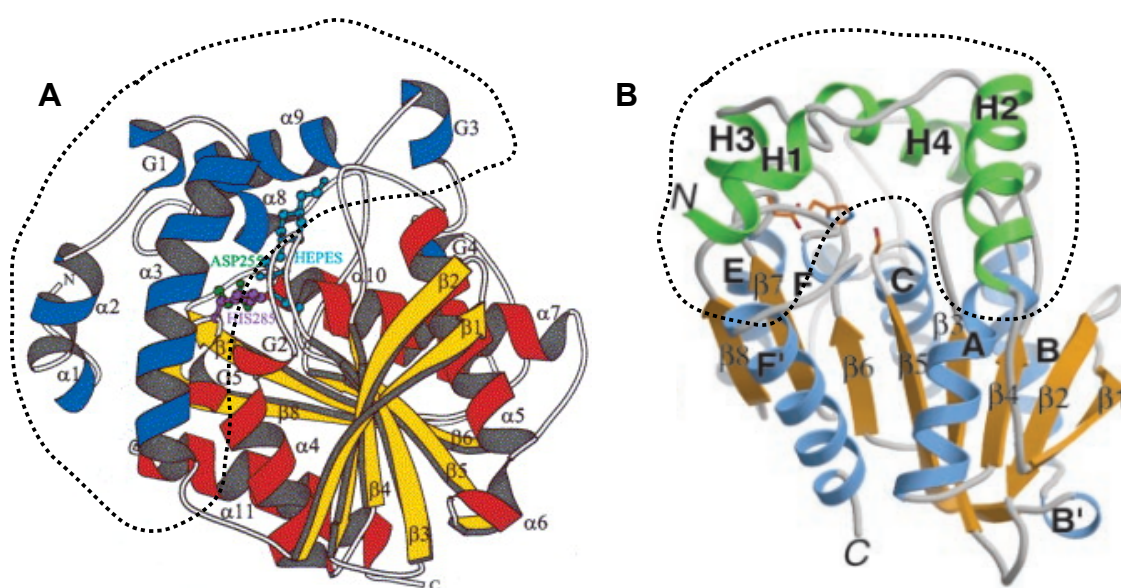


FIGURA 14 – Estruturas tridimensionais de membros da família IV.

Estruturas 3D resolvidas de membros da família VI permitiram identificar a presença do domínio CAP (destacado pelas linhas pontilhadas). **(A)** Carboxiesterase cristalizada de uma arqueia *Archaeoglobus fulgidus*, onde fitas- β estão em amarelo e α -hélices em vermelho, enquanto domínio CAP está em azul. **(B)** Uma acetil-esterase (HerE), com domínio CAP destacado em verde acima do dobramento $\alpha\beta$, onde as fitas- β estão coloridas em amarelo e α -hélices em azul. FONTE: De Simone et al. (2001); Zhu et al. (2003).

Com a abordagem da metagenômica funcional, novas famílias e subfamílias de lipases microbianas que não agrupam em nenhuma das famílias acima, foram descritas na literatura. Um resumo das características das novas famílias descobertas estão apresentadas na TABELA 4.

ABELA 4 – Descrição das novas Famílias das Lipases Bacterianas descobertas pela metagenômica funcional.

Família	Características	Referência
LipG	Isolada em sedimentos de planícies, se caracteriza por apresentar uma sequência de Arg—Gly na fenda oxaniônica, uma assinatura presente nas lipases de fungos filamentosos.	LEE et al., 2006
EstA	Descoberta na superfície da água salgada, se assemelha a membros da família III descrita por Arpingy e Jaeger (1999), mas difere na sequência de aminoácidos que compõe o pentapeptídeo conservado, nesta nova família descritos como Gly-His-Ser-Met-Gly.	CHU et al., 2008
LipEH166	Compreende novas lipases encontradas em habitat com baixas temperaturas (origem psicrófila) e com três possíveis ORFs, proveniente de sedimentos de planície entre marés.	(KIM et al., 2009
EstY	Isolada de rios, é derivada de bactérias patogênicas, sendo possivelmente consideradas fatores de virulência lipolíticos que não pertencem a família GDLS.	WU; SUN, 2009
EstF	Isolada de sedimentos aquáticos, está relacionada a família V das lipases com uma modificação no pentapeptídeo Gly-Thr-Ser-X-Gly e em regiões que flanqueiam o motivo HG e seus motivos conservados de sequência.	FU et al., 2011

1.6.3 Aplicações Industriais das enzimas lipolíticas

As enzimas são catalisadores favoráveis para desenvolvimento de processos industriais biodegradáveis. Sendo as enzimas de origem microbiana as industrialmente mais relevantes, além de tornarem o processo baseado em enzimas, de baixo custo no tratamento de resíduos (UCHIYAMA; MIYAZAKI, 2009). O uso sistemático industrial das enzimas microbianas, remonta bem mais de 100 anos. A primeira aplicação em processos comerciais de enzimas isoladas em foi a introdução da protease pancreática no tratamento de couro em 1908, e três anos depois, em 1911, Wallterstein, utilizou-as no resfriamento da cerveja (HANSAN et al., 2006).

Dentre as enzimas listadas na TABELA 1, apenas 200 enzimas conhecidas

tem uso comercial, sendo a maioria de origem microbiana, onde 75% desse total são de enzimas hidrolíticas, incluindo as lipases e esterases. Esse papel de destaque, deve-se ao fato das hidrolases degradarem várias substâncias naturais, atuando como biocatalisadoras (SHARMA et al., 2001). Segundo Li e colaboradores (2012), estima-se que mercado global para enzimas industriais alcance em 2015 o valor de 1,5 bilhões de dólares.

As enzimas lipolíticas são atualmente usadas numa grande variedade de aplicações industriais devido sua excelente enantioselectividade, não dependência de co-fatores, estabilidade em solventes orgânicos, disponibilidade comercial e atuação sobre uma ampla gama de substratos específicos para diferentes estruturas de ésteres naturais ou não-naturais (JAEGER; REETZ, 1998). As aplicações biotecnológicas das enzimas lipolíticas vão desde a indústria de alimentos, produção de perfume, desenvolvimento de fármacos até a produção de biodiesel (DAHIAYA; PURKAYASTHA, 2011). Algumas das aplicações das enzimas lipolíticas estão listadas na TABELA 5.

Enzimas microbianas são mais úteis que enzimas derivadas a partir de plantas ou animais devido a sua melhor estabilidade, rendimentos elevados, facilidade de manipulação genética, fornecimento regular e crescimento rápido em meios não tão caros, além do que suas lipases podem catalisar uma ampla variedade de reações de hidrólise e síntese (HANSAN et al., 2006). Micro-organismos produtores de lipase tem sido encontrados em uma variedade de habitats, incluindo lixos industriais, unidades de processamento de óleo vegetal, solo contaminado com óleo, laticínios, oleaginosas, alimentos em decomposição, pilhas de compostagem, minas de carvão e termais (DAHIAYA; PURKAYASTHA, 2011).

TABELA 5 – Exemplos de aplicações industriais das enzimas lipolíticas (ISO et al., 2001; SHARMA et al., 2001; HANSAN et al., 2006).

INDÚSTRIA	APLICAÇÃO
Têxtil	Ajuda na remoção de goma, promovendo melhor absorvência de manchas e rachaduras, fabricar poliéster com fibras sintéticas para uso na produção de fios, tecidos, têxtil, tapetes e outros.
Papel e celulose	Usado em larga escala no processo de produção do papel. Destintagem do papel usado, aumentando sua brancura e intensidade, assim como maior vida útil do equipamento, economia de energética e redução da poluição. Remoção dos componentes hidrofóbicos da madeira, ou seja, triglicerídeos e ceras, que causam problemas severos na fabricação de celulose e papel.
Detergente	Mais importante comercialmente. Transforma gorduras em substâncias hidrolíticas. Atua removendo manchas de gordura em tecidos, decompondo contaminantes lipídicos em lavagem a seco, na limpeza de couro, lentes de contato, canos entupidos, desengorduramento.
Biopolímeros	Usada como biocatalisadores na produção de componentes biodegradáveis. Poliésteres aromáticos são exemplo de produto sintetizado
Alimentos	Modificação de óleos e gorduras. Modificação do sabor, refinamento do arroz, leite de soja. Aroma e fermentação do vinho de maçã. Produção de carne magra (bovina ou de peixe) -(biolipólise) e fermentação da salsicha.
Laticínios	Hidrólise da gordura do leite. Aprimoramento do sabor, maturação e fabricação de produtos dos queijos, e na lipólise da manteiga e creme de leite.
Cosméticos	Emoliente em cremes e óleos de banho. Ésteres de cera estão sendo manufaturados enzimaticamente.
Aplicações Médicas	Ação bactericida contra <i>M. tuberculosis</i> . Utilizado como auxiliar digestivo, no tratamento de distúrbios gastro-intestinais e alergias digestivas. No tratamento de tumores malignos e inflamações cutâneas.
Biodegradação de óleo	Presença de atividade lipídica microbiana em solo recém-contaminado com óleo diesel, e em águas residuais contaminadas com hidrocarbonos e polímeros orgânicos, mostram resposta positiva na limpeza usando enzimas hidrolíticas.
Saneamento	Degradação e reciclagem do lodo de esgoto e matéria orgânica pela solubilização e hidrólise de complexos de estruturas poliméricas orgânicas de carbono.
Biosensor	Utilizado para diagnóstico em amostras clínicas, determinação de ácidos graxos essenciais em indústrias de alimentos e bebidas, análise de poluentes, contaminação por pesticidas e na indústria farmacêutica
Biodiesel	Transesterificação de óleos naturais (soja, ricínio, láurico e coco) para produção de biodiesel. Processo vantajoso pois não ocorre a geração de óxidos de enxofre e de particulados.

As lipases microbianas são na maioria, extracelular na natureza, o que facilita sua extração, isolamento e purificação (CARVALHO et al., 2003). Hoje se conhece um grande número de micro-organismos produtores de lipase (BROOKS; ASAMUDO, 2011; RUIZ et al., 2005;). Entretanto esse número de micro-organismos conhecidos atinge apenas um percentual muito baixo da biodiversidade estimada de micro-organismos que potencialmente podem ser produtores de enzimas, sendo cerca de 0,2% a 0,6% para bactérias e 5% para fungos ainda não caracterizados. Esta grande abundância de micro-organismos existentes na natureza torna importante o rastreio e o isolamento de novas cepas produtoras de enzimas (HASAN et al., 2006).

1.6.4 Enzimas lipolíticas obtidas pela abordagem metagenômica

A construção de bibliotecas metagenômicas tem sido de fundamental importância para descoberta de novos bioativos a partir de fontes procarióticas, o que vem possibilitando o acesso a um grande número de enzimas ou mesmo de vias metabólicas completas (VOEGET et al., 2003). Desde a descrição da primeira enzima lipolítica descoberta, no ano 2000 (HENNE et al., 2000), presente em clones de biblioteca metagenômica, houve um crescimento nas publicações reportando clones positivos de esterases ou lipases. Desse total, apenas poucas enzimas foram superexpressas, purificadas e sujeitadas a uma detalhada caracterização bioquímica. Isso deve-se ao elevado número de novas enzimas facilmente detectadas por rastreio funcional simples, em oposição ao tempo gasto para uma completa caracterização enzimática (STEELE et al., 2009). Esses novos genes são provenientes das mais diversas amostras ambientais, como solo (HENNE et al., 2000; KIM et al., 2006; LEE et al., 2004), água (CHU et al., 2008; WU; SU, 2009), biofilmes (GOMEZ-ALVAREZ et al., 2012; MCLEAN; KAKIRDE, 2013) rúmen e intestino de bois (FERRER et al., 2005; LIU et al., 2009), adubo orgânico (KIM et al., 2010; LÄMMLE et al., 2007), entre outras.

As abordagens para obtenção e isolamento desses novos genes lipolíticos diferem entre si, Henne e colaboradores (2000) isolaram genes com atividade lipolítica, provenientes de amostras de solo temperado, onde dos 730.000 clones analisados em ágar trioleína, apenas um teve atividade, enquanto 3 dos 286.000

testados em ágar tributirina, hidrolisaram o meio. Como alternativa de abordagem, Bell e colaboradores (2002) utilizaram a metodologia de PCR para isolamento direto de novos genes lipolíticos a partir do metagenoma a fim de evitar possíveis dificuldades em conseguir a expressão de uma lipase num hospedeiro heterólogo. Na última década, um maior número de bibliotecas metagenômicas tem sido construídas a partir de habitats extremos, onde a maioria dessas bibliotecas tem culminado em lipases/esterases (BELL et al., 2002).

Uma biblioteca metagenômica de amostras de fontes termais vulcânicas na Indonésia possibilitou o isolamento por função de uma nova esterase classificada como novo membro da família HSL (família VI), possivelmente pertencente à uma arqueia. Tendo sua melhor atividade em ésteres de cadeia curta (C6) (RHEE et al., 2005). Numa comparação entre biofilme de água potável e solo contaminado, foram detectados por sequenciamento, 21 genes parciais de lipase, porém no rastreamento funcional, apenas 6 clones eram ativos, sendo o EstA3 (do biofilme) e EstC1 (solo) caracterizados como esterases da família VIII por apresentarem similaridade de estrutura com β -lactamases. Essa diferença entre os dois métodos pode acontecer devido à limitações na expressão heteróloga (ELEND et al., 2006). Em 2009, pesquisando amostras de solo, Kim e colaboradores isolaram uma esterase de 38.3 kDa, com atividade ótima em cadeias com menos de 8 carbonos. Uma lipase ativa em baixas temperaturas e hidrolisando agrupamentos acila de cadeia longa (C₁₄) foi isolada a partir de sedimento marinho (HARDMAN; SJÖLING, 2007). Duas lipases, denominadas, *RlipE1* (nova família) e *RlipE2* (família V) foram encontradas em bibliotecas da microbiota do rúmen bovino, ambas lipases são instáveis termicamente e hidrolisam triacilgliceróis de cadeia longa (C₁₂-C₁₆-C₁₈) (LIU et al., 2009). Em metagenoma de solo, foram descobertas duas lipases por rastreamento funcional, SMLipB e SMLipD, como membros da família I e com sítios ativos de ligação para íon Ca²⁺ (KHAN et al., 2013).

A partir de amostras de solo no Brasil, algumas enzimas lipolíticas também foram identificadas. Uma esterase, LipA, foi isolada de mangue, com massa molecular 32 kDa (COUTO et al., 2010). Lip018, encontrada em solo da Floresta Atlântica, foi sequenciado e 20 ORFs foram encontradas, sendo apenas a ORF16 ativa contra uma ampla gama de substratos. Essa enzima foi descrita como sendo

de uma nova família, pois possuía o pentapeptídeo conservado da família V, mas precisava de uma chaperona (ORF15) para ser ativa (FAORO et al., 2011). A lipase, LipC12, pertence a família I.1 das lipases bacterianas, tem dobramento independente de chaperona, coordena íon Ca^{+2} e não tem pontes dissulfeto, tendo sua atividade ótima em pHs alcalinos (GLOGAUER et al., 2011).

A biblioteca metagenômica construída de sedimento aquático, possibilitou isolar um enzima β -cetoacil-CoA enol-lactona hidrolase, com um gene de 804 pb, codificando 267 aa, e massa molecular de 28.952 kDa. Sua atividade foi melhor em baixas temperaturas e pH alcalino, hidrolisando ésteres de p-nitrofenol cadeia curta, perdendo a atividade com o aumento do tamanho do grupo acila (PARK et al., 2007b). Fica evidente que as lipases provindas de bibliotecas metagenômicas tem um amplo espectro de atividade e estabilidade, sendo portanto uma estratégia eficaz na busca de novas lipases com características bioquímicas diferentes.

1.7 Área de Estudo do Projeto

O material explorado para análises dos clones lipolíticos foi a Biblioteca Metagenômica construída a partir de Terra Preta de Índio, proveniente do município de Presidente Figueiredo, localizado a 107 km da cidade de Manaus, no Estado do Amazonas (FIGURA 15).

A área de coleta está sob uma vegetação predominante de Florestas Tropicais e um clima tropical úmido, com variações de temperatura entre 20 °C a 40 °C. O solo é formado superficialmente por camadas arenosas que permitem uma boa aeração, e mais profundamente por camadas argilosas, que são caracterizadas por armazenarem água. Os solos de Terra Preta de Índio são classificados como Latossolo Amarelo e possui grande atividade biológica devido à ação antrópica neste território, proporcionada pela agricultura local praticada pelos povos ribeirinhos.



FIGURA 15 – Dados da coleta do Solo de Terra Preta de Índio.
(A) Mapa geográfico mostrando a localização do município de Presidente Figueiredo/AM.
(B) Preparação do terreno para coleta das amostras de solo.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi identificar e caracterizar molecularmente genes codificadores de enzima lipolítica (lipase ou esterase) e determinar a estrutura da enzima prospectada da Biblioteca Metagenômica de Solo de Terra Preta de Índio do Amazonas previamente construída em vetor fosmidial que se encontra hospedado na bactéria *Escherichia coli* EPI300.

Este trabalho teve como metas específicas para realização dos objetivos:

- Selecionar clones com atividade lipolítica provenientes de uma biblioteca metagenômica de solo, identificar a sequência gênica da proteína ativa;
- Identificar a filogenia e regiões conservadas da enzima lipolítica em estudo comparando-a com as famílias de lipases/esterases bacterianas descritas na literatura;
- Obtenção da proteína alvo em sistemas heterólogos, por clonagem do gene de interesse em vetor de expressão convencional, expressão da proteína em larga escala e purificação para futuros ensaios enzimáticos;
- Definir os parâmetros cinéticos da proteína alvo usando diferentes substratos e ensaios de formação de halo em meio de cultivo ágar;
- Realizar mutação sítio dirigida no sítio catalítica da enzima alvo e observar mudanças de atividade enzimática destes mutantes em comparação com a proteína tipo selvagem.
- Determinar a estrutura tridimensional por cristalografia da proteína alvo afim de compreender as bases moleculares envolvidas no mecanismo de catálise da enzima, por meio da coleta e processamento dos dados cristalográficos usando uma proteína modelo para determinação das fases.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e vetores utilizados

A biblioteca metagenômica TPI foi construída pela Prof^a. Dr^a. Luciana Leomil (LEOMIL, 2007) e está hospedada numa cepa de *E. coli* EPI300 inserida num vetor fosmidial pCC1FOS (ANEXO 1). O vetor pUC18 (ANEXO 2) e a estirpe hospedeira de *E. coli* DH5 α foram utilizadas na construção de sub-bibliotecas para sequenciamento da região de interesse. Na etapa de clonagem e expressão do gene codificador da enzima Lip4, foi utilizado o vetor pET28a (ANEXO 3) e a cepa hospedeira de *E. coli* BL21 (DE3). As cepas BL21 (DE3) RP, BL21 (DE3) RIL e BL21 (DE3) STAR foram utilizadas nos testes de indução e superexpressão da enzima de interesse. Por fim os testes de mutação sítio dirigida foram conduzidos na *E. coli* XL1-Blue. As descrições das estirpes de *E. coli* e dos vetores utilizados neste trabalho são apresentadas nas TABELAS 6 e 7.

TABELA 6 – Linhagens de *E. coli* utilizadas neste trabalho e suas respectivas características genotípicas.

Linhagens	Genótipo	Referência/Empresa
EPI300	[F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) (StrR) ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ -rpsL nupG trfA tonA dhfr	Epicentre
DH5 α	F ⁻ /endA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) glnV44 thi ⁻¹ recA ¹ gyrA (Nal _r) relA1 Δ lacIZYA-argF) U169 deoR (ϕ 80dlac Δ lacZ) M15	Sambrook e Russell (2001)
BL21 (DE3)	B F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal λ (DE3)	Weiner et al. (1994)
BL21 (DE3) RP	B F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet _r gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam _r]	Stratagene*
BL21 (DE3) RIL	B F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) cm ⁺ Tet ^r gal λ endA Hte [argU ileY leuW Cam _{rj}]	Stratagene*
BL21 (DE3) Star	F ⁻ ompT hsdSB (r _B -m _B -) gal dcm me131 (DE3)	Novagen*
ArticExpress (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet _r gal λ (DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent _r]	Agilent Technologies*
XL1Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ['] proAB lacIq Δ ZM15 Tn10 (Tet _r)]	Stratagene*

*Cedida pelo prof. Dr. Shaker Chuck Farah do Instituto de Química/USP/SP.

TABELA 7 – Vetores empregados neste trabalho com suas características genotípicas.

Plasmídeos	Características	Referência
pCC1Fos	lacZ, Sítio Cos, OriV, Ori2, Cm ^R	Epicentre
pUC18	lacZ, Amp ^R	Invitrogen
pET28a(+)	Promotor T7, Terminador T7, cauda His, Kan ^R	Novagen

3.2 Iniciadores de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores empregados nas reações de PCR neste trabalho encontram-se descritos na TABELA 8.

TABELA 8 – Iniciadores de PCR utilizados para ampliações de fragmentos do DNA

Nome	Sequência de Oligonucleotídeos 5' → 3'	Anelamento (°C)	Finalidade
<i>M13_{FW}</i> <i>M13_{RV}</i>	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	57	Sequenciamento do inserto clonado em pUC18.
<i>Lip4GW_{FW}</i> <i>Lip4GW_{RV}</i>	5' AGTATATCCACAGGAACACGG 3' 5' TACCTGGTCGCAGTTGCTG 3'	57	Obtenção da sequência do gene de interesse clonado no vetor pUC18.
<i>Lip4_Ciça_{FW}</i> <i>Lip4_Ciça_{RV}</i>	5' TTTTTCATATGCTATATGCTCAG GTCAACGGC 3' 5' TTTTGGATCCCTACACGCTTT GCCGT 3'	51/58	Inserção do gene de interesse no vetor pET28a(+).
<i>T7_{FW}</i> <i>T7_{RV}</i>	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG3'	56	Sequenciamento do inserto clonado em pET28a(+).
<i>Lip4_S94A_{FW}</i> <i>Lip4_S94A_{RV}</i>	5' CCACGTCTTTGGCGTAGCA ATGGGTGGGATGATCGCTCA 3' 5' TGAGCGATCATCCCACCCAT TGCTACGCCAAAGACGTGG 3'	55	Mutação de um aminoácido no sítio ativo da enzima recombinante, trocando resíduo de Ser por Ala.

<i>Lip4_S94C</i> _{FW}	5'CCACGTCTTTGGCGTATG CATGGGTGGGATGATCGCTCA 3'	55	Mutação de um aminoácido no sítio ativo da enzima recombinante, trocando resíduo de Ser por Cys.
<i>Lip4_S94C</i> _{Rv}	5'TGAGCGATCATCCCACCCATG CATACGCCAAAGACGTGG 3'		

Fw – iniciadores “forward” / Rv – Iniciadores Reverso

3.3 Meios de cultivo bacteriano

CULTIVO DAS CEPAS *E. COLI*. Para crescimento das cepas de *E. coli* foi utilizado meio Luria Bertani (LB) (triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹ preparado segundo Sambrook e Russell (2001). O meio LB ágar (LA) foi obtido pela adição de 15 g L⁻¹ de ágar ao meio LB.

MEIO PARA FORMAÇÃO DE HALOS DE HIDRÓLISE. A seleção dos clones com atividade lipolítica para visualizar a formação de halo ao redor da colônia, foi realizada por meio da semeadura dos transformantes em placas de ágar contendo meio de cultivo PEX (5 g L⁻¹ de peptona, 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 15 g L⁻¹ de ágar bacteriológico) (LAWRENCE et al., 1967), suplementado com Tributirina (C₄) como substrato.

INCORPORAÇÃO SELÊNIO-METIONINA. Para testes de incorporação de selênio-metionina no gene inserido no plasmídeo de expressão clonado em *E. coli*, foi utilizado meio mínimo (6 g L⁻¹ de Na₂HPO₄ pH 7,35, 3 g L⁻¹ de KH₂HPO₄, 0,5 g L⁻¹ NaCl, 2 mM MgSO₄, 0,4% p/v glicose, 100 µM CaCl₂, 1 g L⁻¹ NH₄Cl)

Os meios de cultivos foram preparados e esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos antes do uso. Quando necessário, os antibióticos de seleção foram acrescidos nas concentrações adequadas para cada caso, após resfriamento.

3.4 Análise dos clones selecionados

3.4.1 Triagem de Clones com Atividade Lipolítica

O primeiro passo para iniciar a seleção de clones na biblioteca, foi diluir a amostra inicial armazenada no refrigerador -80 °C em uma diluição de 1:10³, ou seja, 1 µL da amostra concentrada da biblioteca metagenômica de TPI em 1000 µL de meio Luria-Bertani (LB) líquido. Após esta etapa, foram realizadas diluições seriadas

de 10^{-3} a 10^{-9} a partir da diluição inicial, com um volume final de 100 μ L para cada diluição.

A triagem para seleção de clones formadores de halos de lipólise foi feita monitorando-se o cultivo de 200 μ L de células diluída na concentração 10^{-5} em placas de Petri contendo meio ágar PEX acrescido do lipídio Tributirina 1% e 2% de ágar. As placas foram incubadas a 37 °C. Após os tempos de 48, 72 e 96 horas as colônias foram posicionadas contra a luz branca de um transiluminador para a observação de halos ao redor das colônias. Foram encontrados halos ao redor de 13 clones dentre, aproximadamente, 80.000 colônias analisadas (BIANCO, 2011). Para este trabalho foram selecionados 4 clones, dos 13 clones encontrados.

3.4.2 Determinação da concentração de Tributirina para visualização dos halos

Para determinar a concentração que permitiria uma melhor visualização da formação dos halos ao redor dos clones produtores de lipases, os clones recombinantes foram semeados em meio PEX sólido suplementado com tributirina em diferentes concentrações do substrato, 0,1%, 0,5%, 1% e 2%. As culturas foram incubadas em estufa, a 37 °C, durante 96 horas, e observadas a cada 24 horas, para observação dos resultados.

3.4.3 Extração e Purificação dos Vetores

A extração e a purificação dos vetores fosmidiais e plasmidiais foi realizada de acordo com o *kit* “Nucleo Spin Plasmid” (Prodinol), conforme as recomendações do fabricante para extração de plasmídeos com baixo e alto número de cópias.

Um pré-inóculo bacteriano foi preparado em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB líquido, suplementado com antibiótico adequado, e cultivado por 18 horas, 37 °C, sob agitação de 180 rpm, em agitador “Innova 4300” (New Brunswick Scientific). No cultivo de *E. coli* com os vetores fosmidiais, foram realizados dois pré-inóculos, o primeiro, cultivado sem adição do indutor, e ao segundo foi acrescentado na preparação, 50 mL do indutor L-arabinose 0,1%, um indutor de crescimento, para aumentar o número de cópias de fosmídeo/célula, sendo adicionado mais 50 mL de L-arabinose 0,1% após 12 horas de crescimento bacteriano, conforme descrito por Khlebnikov (2000). Ao final da purificação, as amostras foram armazenadas a -20 °C

até o momento do uso.

3.4.4 Análise eletroforética de DNA em gel de agarose e purificação de fragmentos

A análise dos tamanhos dos fragmentos de DNA e a separação dos fragmentos de interesse foram realizadas empregando-se eletroforese em gel de agarose 0,8% (0,8 g de agarose em 100 mL de tampão TBE 0,5 X) contendo 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de brometo de etídio, em tampão de corrida TBE 0,5 X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 20 mM pH 8,0).

A quantificação do DNA presente nas amostras foi realizada por comparação por intensidade da fluorescência da banda de DNA da amostra com aquela exibida por λ DNA de concentração conhecida (100 ng) e marcador molecular 1 kb “Plus DNA Ladder” (Invitrogen).

Para isolar um fragmento de DNA a partir do gel de agarose, após a eletroforese, cortou-se diretamente desse gel a banda referente ao fragmento alvo sob visualização de luz ultravioleta (UV) e os DNAs contidos nos blocos de gel foram purificados utilizando o *kit* “NucleoSpin Gel and PCR Clean-up” (Macherey-Nagel), seguindo recomendações do fabricante.

Posteriormente, a confirmação da presença do DNA extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão de corrida TBE 0,5 X e visualização das bandas em transiluminador com luz ultravioleta a 365 nm e fotodocumentado num fotodocumentador “GelDoc-it” (UVP), em seguida as amostras foram armazenadas a -20 °C até utilização.

3.4.5 Preparação de células eletrocompetentes

Células eletrocompetentes de *E.coli* EPI300, DH5 α e BL21 (DE3) foram preparadas conforme Sambrook e Russell (2001). As células de *E.coli* foram cultivadas por 16 horas, a 37 °C e 180 rpm em 5 mL de LB. Em seguida a cultura foi vertida em 500 mL de meio LB e cultivada a 37 °C sob agitação (180 rpm) até uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5. As células foram coletadas por centrifugação 11000 g por 15 minutos e lavadas duas vezes com água gelada Milli-Q contendo 10% (v/v) de glicerol. Em seguida as células foram concentradas em 1 mL de glicerol a 10% (v/v), aliquotadas em 55 μL e estocadas a -70 °C.

As demais células utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo laboratório do Prof. Dr. Shaker Chuck Farah.

3.4.6 Transformação de bactérias por eletroporação

A eletroporação das linhagens de *E.coli* foi realizada utilizando cubetas de 1 mm no equipamento “Gene Pulser” (Bio-Rad) com os seguintes ajustes: voltagem de 2500 V, 2000 ohms de resistência e 25 μ F de capacitância. Foram utilizados 100 ng de vetor ou 2 μ L de cada mistura de ligação para cada 55 μ L de células competentes. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio LB líquido, incubadas por uma hora, 180 rpm a 37 °C. Em seguida as células foram semeadas em meios seletivos, que permitissem a identificação dos clones transformantes.

Cubetas contendo apenas 55 μ L de células eletrocompetentes sem adição de DNA plasmidial ou misturas de ligação foram submetidas ao mesmo procedimento para a obtenção dos controles negativos do experimento.

3.4.7 Confirmação dos clones fosmidiais recombinantes que excretam lipase

A fim de avaliar a capacidade de produção de lipase e eliminar possíveis clones falsos positivos, os fosmídeos recombinantes Fos1, Fos2, Fos3 e Fos4 foram retransformados geneticamente por eletroporação em células competentes de *E. coli* EPI300. Os clones transformantes obtidos foram semeados individualmente com auxílio de hastes de madeira em placas de Petri contendo meio de cultivo PEX sólido com tributirina 0,5%. A formação de halos ao redor da colônia foi acompanhada por 72 horas de incubação em estufa a 37 °C.

3.4.8 Análise dos perfis de restrição dos fosmídeos recombinantes

Os DNAs dos fosmídeos dos clones lipolíticos foram analisados pelo seu perfil de restrição com a enzima *NotI* (Fermentas), que possui dois sítios de corte (posições 2 e 643) dentro do vetor muito próximos da região de inserção do DNA metagenômico, gerando um fragmento único de aproximadamente 8,1 kb, o fosmídeo linearizado. A reação foi realizada em tubos de 0,2 mL, no qual foi adicionado 200 ng de DNA fosmidial (5 μ L), 1 μ L de Tampão O 10 X, 1 μ L da enzima *NotI* (10 U/ μ L), completando o volume final com H₂O Milli-Q para 10 μ L. O material

foi incubado a 37 °C por 2 horas. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e conduzida em tampão TBE 0,5 X por uma hora. Foi usado o marcador 1 kb “Plus DNA Ladder” (Invitrogen) para estimar o tamanho molecular dos insertos.

3.5 Construção de sub-biblioteca de DNA fosmidial em pUC18

3.5.1 Cinética da Digestão dos DNAs fosmidiais

Os DNAs fosmidiais foram submetidos a uma cinética de digestão em função o tempo. Foram selecionadas as enzimas *HindIII* e *XbaI* para realização da cinética. A reação foi preparada em tubos de ensaio 0,2 mL, no qual foi adicionado 200 ng de DNA fosmidial (5 µL), 1 µL da enzima específica (10 U/µL), 1 µL de Tampão R 10X para enzima *HindIII*, e 1 µL do tampão Tango 10X para enzima *XbaI*, completando o volume final com H₂O Milli-Q para 10 µL. As digestões foram interrompidas com 5, 15, 30 45, 60 e 120 minutos de incubação a 37 °C.

O perfil de bandas dos clones foi analisada em gel de agarose submetido à eletroforese e o fragmento foi quantificado por meio de comparação com marcador de DNA 1000 pb e λDNA (100 ng). Os clones Fos1 e Fos4, apresentaram o melhor perfil na digestão com as enzimas *HindIII* e *XbaI*, respectivamente. Dessa forma nos passos subsequentes, apenas esses dois clones foram utilizados para a construção de sub-bibliotecas de plasmídeos.

3.5.2 Clonagem dos insertos no vetor pUC18

Uma vez definida a melhor cinética de restrição, uma nova digestão foi repetida pelo melhor período de tempo testado com a enzima apropriada para cada clone (*HindIII* ou *XbaI*). Os fragmentos de DNA obtidos pela digestão enzimática foram empregados em uma mistura de ligação com o plasmídeo pUC18 previamente linearizado com *HindIII* ou *XbaI*.

As misturas de ligação foram montadas na proporção 3:1 (inserto:vetor), empregando um volume final de 25 µL. A reação referente a Fos4 foi constituída de 14 µL de produto de digestão a 30 ng µL⁻¹, 0,5 µL da enzima T4 DNA ligase (1 U/µL), 4,5 µL do tampão de ligação (5 X) e 6 µL da solução contendo o vetor pUC18 a 17 ng µL⁻¹. Um protocolo parecido foi utilizado para reação de ligação do Fos1,

modificado apenas pela quantidade de produto de digestão, 9 μL a 30 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ e 2 μL do vetor a 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Utilizou-se água Milli-Q para completar o volume total. As reações foram mantidas por uma hora a 25 °C, e em seguida, empregados na transformação genética por eletroporação de célula competente de *E. coli* DH5 α , utilizando-se o equipamento "Gene Pulser" (Bio Rad). Para cada 55 μL de células competentes, foram usados 2 μL da reação de ligação. Após eletroporação, a mistura células-DNA foi inoculada em 1 mL de meio LB líquido, e incubada por 1 hora, 37 °C, sob agitação de 180 rpm.

Toda cultura foi semeada em meio LB sólido seletivo suplementado com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, 0,2 mg mL^{-1} de X-Gal e 0,1 mg mL^{-1} de IPTG, e incubadas a 37 °C por 12 horas. As colônias brancas transformantes (pUC18 com inserto) foram identificadas e os subclones foram armazenados organizadamente em placas de petri com meio LB sólido para etapa de análise da capacidade lipolítica em meio de cultivo

3.5.3 Confirmação da atividade hidrolítica

Uma pequena quantidade de cada subclone armazenado, foi transferida com auxílio de uma haste de madeira para placas de Petri contendo meio sólido PEX, com antibiótico de seleção e o 0,5% do lipídio tributirina, o crescimento das colônias foi observado por 72 horas a 37 °C, até aparecimento de halos transparentes ao redor da colônia. Apenas um subclone proveniente do fosmídeo Fos4 apresentou atividade lipolítica. Este foi então crescido em meio LB líquido com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina a 37 °C, por 18 horas e 180 rpm para extração do plasmídeo recombinante.

O DNA plasmidial obtido foi isolado e submetido à análise de restrição, utilizando a mesma enzima da construção da sub-biblioteca, *Xba*I, a fim de confirmar o tamanho do fragmento clonado. A análise do perfil de migração do fragmento foi realizada em gel de agarose 0,8%. A construção do vetor com o inserto passou a ser chamado de **pLip4**.

3.5.4 Amplificação por PCR, sequenciamento e análise filogenética dos subclones.

3.5.4.1 Seqüenciamento com oligonucleotídeos universais M13_{Fw} e M13_{Rv}

Após extração e purificação do DNA plasmidial, o vetor **pLip4** (pUC18//lip4) foi submetido a uma reação de amplificação gênica, com objetivo de conhecer a sequência da enzima lipolítica codificada. Para isso, foram usados os oligonucleotídeos M13 reverso e universal (TABELA 8), que flaqueiam o inserto. O protocolo montado da PCR continha: 5 μL do tampão da enzima (10x), 1,25 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (1 U/ μL) (Fermentas), 5 μL da mistura de dNTP (2,5 mM cada), 1 μL de cada iniciador M13_{FW} e M13_{RV}, 5 μL do DNA a 25 ng μL^{-1} e água Milli-Q para completar volume de 50 μL . As condições de amplificação foram ajustadas para as seguintes temperaturas e tempos: 94 °C por 2 min (1 ciclo); 94 °C por 1 min, temperatura de anelamento por 30 seg., 72 °C por 2 min. (25 ciclos); 72 °C por 10 min (1 ciclo). A temperatura de anelamento dos iniciadores está descrita na TABELA 8.

O produto da PCR foi purificado pelo auxílio da enzima ExoSAP IT, onde adicionou-se 5 μL da enzima para cada 2 μL de amostra amplificada. A solução foi incubada primeiramente, à 37 °C por 15 minutos e depois a 80 °C por igual período. Para checar a presença do clone positivo purificado, a amostra foi analisada em gel de agarose 0,8%.

O pLip4 foi empregado numa reação de sequenciamento parcial a partir de ambas as extremidades com os mesmos iniciadores M13. Foram utilizados 155 ng μL^{-1} de DNA plasmidial e 5 pmol μL^{-1} de cada iniciador. Todas as reações de seqüenciamento foram realizadas no sequenciador automático “ABI 3730 234 DNA Analyser” (Applied Biosystems), no Centro de Estudos do Genoma do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

3.5.4.2 *Genoma Walking*

Como o fragmento obtido pelo vetor construído pLip4 é de aproximadamente 2000 pb, uma técnica conhecida como genoma “walking” foi empregada. Essa metodologia permite o sequenciamento de grandes fragmentos de DNA inseridos em plasmídeos, permitindo a divisão da longa sequência em outras menores.

Os oligonucleotídeos Lip4GW1 e Lip4GW2 (TABELA 8) foram sintetizados a partir da extremidade “forward” do pLip4 previamente sequenciado, com auxílio do programa Gene Runner (<http://www.generunner.net>).

Reações de otimização da PCR para os novos iniciadores foram necessárias, variando concentração de *Taq* polimerase e $MgCl_2$, até encontrar a condição ideal para obtenção de um único fragmento. Foi utilizado um termociclador “PTC-200 MJ Research” (Bio-Rad) testando mesma ciclagem descrita acima, variando apenas as temperaturas de anelamento (54 °C, 57 °C e 61 °C), a fim de obter a melhor temperatura de pareamento para os iniciadores. Em todas as reações a concentração de DNA foi a mesma (5 ng μL^{-1}), a variação de $MgCl_2$ foi de 1,5; 2; 2,5 mM e a de *Taq* polimerase de 0,8 e 1,25 U.

3.5.4.3 Análise da sequência da lipase Lip4 e construção da árvore filogenética

As sequências e os cromatogramas provenientes do sequenciador automático foram previamente analisadas pelo programa ChromasPro 1.7.6. (Technelysium). Após análise, os fragmentos gênicos foram montados com o programa DNASTAR (Lasergene), e as ORFs (*open reading frames*) foram identificadas pelo programa *ORF Finder* (WHEELER et al., 2008) acessado por meio da plataforma do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A sequência de aminoácidos da proteína Lip4 foi comparada com as sequências de proteínas não-redundantes depositadas na base de dados do NCBI utilizando o algoritmo de busca BlastX (ALTSCHUL et al., 1997). Os parâmetros físico-químicos da proteína foram calculados com auxílio da ferramenta ProtParam (GASTEIGER et al., 2005).

Para a construção das árvores filogenéticas, as sequências de aminoácidos das proteínas pertencentes as famílias de lipases bacterianas utilizadas na comparação, estavam depositadas no banco de dados de proteínas do UniProt (www.uniprot.org). Os alinhamentos das sequências foram realizados pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e a análise filogenética foi realizada com o método *Neighbor-joining* usando a correção de Poisson e *bootstrap* de 1000 réplicas no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2007). O programa Jalview 2 (www.jalview.org) foi utilizado para exibir os alinhamentos das sequências.

A análise dos domínios protéicos pertencentes à superfamília das α/β hidrolases foi realizada pelo servidor ESTHER (LENFANT et al., 2013). Já a identificação dos resíduos que compõem a tríade catalítica e a fenda oxiânionica foi possível por meio de comparação com banco de dados LED (*Lipase Engineering*

Database) (PLEISS, 2000).

3.6 Clonagem, expressão e purificação do gene Lip4

3.6.1 Desenho e clonagem do gene em vetor de expressão pET28(a)

Foram desenhados um par de oligonucleotídeos com auxílio do programa Gene Runner (<http://www.generunner.net>), Lip4_Ciça_{FW} e Lip4_Ciça_{RV} (TABELA 8), a partir das extremidades na sequência da Lip4, com o objetivo de inserir o fragmento gênico dentro do vetor de expressão pET28a. Nas pontas dos iniciadores foram inseridas sequências reconhecidas pelas enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. A reação de PCR continha 45 ng μL^{-1} de DNA do gene *lip4*, 10 pmol μL^{-1} de cada iniciador, 250 μM μL^{-1} do tampão “High Fidelity PCR” com adição de MgCl_2 e 1,25 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas) num volume final de 200 μL . As reações de amplificação ocorreram nas seguintes etapas: o DNA foi primeiramente desnaturado por 2 min a 94 °C e então submetido a 5 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de hibridização a 51 °C e 90 segundos de extensão a 68 °C. Após essa etapa, a reação seguiu por mais 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 58 °C e 90 segundos de extensão a 68 °C, e uma extensão final extra de 10 minutos a 72 °C.

O produto de PCR amplificado e o vetor de expressão pET28a foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, presentes na sequência gênica. Todo produto do vetor digerido foi separado em gel de agarose, eluído purificado e ligado com o produto de PCR purificado. Ambas amostras foram concentradas num concentrador de amostras a vácuo por 30 minutos, até volume final de 5 μL para cada uma. A reação de ligação continha 4 μL de vetor, 4 μL de inserto, 1 μL da enzima T4 DNA Ligase (Fermentas) e 1 μL do tampão da enzima, num volume final de 10 μL , e ocorreu a 16 °C por 16 horas.

Na transformação genética, um microlitro da mistura de ligação foi utilizada para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α . O transformado foi semeado em meio LB ágar contendo 50 μg μL^{-1} de canamicina para seleção dos clones positivos. Para confirmação da presença do inserto nos clones, foi realizada uma PCR de colônia, onde as colônias selecionadas, tiveram o material genético extraído pela fervura a 98 °C por 5 minutos, seguido de centrifugação a 11000 g por

um minuto e 1 μL do sobrenadante usado na PCR. Foram utilizados os oligonucleotídeos T7_{FW} e T7_{RV}, que flanqueiam o vetor pET28a (TABELA 5), numa reação com 5 pmol μL^{-1} de cada iniciador e 10 μL de PCR Master Mix (Fermentas) num volume final de 20 μL , completados com água Milli-Q. A fim de verificar se não havia ocorrido mutação na sequência do fragmento gênico clonado, três clones positivos foram extraídos, purificados e submetidos ao sequenciamento no sequenciador automático “ABI 3730 234 DNA Analyser” (Applied Biosystems), no Centro de Estudos do Genoma do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

3.6.2 Teste de indução da expressão e avaliação da solubilidade

Inicialmente foram realizados testes de indução em pequena escala, com a finalidade de avaliar a quantidade e temperatura ideal de expressão da Lip4 em diferentes cepas de *E.coli*, BL21 (DE3), BL21 (DE3) RIL, BL21 (DE3) RP e BL21 (DE3) STAR, descritas na TABELA 6 (STUDIER; MOFFAT, 1986). As células transformadas geneticamente por choque térmico com CaCl_2 foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo o antibiótico de seleção para cada cepa. Quando a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atingiu entre 0,8 a 1,0, um mililitro da amostra não induzida foi retirada, e o restante das células foram induzidas com 1 mM de IPTG, por um período de 4 horas em duas temperaturas: 28 e 37 °C, sob agitação de 180 rpm. As cepas induzidas foram centrifugadas durante 5 minutos, 11000 g, a 4 °C. O sobrenadante aliqotado e o precipitado ressolubilizado em 1 mL de tampão de lise (25% Sacarose p/v; 1% Glicerol p/v; 0,03% Triton X-100 p/v; 50 mM de Tris-HCl pH8; 20 mM NaCl).

A fim de avaliar a solubilidade, a amostra em tampão de lise foi submetida a uma lise por sonicação utilizando pulsos de 15 segundos, com intervalos de 60 segundos a 40 mA por 10 minutos no sonicador “Vibracell VCX750 Ultrasonic Cell Disrupter” (SONICS). Então, a amostra foi centrifugada por 5 minutos, 11000 g, a 4 °C, o sobrenadante coletado foi considerado a fração solúvel (FS) e o sedimento ressuspendido em volume igual de água milli-Q, sendo considerado a fração insolúvel (FI).

Para a análise de proteínas, as amostras, induzida e não induzida, foram ressuspendidas em tampão de amostra (10% p/v glicerol; 20% SDS p/v; 50 mM Tris-

HCl pH 6,8; 0,1% de azul de bromofenol, 100 mM de β -mercaptoetanol), numa proporção de 1:2 e aquecidas a 95 °C por 5 minutos. As amostras foram submetidas a análise por eletroforese em em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) em géis preparados na proporção acrilamida/bisacrilamida de 29:1 e corados “Comassie Brilliant Blue R250” (Thermo Scientific). Para a visualização das bandas, o gel foi incubado em solução descorante, a temperatura ambiente, por 18 horas.

3.6.3 Teste de Expressão em cepa E. coli ArticExpress (DE3)

A utilização dessa cepa é para verificar se a presença da chaperona nas células de ArticExpress (DE3) auxilia no enovelamento da enzima Lip4.

O vetor de expressão com inserto do gene *lip4* foi transformado geneticamente em células de ArticExpress (DE3) por choque térmico, onde a amostra foi incubada por 30 minutos no gelo, seguida de um choque à 42 °C por 20 segundos, resfriada novamente em gelo por 2 minutos e então ressuspensa em 1 mL de meio LB. Após incubação por uma hora, a 37 °C e 180 rpm, o cultivo foi semeado em meio LA com antibióticos de seleção 20 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de gentamicina e 50 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de canamicina e incubado numa estufa a 37 °C por 18 horas.

Para o ensaio de expressão, três colônias de ArticExpress (DE3) e três de BL21 (DE3) RP foram crescidas a 37 °C até atingirem as $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0,3; 0,6; 0,8; 1,2. Placas contendo meio de cultivo PEX acrescido de 0,5% Tributirina e antibiótico seletivo para cada vetor, foram preparadas com e sem adição de indutor IPTG. Dez microlitros de cada cultivo, nas diferentes densidades ópticas, foram aplicados nas placas e o crescimento e formação dos halos de hidrólise avaliados por 72 horas. O tempo e raio do halo formados permitiram avaliar a expressão dos clones.

3.6.4 Superexpressão e purificação da proteína recombinante

Após seleção da melhor cepa e condição para expressão da Lip4, esta passou a ser utilizada nas expressões em larga escala, utilizando as mesmas condições do teste de indução, porém em grandes quantidades, com maior volume de cultura inicial, dois litros.

O cultivo induzido foi incubado por quatro horas a 37 °C e as células coletadas por centrifugação a 10.000 g por 15 min a 4 °C. Em seguida, o precipitado

foi ressolubilizado em 50 mL de tampão de lise (item 3.6.2), e as células foram lisadas por sonicação (10 minutos de pulsos de 15 seg, a 60 W, com intervalos de 60 segundos). A amostra foi centrifugada novamente (13.000 g, 45 min a 4 °C) para recuperar sobrenadante e sedimentar restos celulares.

A presença da cauda de poli-histidina N-terminal (His-Tag) na Lip4, possibilitou a realização da purificação em uma única etapa utilizando cromatografia de afinidade em coluna de níquel no “Äkta Pure” (GE Healthcare). Primeiramente, a coluna foi pré-equilibrada com 10 CVs da Solução A (50 mM Tris-HCl pH 8; 200 mM NaCl; 20 mM Imidazol), em seguida, a amostra foi aplicada no sistema e eluída por um gradiente linear de imidazol (0,5 mL/min), proporcionado pela aplicação da solução B (Solução A + 1 M de Imidazol). O gradiente foi coletado em frações de 3 mL por tubo.

As frações puras da Lip4 foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 12% para visualização e confirmação do nível de pureza da proteína. Em seguida, as frações que continham maior quantidade de proteína pura, foram misturadas numa única fração e dialisadas usando sacos de diálise de 10 kDa para efetuar a troca do tampão e diminuir a quantidade de sal na amostra. Foram realizadas 4 trocas de tampão de diálise (10 mM de Tris-HCl pH 7,5; 10 mM NaCl₂; 1 mM MgCl₂) a -4 °C. A proteína purificada foi quantificada utilizando o método de espectrofotometria, relacionando a concentração de proteína com a absorbância atingida em 280 nm descontando o valor de dispersão em 330 nm, e seu respectivo coeficiente de extinção, obtido por análise da sequência no programa ProtParam (GASTEIGER et al., 2005).

Ao final da purificação, a proteína Lip4 pura foi utilizada nos testes de cristalização em placa, vide descrição a seguir, o restante da amostra, foi armazenada a -20 °C com adição de 25% de glicerol para evitar precipitação da proteína após descongelamento.

3.6.5 Incorporação de selênio-metionina (Sel-Met) na proteína recombinante

Cepas de *E. coli* BL21 (DE3) RP transformadas geneticamente com o plasmídeo de expressão pET28a contendo o gene *lip4* foram incubadas em 5 mL de meio LB acrescido de 50 µg µL⁻¹ de canamicina e 30 µg µL⁻¹ de cloranfenicol a 37 °C,

180 rpm, por 18 horas. O pré-inoculo foi centrifugado 11.000 g por 5 minutos, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de meio mínimo. Estas células foram transferidas para 500 mL de meio mínimo com os antibióticos de seleção e deixadas a 37 °C, 180 rpm até atingirem a DO_{600nm} de 0,8. Nesse momento foram adicionados os seguintes aminoácidos: selênio-metionina (60 mg L^{-1}), valina e isoleucina (50 mg L^{-1}), lisina, treonina e fenilalanina (100 mg L^{-1}). Após 15 minutos de incubação, as células foram superexpressas pela adição de 1 mM do indutor IPTG e permaneceram por 6 horas a 37 °C, 180 rpm. As células foram então purificadas como descrito no item 3.6.4. Nesse experimento, espera-se a incorporação de 8 Sel-Met na sequência de aminoácidos da Lip4.

3.6.6 Cromatografia de gel filtração analítica

A curva padrão de eluição do ensaio de gel filtração analítica utilizou proteínas de peso molecular variando de 12 a 200 kDa (Sigma Aldrich): Beta Amilase (200 kDa), Álcool Desidrogenase (150 kDa), Albumina (66 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa) e Citocromo C (12,4 kDa), com volume de exclusão determinado pela proteína Blue Dextran. A análise ocorreu numa coluna Superdex 200 GL 10/300 acoplada no equipamento “Äkta Purifier” (GE Healthcare) com volume de 200 μL de amostra a 15 mg mL^{-1} , e tampão composto de 50 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl e 1 mM MgCl_2 , num fluxo de 0,5 mL/min.

3.7 Cristalização e determinação da estrutura tridimensional

3.7.1 Ensaio de cristalização da enzima purificada

As tentativas de cristalização iniciaram-se com triagens utilizando *kits* comerciais desenvolvidos para testar diferentes condições para formação do cristal: Crystal Screen 1 e 2 e INDEX 1 e 2 (Hampton Research). Foi aplicada a técnica de difusão de vapor por gota sentada, na qual utilizaram-se caixas de gota sentada, que são placas especiais contendo 24 poços. No poço maior, nomeado reservatório, foram aplicados 300 μL da solução testada do *kit*, e no poço menor, o pedestal, foi adicionado 1,5 μL da proteína Lip4 purificada e numa concentração de 15 mg mL^{-1} , e 1,5 μL da solução do poço maior. Em seguida, a placa foi bem vedada com fita aderente da empresa Hampton e estocadas num ambiente refrigerado a 18 °C.

Posteriormente, as melhores condições apresentadas foram otimizadas pela variação do pH do tampão e do agente precipitante, com objetivo de obter bons cristais para a análise por difração de raio-X.

3.7.2 Cristalização da enzima Lip4

Após três semanas foram observados cristais em 2 condições, a número 30 do *kit* INDEX I, composta por 0,1 M NaCl; 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 e 1,5 M Sulfato de Amônio, e condição 75 do *kit* INDEX II, formada por 0,2 M de Sulfato de Amônio, 0,1 M de Bis-Tris pH 6,5 e 25% p/v de PEG 3350. Os primeiros cristais obtidos eram muito pequenos ou estavam formando estruturas germinadas. As condições foram refinadas pela variação dos valores de pH (6,1; 6,3; 6,5; 6,8; 7,1) e concentração do agente precipitante, PEG 3350 de 21 a 27% (cada passo era de 2%) e o Sulfato de Amônio variando 1; 1,3; 1,5; 2 M.

A proteína Lip4 foi co-cristalizada com 4 mM do substrato Tributirina, além da aplicação da técnica de *microseeding* em placas com refinamento das condições. Cristais com boas condições para determinar a estrutura foram obtidos após 21 dias de nucleação da proteína no poço 9 da condição 30, INDEX I, com a presença da Tributirina associada a Lip4.

3.7.3 Coleta e processamento dos dados da difração de raio-X

O cristal foi difratado no anôdo rotatório MicroMax-007HR (Rigaku) da Central Analítica do IQ-USP. A coleta foi realizada 0,5° por imagem e um tempo de exposição de 7 minutos. Um conjunto completo de dados foi gerado para o cristal obtido.

Os dados coletados a 2,3 Å de resolução foram analisados no Institut Pasteur de Montevideo, durante a participação no curso CCP4 Workshop “Macromolecular Crystallography School: From data processing to structure refinement and beyond”. As imagens geradas foram indexadas, integradas e escalonadas utilizando o programa Mosfilm (LESLIE, 1992). Uma sequência homóloga depositada no banco de dados de proteína (PDB), uma PcaD de *Burkholderia xenovorans* LB400 (PDBID: 2XUA), com identidade de 29%, foi empregada como modelo na técnica de substituição molecular. As fases iniciais foram determinadas usando o programa

PHASER (MACOY et al., 2007) do pacote do CCP4i. O mapa gerado foi então utilizado para construção do modelo inicial pelo programa ARP/wARP (PERRAKIS et al., 1999).

3.7.4 Refinamento dos dados e obtenção da estrutura da Lip4

O modelo inicial foi refinado pelos programas REFMAC5 (MURSHUDOV, et al., 1997) e COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004). Ajustes manuais do modelo foram intercalados com rodadas de refinamento pelo REFMAC5 para cálculos do R_{free} e fatores-B. A estrutura preliminar obtida foi validada pelo programa PROCHECK (LASKOWSKI; MOSS; THORNTON, 1993). As FIGURAS representativas da estrutura tridimensional da Lip4 foram geradas pela interface gráfica do programa COOT, PyMol (DELANO, 2002) e Chimera 1.10.1 (PETTERSEN et al., 2004).

3.8 Ensaios Funcionais

3.8.1 Mutação sítio-dirigida no sítio ativo Lip4

As mutações sítio dirigida para produção das linhagens recombinantes, com substituição do resíduo de serina catalítica presente no sítio ativo da Lip4 por uma alanina e uma cisteína, foram produzidas pelo kit "QuickChange Site-Directed Mutagenesis" (Stratagene). O protocolo utilizado consistiu de uma única reação de PCR, contendo os iniciadores desenhados especificamente para cada mutação e o plasmídeo pET28a com *lip4* (TABELA 8).

A reação de amplificação consistiu de 5 μL do tampão de reação 10X; 1 μL de dNTP mix (25 mM); 1 μL DNA Polimerase *Pfu* Turbo; 2 μL de cada iniciador (10 pmol); 2 μL do plasmídeo, completando a reação com água milli-Q para volume final de 50 μL . A ciclagem foi ajustada para 95 °C por 30 segundos (1 ciclo); 95 °C por 30 segundos, 55 °C por um minuto e 68 °C por dois minutos (25 ciclos); e 68 °C por 10 minutos para extensão final do plasmídeo, e ocorreu no termociclador "Applied Biosystems GeneAmp 9700" (Life Technologies). Ao final da reação de PCR, foi adicionado a cada amostra, 1 μL de Dnp1 e incubadas a 37 °C por 1 hora. O vetor amplificado foi transformado geneticamente por choque térmico em cepas de *E. coli* XL1-Blue, utilizando volumes de 1 e 19 μL da reação e semeado em meio LB ágar com 30 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de gentamicina.

Dos clones positivos obtidos, foram selecionados três acaso, para confirmação da presença da mutação. As colônias foram inoculadas em meio LB líquido com antibiótico de seleção, extraídos, purificados e sequenciados utilizando os iniciadores T7 do vetor de expressão pET28a, conforme descrito acima (item 3.6.1).

3.8.2 Clonagem, superexpressão e purificação das linhagens mutantes

Os plasmídeos contendo os genes mutantes confirmados por sequenciamento foram transformados geneticamente em cepas de *E. coli* apropriadas para expressão. As linhagens mutantes Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C} foram superexpressas em *E. coli* BL21 (DE3) RP e seguiram o mesmo protocolo descrito para a linhagem selvagem Lip4 (item 3.6.3), porém a etapa de purificação por diálise foi substituída pela gel filtração numa coluna Superdex 75 26/60 (S75) (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com Solução C, contendo 10 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM NaCl e 1 mM MgCl₂ e as amostras coletadas em frações de 3 mL. A análise da purificação foi visualizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.

3.8.3 Teste de atividade em meio de cultivo sólido

A linhagem selvagem Lip4 e as cepas mutantes Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C} foram testadas frente a substratos naturais, tributirina (C₄) e trioleína (C₁₈), e substratos sintéticos p-nitrofenila, butirato (C₄), octanoato (C₈) e palmitato (C₁₆), com diferentes valores de pH (6,0 a 9,0), utilizando o tampão Tris-HCl 50 mM para criar as variações de faixa de pH. O óleo de oliva é um substrato que pode substituir a trioleína, devido ao seu baixo custo (JANSEN, 1983).

Os ensaios foram preparados em meio sólido contendo 1% ágar. Para os substratos naturais foi utilizado a concentração de 1% do triacilglicerídeo, emulsificados por sonicação a 50 mA por 3 minutos. Os meios foram preparados individualmente para cada substrato e pH, em seguida autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Os substratos sintéticos foram previamente aprontados numa solução estoque de 20 mM pela diluição em isopropanol:acetonitrila (4:1). Posteriormente, foram adicionados ao meio ágar já estéril numa concentração final de 600 µM.

Dez microlitros das enzimas purificadas foram aplicados nas placas de petri já

solidificadas. Essas placas foram incubadas a 37 °C e a formação dos halos de hidrólise observados durante 72 horas.

3.8.4 Ensaios de dicroísmo circular e estabilidade térmica

Ensaios de dicroísmo circular (CD) foram realizados para analisar a estrutura secundária de Lip4 em comparação com os mutantes Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C}. A presença de α -hélices é verificada por bandas positivas a 193 nm e negativas entre 208 e 222 nm, as fita- β visualizadas pelas bandas positivas a 195 nm e negativas 215 nm, já as proteínas que perderam a estrutura e desenovelaram, apresentam perfil oposto, onde bandas negativas aparecem perto de 195 nm, chegando a elipsidade zero em comprimentos de onde maiores que 210 nm (GREENFIELD, 2006).

As proteínas foram medidas numa concentração aproximada de 10 μ M em 10 mM Tris-HCl pH8; 10 mM NaCl e 1 mM MgCl₂, usando o aparelho “CD J-751 Circular Dichroism Spectropolarimeter” (Jasco Inc.), encontrado na Central Analítica do Instituto de Química da USP/SP. O espectro foi mensurado na faixa de 195 a 260 nm a 20 °C e obtida uma média de oito coletas, usando caminho ótico de 1 mm em cubeta de quartzo, velocidade de 60 nm/min, com tempo de resposta de 8 segundos e abertura de 1 nm.

Os testes de estabilidade “thermal shift” foram realizados com objetivo de analisar os efeitos das mutações na estabilidade da proteína. Foram testados três tampões em diferentes ensaios: **Ensaio 1:** 10 mM Tris-HCl pH8; 10 mM NaCl e 1 mM MgCl₂, com objetivo de testar estabilidade da proteína em tampão de diálise; **Ensaio 2:** 50 mM Tris-HCl pH 8; 0,03% p/v Triton-X; e **Ensaio 3:** 50 mM Tris-HCl pH 8; 0,03% p/v Triton-X100; 1 mM CaCl₂, ambos realizados na presença ou ausência de íons cálcio, com finalidade de verificar a provável existência do efeito protetor do Ca²⁺ sobre a estrutura da proteína Lip4, fenômeno que ocorre em lipases verdadeiras, mas não verificada em esterases.

Nesses ensaios, 20 μ M de cada proteína foi adicionada aos tampões com adição de um corante fluorescente “Sypro Orange 100x” (Sigma Aldrich), numa concentração final de 5x. As amostras foram analisadas num aparelho de “PCR Real-Time IQ5” (Bio-Rad), com temperatura variando de 25 a 96 °C, e os pontos coletados a cada 0,5 °C. A temperatura, na qual a proteína se desenovela é medida pelo aumento da fluorescência emitida pelo corante, que possui afinidade pelas

partes hidrofóbicas da proteína, que ficaram expostas devido a desestruturação proteica (NIESEN et al., 2007).

3.9 Determinação espectrofotométrica da atividade lipolítica utilizando ésteres de p-nitrofenila (pNP) como substrato

3.9.1 Ensaio padrão

As atividades enzimáticas da Lip4 foram avaliadas pela reação de hidrólise catalisada por essa enzima e o substrato sintético p-nitrofenila octanoato (pNPC8), determinada pela medição da quantidade de p-nitrofenol liberado do éster de p-nitrofenila. Esse corante possui uma coloração amarela que absorve luz a 410 nm por 30 minutos a 30 °C (FIGURA 16) (WINKLER; STUCKMANN, 1979). As medições procederam num espectrofotômetro de microplacas “Synergy H1” (BioTek), gentilmente cedido pelo prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, com ajuda do pesquisador de pós-doutorado Dr. Karel Olivarria.

O substrato estoque foi preparado misturando pNPC8 em isopropanol:acetonitrila (4:1) numa concentração de 20 mM. Em seguida, foi preparado o tampão reacional contendo 50 mM de Tris-HCl 8,0; 0,03% p/v Triton X-100 e 0,5 mM do pNPC8 no volume final de 230 µL. A reação iniciou-se pela adição automática (módulo injetor) de 20 µL da solução enzimática previamente diluída em tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8. Uma curva de calibração para o p-nitrofenol (pNP) foi realizada para subtração do efeito da hidrólise enzimática dos substratos.

Os cálculos de regressão linear da reta gerada a partir do aumento da absorbância proporcionada pela hidrólise do substrato permitiu a determinação das velocidades iniciais da reação e o desvio padrão das médias, que foram obtidos pelo programa “Microsoft Office Excel” (Microsoft), onde 1 U de atividade foi considerada como sendo a quantidade de enzima que catalisa a reação de liberação de 1 µmol de p-nitrofenol por minuto.

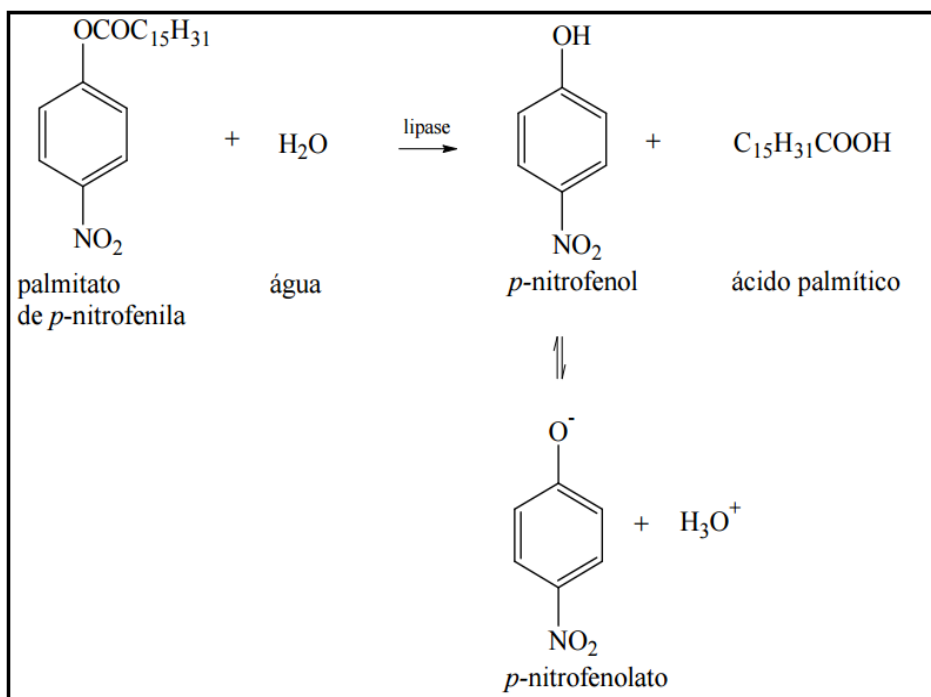


FIGURA 16 – Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenil.

A reação de hidrólise é catalisada por lipases com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico com liberação da cor amarela visualizada por espectrofotometria. FONTE: Adaptado Baron (2008).

3.9.2 Determinação da melhor concentração de substrato

A melhor concentração de substrato para os ensaios de atividade enzimática foi determinada utilizando o tampão reacional do ensaio padrão acrescido o substrato *p*-nitrofenila octanoato (C8) em diferentes concentrações, num volume final de 250 μL . Os valores testados foram: 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 125, 150, 180, 200, 250, 300, 400 e 500 μM . Os experimentos foram realizados em triplicata e os controles utilizados foram os sistemas de reação sem presença da enzima.

3.9.3 Determinação da concentração de enzima para estudo

A concentração da enzima a ser adicionada nos ensaios foi avaliada utilizando o tampão de reação (Tris-HCl pH 8,0 50 mM, 0,03% Triton-X 100) com 500 μM do substrato pNPC8, num volume final de 250 μL . A enzima Lip4 foi testada nas seguintes proporções 5, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 nM. Como controle foi utilizado o

sistema de reação sem adição da enzima, e o experimento realizado em triplicata.

3.9.4 Efeito do pH sobre a atividade lipolítica da Lip4

O pH ótimo para atividade da enzima foi determinado mensurando a atividade hidrolítica em soluções de tampão reacional com diferentes valores de pH. A concentração de enzima escolhida para os ensaios foi de 40 nM diluída no tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 para análise da atividade. Essa preparação foi adicionada ao tampão reacional com seguintes valores de pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0 e 10,0. Para a faixa de valores de pH entre 6,5 e 8,0, utilizou-se o tampão Tris-HCl 50 mM, já para pH 9,0 e 10,0, foi usado o tampão Glicina 50 mM. O controle da reação foi mensurado pelo tampão reacional sem adição da enzima.

3.9.5 Efeitos dos íons metálicos na atividade da enzima Lip4

Foram testados alguns íons metálicos, Ca^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+} e Zn^{+2} , para verificar o efeito destes na atividade enzimática. Os íons foram testados na concentração de 1 e 5 mM, utilizando o pNP octanoato como substrato. O sistema de reação foi composto por tampão reacional Tris-HCl pH 8,0 50 mM, 0,03% Triton-X 100, pNP 500 μM , 40 nM de enzima purificada e o íon a ser avaliado para um volume final de 250 μL . O ensaio foi monitorado durante 30 minutos a 30 °C. Experimentos realizados em triplicata e o controle preparado nas mesmas condições substituindo o elemento avaliado por água.

3.9.6 Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da proteína Lip4

As propriedades cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) da enzima Lip4 foram determinadas realizando-se o ensaio de atividade hidrolítica nas condições ótimas de pH, sem necessidade de adição de íon metálicos para estabilizar a reação, variando apenas a concentração do substrato, o éster de p-nitrofenila nas mesmas proporções descritas no item 3.9.2. A constante de Michaelis-Menten (K_m) foi determinada como a concentração de substrato no qual metade da taxa máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) foi atingida e calculada plotando as atividades lipolítica versus a concentração de substrato. A velocidade da reação foi expressa em μmoles do produto liberado por segundo, os “fittings” das curvas foram realizados usando o programa Origin 8.5.1.

4 RESULTADOS

4.1 Construção da Sub-biblioteca, Expressão, Purificação e Caracterização da Enzima Lip4

A biblioteca metagenômica de solo de Terra Preta de Índio (TPI) foi previamente construída em trabalhos anteriores realizados na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em parceria com as universidades USP (Universidade de São Paulo) e UNB (Universidade de Brasília). Trata-se de uma biblioteca contendo insertos de grandes fragmentos (os insertos têm em média 40.000 pares de bases) inseridos em um vetor fosmidial, pCC1FOS (Epicentre) e hospedada na linhagem *E. coli* EPI300 (Epicentre), sendo formada por, aproximadamente, 10.000 clones (ver item 3.1) (LEOMIL, 2007). Anteriormente, também foi realizado em parceria, o rastreio por clones recombinantes desta biblioteca que expressassem diversas atividades enzimáticas. Dentre as atividades pesquisadas, a capacidade de hidrolisar triglicérides (óleo de soja) foi realizada.

Buscando por clones com capacidade de expressão de enzimas lipolíticas, a partir dessa biblioteca, integrantes do laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP) que colaboram com as análises do potencial da presente biblioteca, chefiados pela profa. Dra. Elisabete José Vicente, realizaram o rastreio de, aproximadamente, 80 mil colônias, semeando as bactérias recombinantes que estavam em cultura líquida diretamente em meio sólido LB contendo óleo de soja emulsificado com goma arábica. Este procedimento resultou na seleção inicial de 14 colônias que, após cultivo, por 72 horas a 37 °C apresentaram halos claros de hidrólise neste meio sólido (BIANCO et al., 2001).

No presente trabalho, foram selecionados 4 clones dentre os 14 clones encontrados na Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio, denominados: Fos1, Fos2, Fos3, Fos4 (FIGURA 17). Inicialmente, tentou-se a construção de sub-bibliotecas para os 4 clones fosmidiais, com sucesso apenas para o clone Fos4. O gene codificando a enzima lipolítica foi isolado, clonado, expresso e caracterizado, passando a ser denominado *lip4*. A enzima purificada Lip4 foi cristalizada e teve sua estrutura tridimensional determinada.

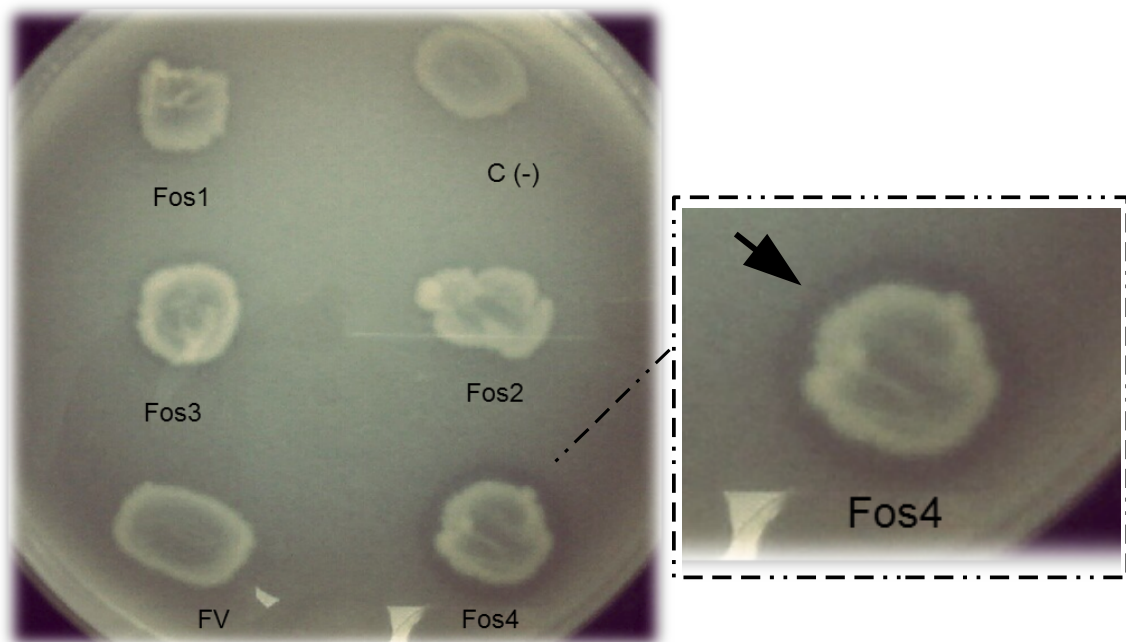


FIGURA 17 - Clones *E. coli* recombinantes na Biblioteca Metagenômica de TPI. Formação de halos de hidrólise ao redor das colônias em meio com ágar tributirina 0,5%. C(-): EPI300 vazia, FV. Fosmídeo vazio clonado na EPI300. Em destaque o Fos4 com maior halo de degradação dentre os 4 clones.

4.1.1 Determinação da melhor concentração de tributirina para visualização de halos de hidrólise.

Para definir a melhor condição de visualização dos halos em meio de cultivo sólido, os clones cultivados em diferentes concentrações de tributirina. Os resultados após 96 horas de cultivo, a 37 °C estão resumidos na TABELA 9. A concentração que resultou no melhor perfil de visualização foi 0,5% de tributirina.

As colônias dos clones Fos1 e Fos2 apresentaram halos bem visíveis apenas após quatro dias de incubação. Entretanto, o mesmo não pode ser observado com as colônias do clone Fos3, que formaram halos de hidrólise bem pequenos, comparados aos demais. Dentre todas, as colônias do clone Fos4 destacaram-se dos demais, apresentando halos de hidrólise bem mais visíveis já após 72 horas de incubação. Por esta razão, bem como para fins econômicos, os próximos experimentos foram realizados com 0,5% do substrato tributirina acrescentada ao meio.

TABELA 9 – Crescimento dos clones da Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio em meio PEX com diferentes concentrações do substrato natural Tributirina (Trb).

[Trb]	0,1%				0,5%				1,0%				2,0%			
Tempo	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
LIP 1	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-
LIP 2	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
LIP 3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LIP 4	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-	++	++	-	-	-	-
C(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.1.2 Análise dos perfis de restrição dos insertos fosmidiais

Como esperado, o resultado obtido da extração de fosmídeo com as células cultivadas na presença de indutor L-arabinose 0,01% foi satisfatório, como pode ser visualizado na FIGURA 18. Este fato deve-se a presença do promotor *ara* codificado no cromossomo da *E. coli* EPI300, que quando ativado por indução, permite transcrição do gene *trfA* e tradução na proteína TrfA, garantindo a indução de replicação a partir da origem *OriV*, que aumenta o seu número de cópias entre 1 a 200 vezes por célula (WILD; HRADECNA; SZYBALSKI, 2002);

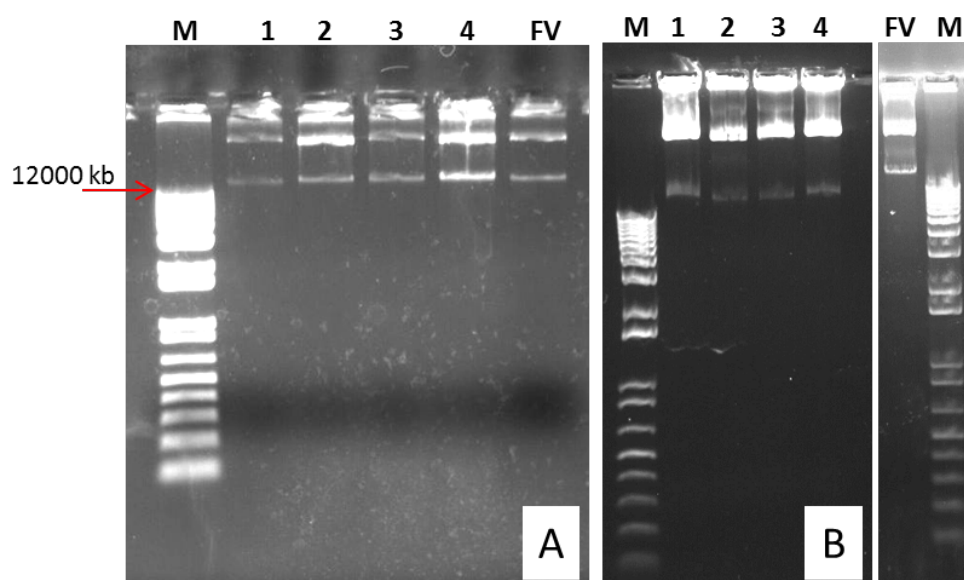


FIGURA 18 – Eletroforese da extração fosmidial dos clones lipolíticos da Biblioteca Metagenômica

(A) Extração clones sem adição do indutor L-Arabinose 0,01%. **(B)** Extração com uso do indutor de crescimento. **M.** *Ladder 1kb Plus Fermentas*, 1 a 4. Clones fosmídeos (Fos), **FV.** fosmídeo vazio.

Na análise dos perfis dos clones gerados por digestão com *NotI* pôde-se concluir que os insertos dos quatro clones selecionados são distintos, pois para cada um dos clones resulta em fragmentos de diferentes tamanhos, evidenciados nas bandas geradas. Por meio de contagem e comparação dos tamanhos dos fragmentos digeridos, verificou-se que os fosmídeos em estudo são de tamanho entre 28.000 e 32.000 pb (FIGURA 19). Ainda, foi observado a presença de uma banda na altura próxima a 8 kb, indicando assim a presença do vetor fosmidial, que possui 8.139 pb.

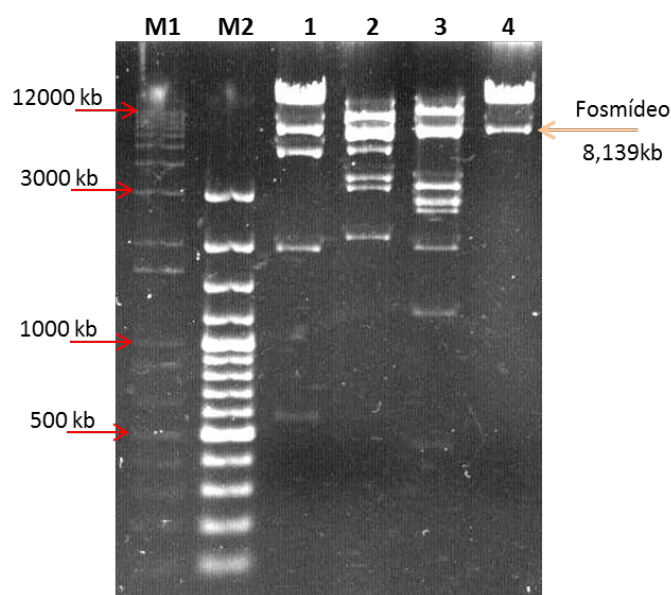


FIGURA 19 – Eletroforese dos perfis de restrição dos clones fosmídeos recombinantes da Biblioteca Metagenômica digeridos com *NotI*. **M1**: *Ladder 1kb Plus Fermentas* (30ng). **M2**: *Ladder 100pb Fermentas* (100ng). **1 a 4**. Recombinantes (Fos).

4.1.3 Confirmação da enzima lipolítica nos clones selecionados

Os DNAs fosmidiais isolados foram empregados na transformação genética de *E. coli* EPI300 e analisados quanto capacidade de hidrolisar o meio com adição de Tributirina 0,5%. Apenas os recombinantes derivados dos fosmídeos extraídos dos clones **Fos1** a **Fos4** mostraram-se positivos quando comparados com o controle negativo, a cepa de *E. coli* EPI300 contendo o fosmídeo pCC1FOS sem inserto (dados não mostrados). Dessa forma, os testes posteriores foram realizados apenas com esses dois clones.

4.1.4 Construção de sub-biblioteca dos fósídeos

4.1.4.1 Digestão dos clones Fos1 e Fos4 com enzimas de restrição

Visando a construção de sub-bibliotecas, os fósídeos positivos foram empregados numa cinética de digestão e ambos apresentaram bons perfis de restrição após tratamento com *Hind*III para fósídeo Fos1 e Fos4 em diferentes tempos de incubação, resultando em fragmentos variando de 2 a 10 kb, tamanho adequado para as etapas de sub-clonagem em vetores de alto número de cópias (FIGURA 20). Após a cinética de digestão, o melhor tempo de digestão escolhido foi o de 120 minutos, para realização dos passos seguintes de restrição com essa enzima.

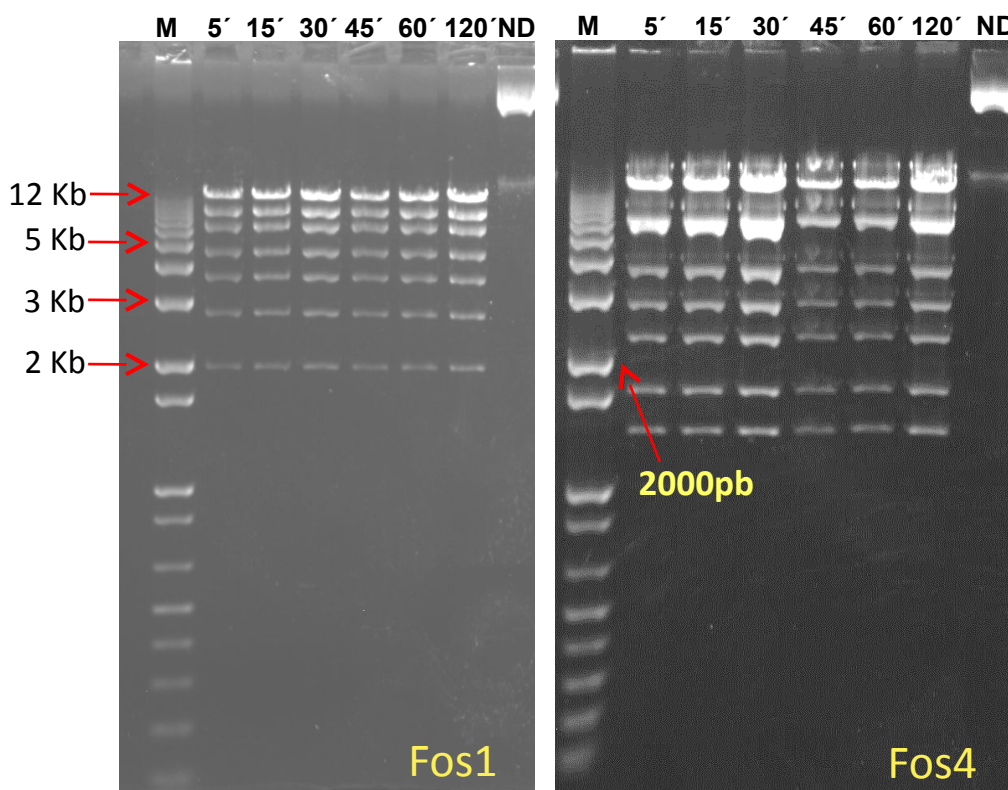


FIGURA 20 – Eletroforese da cinética de tempo da digestão dos clones fósídeos recombinantes Fos1 e Fos4.

Os fósídeos apresentaram melhor perfil na enzima *Hind*III para clones Fos1 e Fos4. **M.** Ladder 1kb Plus Fermentas (100ng). **1 a 6.** Variações de tempo (5', 15', 30', 45', 60', 120') **ND.** Fósídeo não digerido.

Os fragmentos dos fosmídeos digeridos foram empregados numa mistura de ligação com o vetor plasmidial pUC18 previamente digerido com a enzima apropriada (*Hind*III ou *Xba*I). Esta mistura foi empregada na transformação genética da linhagem *E. coli* DH5 α , gerando 261 colônias brancas para a mistura derivada de Fos1, e 264 para a derivada de Fos4.

Nenhum dos subclones derivados de DH5 α /pUC18/Fos1 foi observada a atividade de hidrólise do substrato. Entretanto, dentre os subclones derivados de DH5 α /pUC18/Fos4, apenas **um** foi positivo para de produção de enzima lipolítica, visualizado pela formação de halo ao redor da colônia cultivada em meio com substrato Tributirina 0,5%, logo após 72 horas de incubação, como pode ser visto na FIGURA 21. Esse subclone foi denominado **pSUBL4**.

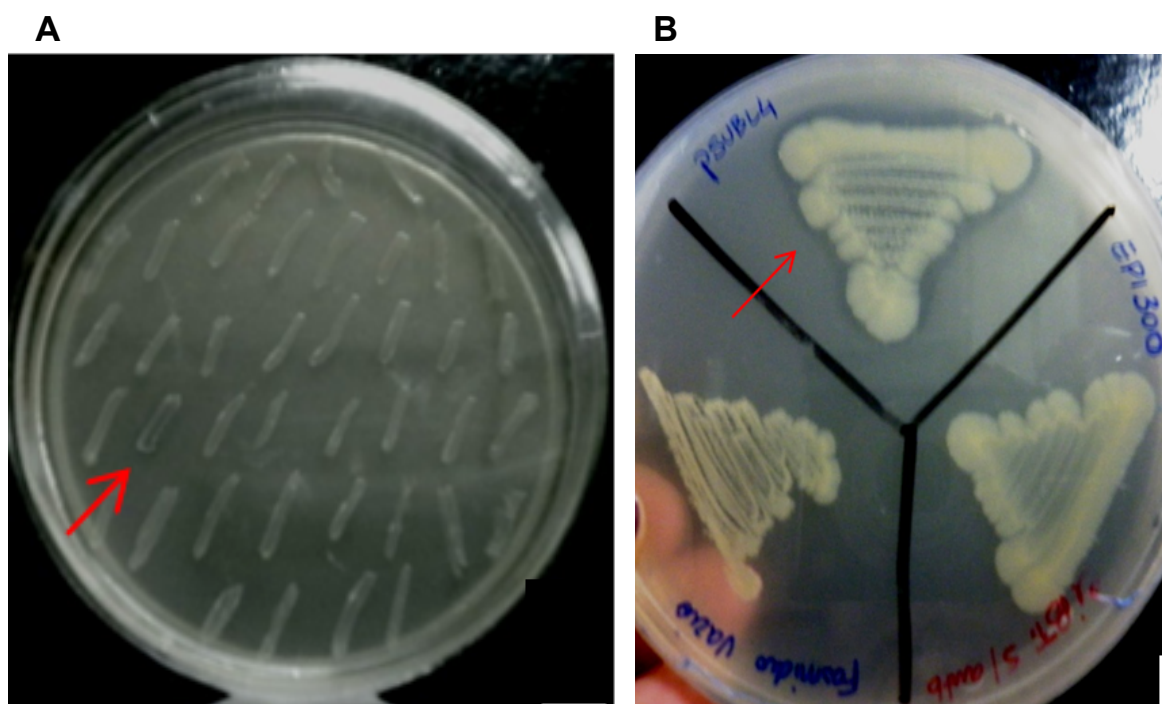


FIGURA 21 – Clone pSUBL4 clonado em vetor plasmídico pUC18 expressando atividade lipolítica.

A atividade hidrolítica pode ser visualizada pela formação de halo ao redor da colônia.

(A) Foto do clone encontrado. **(B)** Foto clone com halo e dos controles sem a formação do halo.

O DNA plasmidial do subclone pSUBL4 foi extraído e redigerido com o *Hind*III, para confirmação da presença do inserto no plasmídio pUC18. Como pode ser observado na FIGURA 22, este plasmídio recombinante, pUC18/SUBL4 possui um inserto de tamanho aproximado de 8.000 pb, inseridos no vetor pUC18, que tem o tamanho de 2.868 pb.

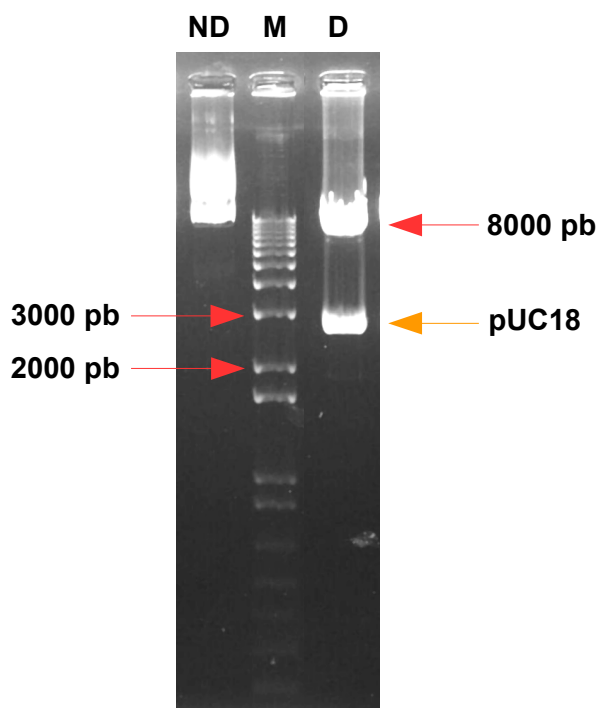


FIGURA 22 – Eletroforese da Extração e Digestão do sub-clone pSUBL4 com *Hind*III. **M.** *Ladder 1kb Plus Fermentas* (100 ng). **ND.** pSUBL4 extraído. **D.** pSUBL4 digerido.

4.1.4.2 Digestão de *Fos4* com enzima de restrição *Xba*I e confirmação da atividade hidrolítica

Visando obter subclones de fragmentos menores que 10 kb, o foscídeo *Fos4* foi fragmentado com auxílio da enzima *Xba*I. O resultado gerado foi bastante interessante, pois os fragmentos gerados estavam entre 1 a 10 kb (FIGURA 23).

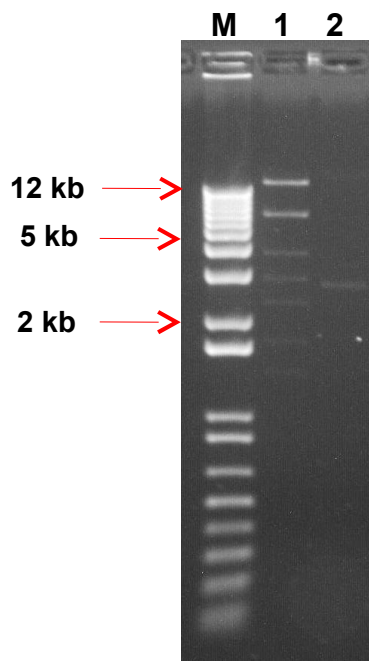


FIGURA 23 - Perfis de migração em gel de agarose 0,8% submetido a eletroforese. **M.** *Ladder 1kb Plus Fermentas*. **1.** Fosmídeo Fos4 digerido com *Xba*I **2.** Vetor pUC18 digerido com *Xba*I.

Os fragmentos dos fosmídeos digeridos com *Xba*I foram empregados em misturas de ligação com o vetor plasmidial pUC18 previamente digerido com mesma endonuclease. Estas misturas foram empregadas na transformação da linhagem *E. coli* DH5 α , gerando 332 colônias brancas. Todas estas colônias foram transferidas individualmente para meio sólido LB com ampicilina, e para meio PEX ampicilina com tributirina 0,5% como substrato.

Dentre os subclones derivados de Fos4, a grande maioria foi positivo para a produção de enzima lipolítica, visualizado pela formação de halo ao redor da colônia cultivada em meio com tributirina 0,5%, logo após 72 horas de incubação. Foram selecionados cinco aleatoriamente para análise dos perfis de restrição. Estes clones plasmidiais foram digeridos novamente com a enzima *Xba*I. Este procedimento resultou em dois fragmentos de DNA, um de 2.686 pb correspondente ao vetor pUC18; e, outro de aproximadamente 2,3 kb correspondente ao inserto. Assim, pôde-se concluir que os insertos dos clones analisados são idênticos, todos possuindo o mesmo tamanho de fragmento gênico (FIGURA 24).

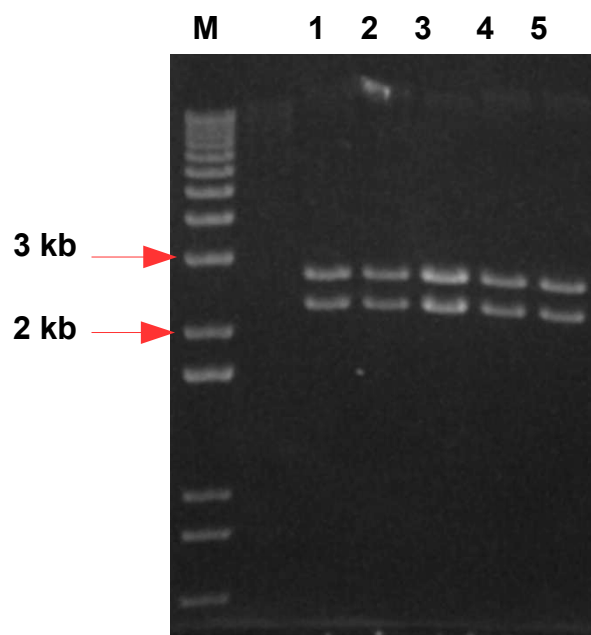


FIGURA 24 - Perfis de migração em gel de agarose submetido a eletroforese. **M.** *Ladder 1kb Plus Fermentas*; **1- 5.** Vetor pUC18 recombinante digerido com *Xba*I.

Como os clones foram considerados cópias uns dos outros, os experimentos a partir daqui seguiram com um subclone plasmidial apenas, que recebeu o nome de **pLip4**.

A fim de identificar a natureza genética do pLip4 ser produtor da enzima codificadora de lipase, este foi extraído a partir dos clones recombinantes *E. coli* lipolíticos e empregado em uma nova etapa de transformação genética da linhagem *E. coli* DH5 α , por eletroporação. A mistura de transformação foi semeada em meio sólido PEX com ampicilina. Todos os clones recombinantes AmpR derivados do plasmídeo pLip4 produziram halos de lipase, mostrando-se positivos quando comparados com o controle negativo: *E.coli* DH5 α vazia e *E.coli* DH5 α contendo o plasmídeo pUC18 (FIGURA 25).

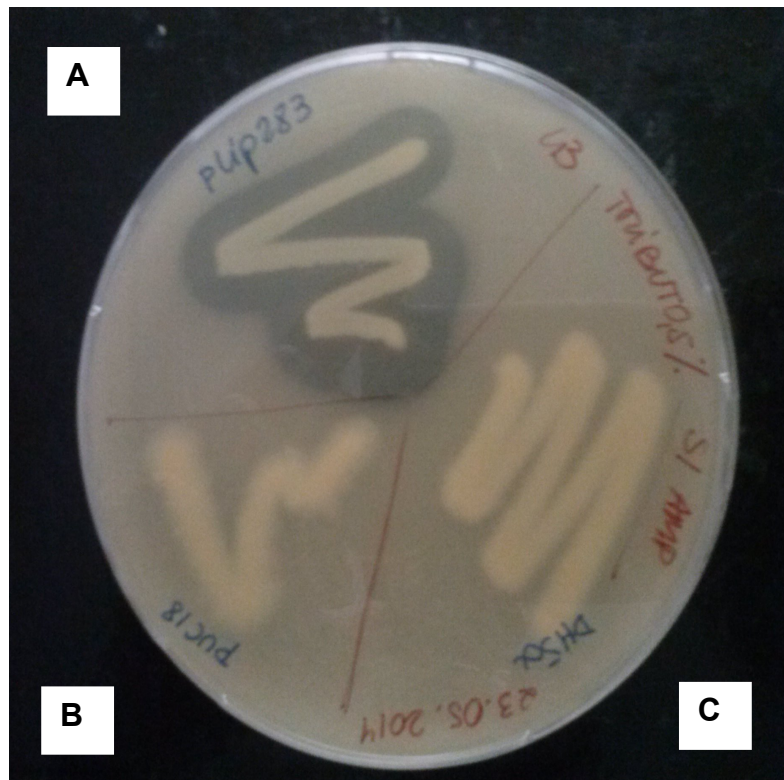


FIGURA 25 – Avaliação da atividade lipolítica em meio PEX contendo tributirina 0,5% a partir da sub-biblioteca construída no plasmídio pUC18. **(A)** DH5α/pUC18/Lip4 apresentando halo de hidrólise; **(B)** DH5α/pUC18 sem halo de hidrólise; **(C)** DH5α sem vetor (linhagem hospedeira).

4.1.5 Seqüenciamento do subclone pLip4 por genoma “walking”

O tamanho do inserto liberado confirmou o sucesso da clonagem e transformação bacteriana para o gene *lip4*, que foi então preparado para seqüenciamento. Após testes com a reação de amplificação do fragmento, foi possível definir a melhor condição para amplificação dos iniciadores, estabelecendo temperatura de 57 °C, concentração ideal de *Taq* polimerase de 1,25 U e $MgCl_2$ de 2,5 mM. Essas condições podem ser visualizadas na FIGURA 26, no qual é possível observar que o fragmento tem aproximadamente 2300 pb, que é o tamanho observado no produto da digestão.

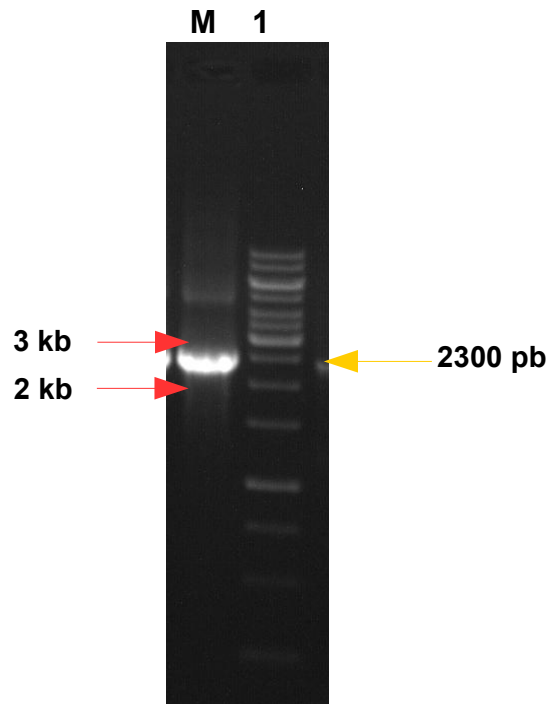


FIGURA 26 – Perfil de migração em gel de agarose submetido a eletroforese do fragmento amplificado por PCR do gene Lip4 a partir das extremidades do vetor pUC18. **M.** Ladder 1kb Fermentas; **1.** Fragmento subclone de pLip4 codificador de lipase com tamanho aproximado de 2,3 kb.

Entretanto, devido o produto gênico ser longo para sequenciamento completo utilizando apenas os oligonucleotídeos que anelem no vetor de clonagem, não foi possível elucidar a sequência completa do fragmento de DNA usando os oligonucleotídeos universais M13_{FW} e M13_{RV} (TABELA 8), gerando como resultado dois segmentos.

Assim, a análise desses segmentos permitiu o desenho de um novo oligonucleotídeo, o LipGW1. Este oligonucleotídeo combinado ao M13_{FW} foi empregado em uma nova reação de PCR, nas mesmas condições já estabelecidas acima, permitindo “caminhar” (Genoma “Walking”) na descoberta da sequência do gene codificador da lipase. O fragmento gerado por genoma “walking” tem 600 pb a menos em relação ao obtido a partir da amplificação com os oligonucleotídeos iniciais, que se anelam ao vetor pUC18, ou seja, o amplificado possui 1500 pb. Com o sequenciamento de mais um segmento, utilizando o LipGW1, foi possível caminhar mais um pouco ao longo do gene Lip4 e desenhar um novo iniciador, denominado LipGW2, que quando submetido ao sequenciamento, permitiu o conhecimento do

fragmento gênico por completo, de aproximadamente 854 pb (FIGURA 27).

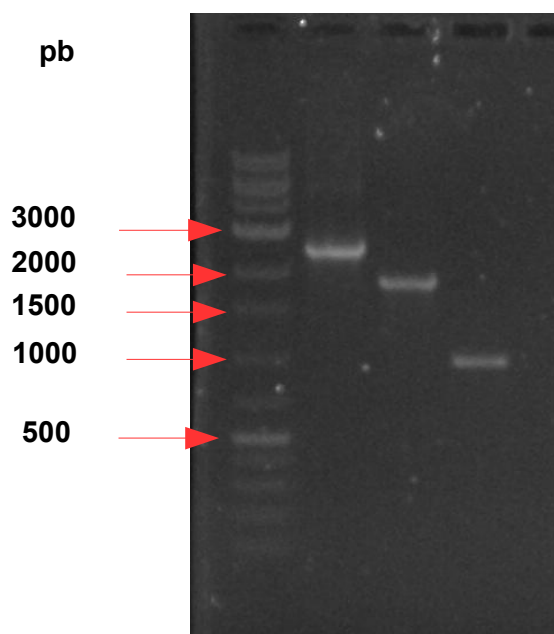


FIGURA 27 – Perfis de migração em gel de agarose 0,8% submetido a eletroforese dos fragmentos amplificados por PCR do plasmídeo recombinante derivado de pLip4.

M. Ladder 1kb Fermentas. **1.** Fragmento gerado com M13_{FW}/M13_{RV} (2300 pb). **2.** Fragmento gerado com M13_{FW}/LipGW1(1500 pb). **3.** Fragmento gerado com M13_{FW}/LipGW2 (854 pb).

4.1.6 Análise da sequência gerada por meio de ferramentas de bioinformática

A sequência do inserto (TABELA 10) completa analisada com os programas BLASTN e ORF-FINDER (NCBI) e ProtParam (EXPASY) detectou uma ORF de 804 pb que codifica para uma enzima lipolítica de 268 aminoácidos, com massa molecular de 29.3 kDa com ponto isoelétrico teórico de 6,06.

TABELA 10 – Sequência da enzima lipolítica Lip4

```

MLYAQVNGINLHYEIEGQGQPLLLIMGLGAPAAAWDPFVQTLTKTHQVIIYDNRGT
GLSDKPDMPYSIAMFASDAVGLLDALNIPRAHVFGVSMGGMIAQELAIHYPQRVASL
ILGCTTPGGKHAVPAPPESLKALEGRAGLTPEEAIREGWKLSFSEEFIHTHKAELEAHI
PRLLAQLTPRFAYERHFQATMTLRVFKQLKEIQAPTLVATGRDDMLIPAVNSEILAREI
PGAELAIFESAGHGFVTSAREPFLKVLKEFLARQSV

```

A sequência predita para Lip4 apresentou identidade em torno de 44% com proteínas hipotéticas encontradas em diferentes micro-organismos depositados no banco de dados do NCBI, porém foi detectada similaridade com um multi-domínio conservado da superfamília das esterases, denominado β -cetoadipato enol-lactona

hidrolase.

A análise filogenética da Lip4 comparada as famílias descritas na literatura, a posicionou como pertencente a **Família V**, descrita por Arpingy e Jaeger (1999), como pode ser visualizada na FIGURA 28. Quando analisada frente ao banco de dados ESTHER, a enzima Lip4 foi detectada como integrante da Família V.2, uma subdivisão da Família V, que abrange as enzimas denominadas Carboximetilbutenolide lactonase (FIGURA 29).

O alinhamento da enzima em estudo com alguns membros da Família V depositadas no banco de dados, permitiu a visualização dos motivos conservados dentro da família (FIGURA 30). Foi observada a tríade catalítica, composta por resíduos altamente conservados dentro das famílias das $\alpha\beta$ -hidrolases, que é formada pelos aminoácidos Ser⁹⁴, Asp²¹⁷ e His²⁴⁵, sendo que o resíduo de Ser⁹⁴ está localizado dentro do pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly, comum nas lipases/esterases. Esse motivo é formado pelos aminoácidos Gly⁹²-Val⁹³-Ser⁹⁴-Met⁹⁵-Gly⁹⁶. As enzimas que possuem serina presente no sítio ativo são conhecidas como serina-hidrolase (BLOW, 1990). A comparação contra o banco de dados de lipases *Lipase Engineering Database* (PLEISS, 2000) indicou que Lip4 pertence a família abH 8.12 das α/β hidrolases na qual encontram-se as Enol-lactona hidrolases. Os resíduos que compõem a fenda oxianiônica nas serinas hidrolases, Gly²⁹ e a Met⁹⁵, foi observado na Lip4 (FIGURA 30). Essa fenda é responsável por estabilizar intermediários de alta energia e participar no estado de transição na formação do intermediário tetraédrico, permitindo com isso o acesso e posicionamento do substrato no sítio ativo (YANG; WONG, 2013).

Foi verificada no banco de dados de proteína (PDB), que Lip4 possui identidade de 33% e 29% com a sequência de proteína das bactérias, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (PDBID: 3OM8) e *Burkholderia xenovorans* LB400 (PDBID: 2XUA), respectivamente, que tem estrutura cristalográfica conhecida.

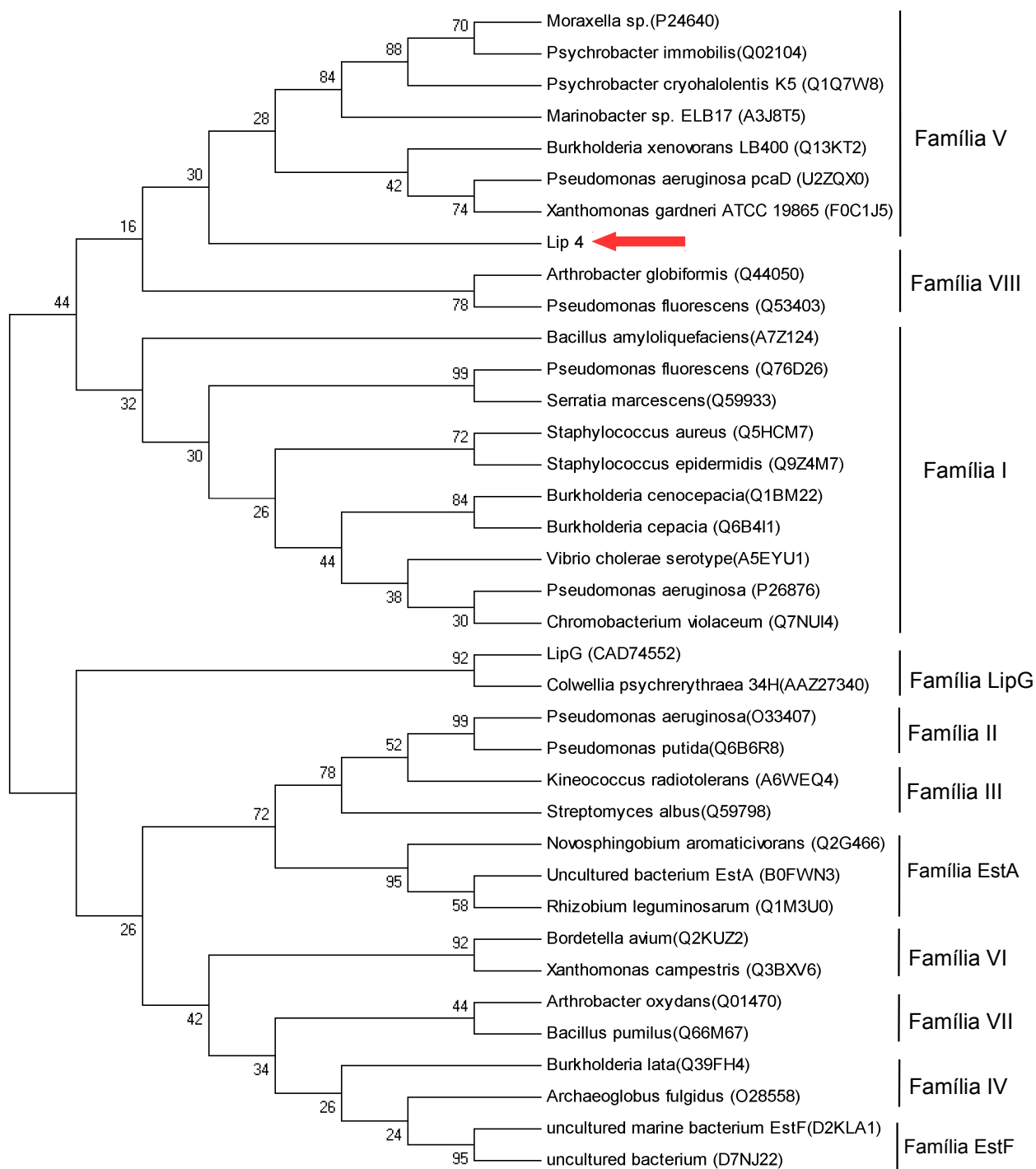


FIGURA 28 – Árvore filogenética *Neighbor-Joining* das famílias lipolíticas bacterianas e Lip4. Sequências de enzimas lipolíticas bacterianas e a Lip4 (seta vermelha) foram agrupadas com base em motivos de sequências conservadas das famílias de lipases bacterianas propostas por Arpingy e Jaeger (1999), Lee et al. (2006), Chu et al. (2008) e Fu et al. (2011). Exceto pela Lip4, todas as sequências de aminoácidos foram retiradas do UniProt (www.uniprot.org). O alinhamento foi realizado usando ClustalW e a árvore criada no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2007) com *bootstrap* de 1000 réplicas.

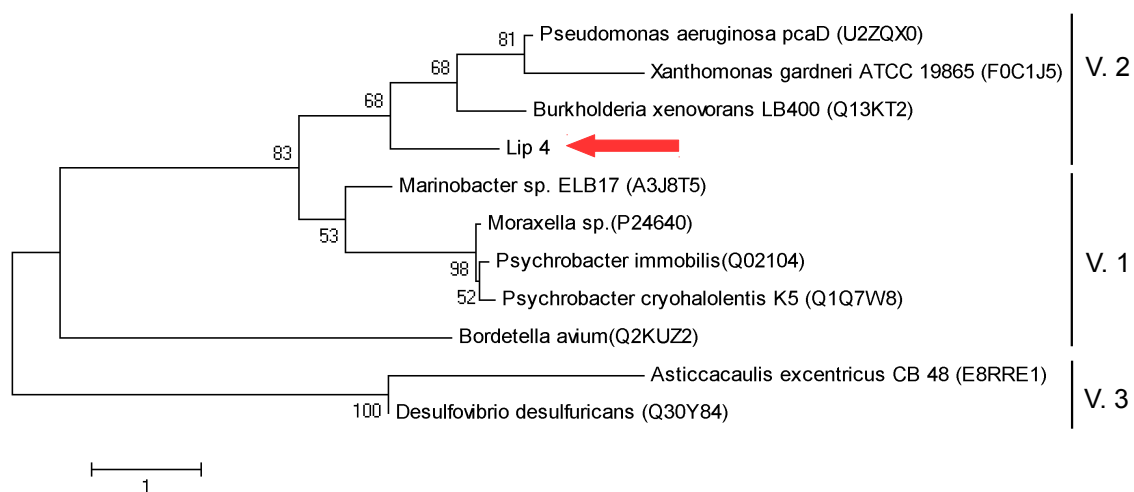


FIGURA 29 – Árvore filogenética *Neighbor-Joining* das enzimas lipolíticas da família V e Lip4.

Agrupamento com lipases bacterianas inseridas na família V proposta por Arpingy e Jaeger (1999) e a enzima de estudo Lip4 (seta vermelha). Exceto pela Lip4, todas as sequências de aminoácidos foram retiradas do UniProt (www.uniprot.org). Alinhamento baseado na subdivisão da família V do banco de dados ESTHER (www.bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER).

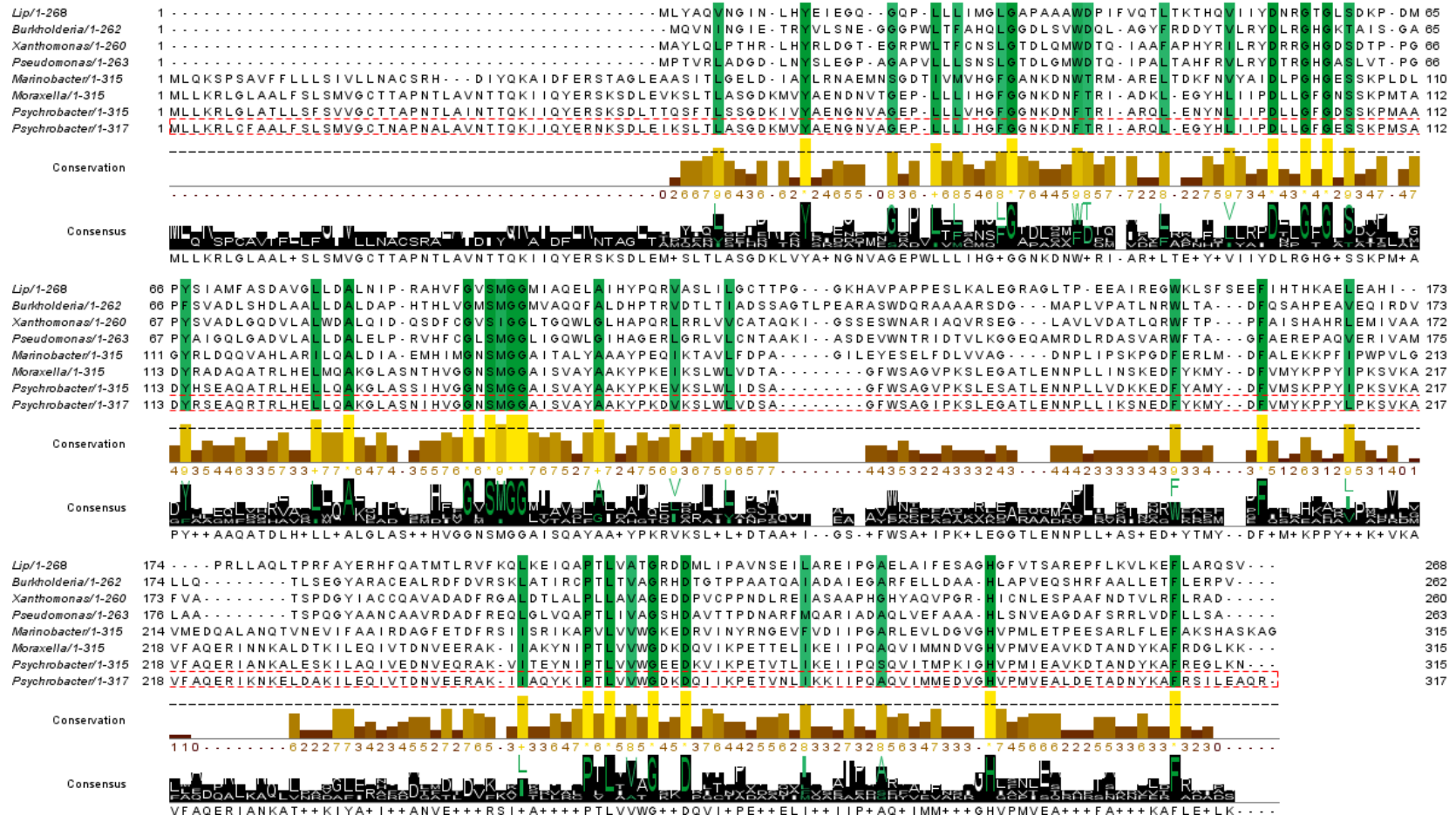


FIGURA 30 – Alinhamento da sequência da enzima Lip4 com outras lipases da Família V.

As anotações em destaque indicam os resíduos pertencentes a motivos conservados dentro das sequências analisadas. O círculo vermelho (•) indicam os resíduos da tríade catalítica. Os resíduos em destaque (▲) são preditos como a fenda oxianiónica. Exceto pela Lip4, todas as sequências de aminoácidos foram retiradas do UniProt (www.uniprot.org): *Burkholderia xenovorans* LB400 (Q13KT2); *Xanthomonas gardneri* (F0C1J5); *Pseudomonas aeruginosa* PcaD (U2ZQX0); *Marinobacter* sp. (A3J8T5); *Psychrobacter cryohalolentis* K5 (Q1Q7W8); *Moraxella* sp. (P24640); *Psychrobacter immobilis* (Q02104).

4.1.7 Clonagem, Expressão, Purificação e Caracterização da Lip4

4.1.7.1 Clonagem, Expressão e Teste de solubilidade

O gene *lip4* identificado foi utilizado como molde para construção de iniciadores específicos com adição de sítios de restrição para as enzimas *Nde*I e *Bam*HI nas extremidades, visando as etapas de clonagem, expressão e purificação dessa proteína. A amplificação foi bem sucedida e o fragmento obtido foi amplificado, purificado e clonado no vetor de expressão pET28a digeridos com as mesmas endonucleases (FIGURA 31), passando a ser denominado **pETLip4**.

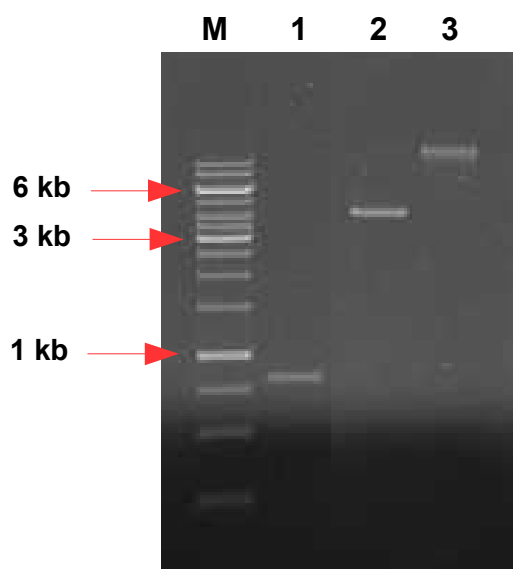


FIGURA 31 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% do gene da enzima Lip4 e pET28a.

M. Ladder 1kb Plus Fermentas. **1.** Gene *lip4* amplificado, purificado e digerido com *Bam*HI e *Nde*I; **2.** Vetor pET28a digerido com *Bam*HI e *Nde*I. **3.** λ DNA 100 ng.

O plasmídeo recombinante com o gene *lip4* foi transformado geneticamente em três cepas de *E. coli*: BL21 (DE3) RIL, BL21 (DE3) RP e BL21 (DE3) STAR para realizar os testes de mini-indução.

As cepas foram induzidas com IPTG e testadas em duas diferentes temperaturas, 28 °C e 37 °C, a fim de verificar se existe diferença na expressão após indução. Após crescimento e lise celular, pôde-se verificar que a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) STAR não apresentou uma boa indução na expressão, já as duas

outras cepas BL21 (DE3) RIL e BL21 (DE3) RP induziram bem, sendo que a última teve uma maior indução, com a presença de uma banda mais marcante se expressando na temperatura de 37 °C (FIGURA 32).

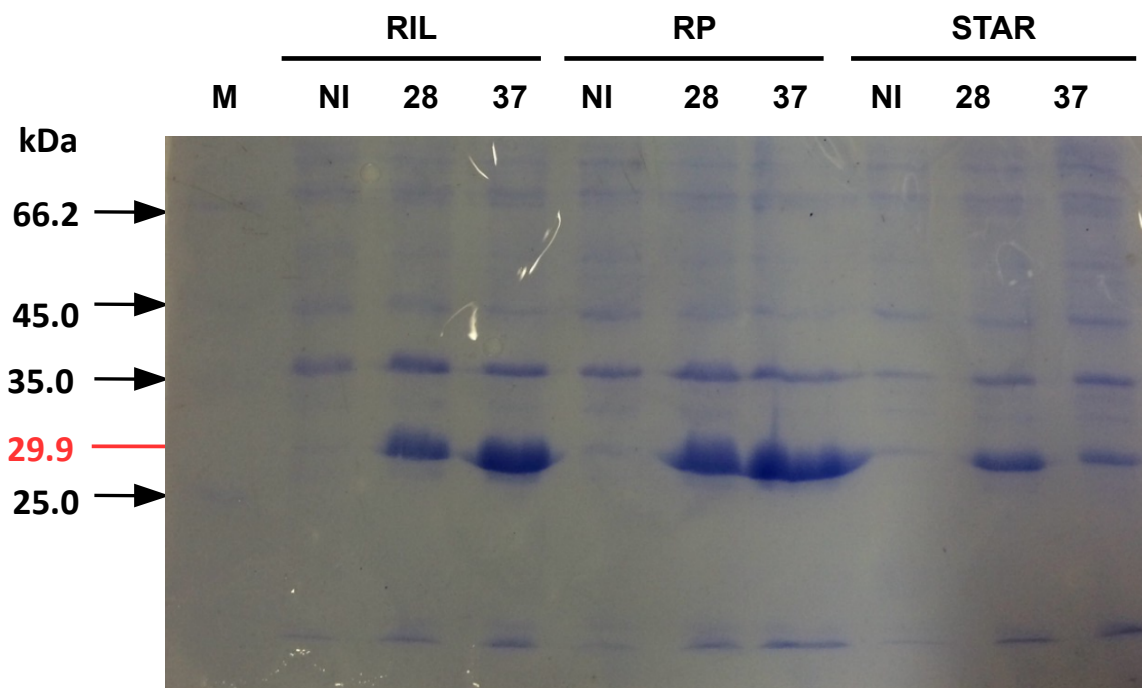


FIGURA 32 – Gel SDS-PAGE 12% da Mini-indução realizada com cepas de *E. coli* BL21 (DE3) RIL, BL21 (DE3) RP e BL21 (DE3) STAR em temperaturas 28 °C e 37 °C. **M.** Ladder E-Z Run Protein Marker (*Thermo Scientific*). **NI.** Não-induzido. Em vermelho está destacado a altura da banda esperada para a enzima Lip4

As cepas BL21(DE3) RIL e BL21(DE3) RP foram submetidas a teste de solubilidade a 37 °C, para determinar se proteína Lip4 encontrava-se na fração solúvel ou insolúvel. O extrato bruto foi centrifugado e as frações obtidas do sobrenadante e precipitado foram analisadas em gel de SDS-PAGE acrilamida 12%. A cepa BL21 (DE3) RP teve a melhor solubilização, pois apesar da enzima lipolítica Lip4 estar também presente na fração insolúvel, foi possível observar uma quantidade suficiente para estudos na fração solúvel (FIGURA 33). A partir daqui, o gene *lip4* clonado num vetor pET28a e transformado geneticamente na célula de *E. coli* BL21 (DE3) RP passará a ser chamado de RP/pET28a/Lip4.

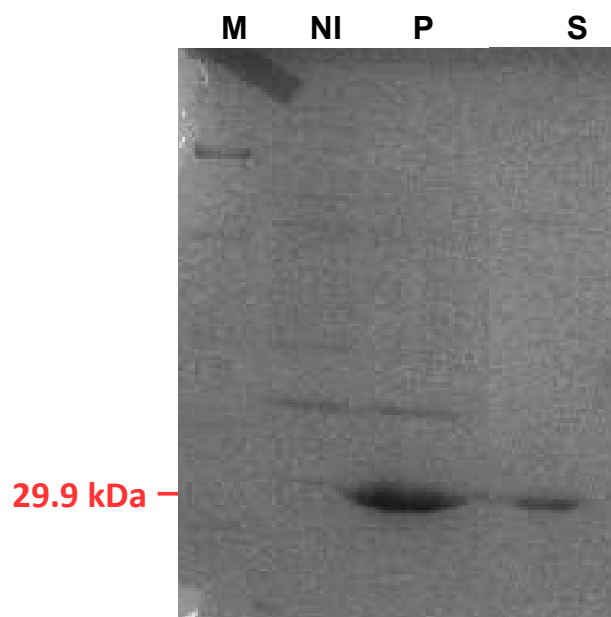


FIGURA 33 – Gel SDS-PAGE 12% das frações obtidas no teste de solubilidade da cepa BL21 (DE3) RP expressa à 37 °C. **M.** Ladder E-Z Run Protein Marker (*Thermo Scientific*). **NI.** Não-induzido. **P.** Precipitado. **S.** Sobrenadante.

Na tentativa de aumentar a expressão da enzima Lip4 no sobrenadante, foi realizada a transformação genética do pETLip4 na cepa de *E. coli* ArticExpress (DE3). Essa cepa possui uma chaperona que auxilia na liberação da proteína para fração solúvel. Foram realizados testes quanto a atividade lipolítica em meio sólido contendo substrato tributirina 0,5% com as cepas de BL21 (DE3) RP e ArticExpress (DE3) com adição ou não de IPTG, e com os clones crescidos em diferentes concentrações de densidade ótica iniciais ($Abs_{600nm}=0,3; 0,6;0,8;1,2$).

Pela análise das FIGURAS 34 e 35, pôde-se inferir que para ambas linhagens de *E.coli*, a presença do indutor IPTG aumentou a expressão da proteína em comparação com os controles. Os halos hidrolíticos formados ao redor dos clones recombinantes só apareceram após 48 horas de incubação à 37 °C (FIGURA 36 e 37). O surgimento dos halos foi observado por 72 horas e pode ser visto na TABELA 11. Não foi verificado diferença no crescimento e formação dos halos com as colônias com concentrações iniciais crescentes de células. Os clones com o gene *lip4* inserido num vetor pET28a clonado em *E.coli* ArticExpress (DE3) passarão a ser

chamados de Artic/pET28a/Lip4.

Os clones Artic/pET28a/Lip4 apresentaram uma maior formação de halo quando crescidos na presença do indutor em comparação com células não induzidas (em torno de 80%), mas quando comparados com os clones de RP/pET28a/Lip4, o tamanho do halo formado com a cepa induzida é semelhante. Esse evento deve-se ao fato da cepa BL21 (DE3) RP possuir vazamento da expressão do gene da proteína mesmo em níveis basais na ausência de IPTG. Optou-se por continuar os experimentos de expressão em larga escala utilizando a cepa BL21 (DE3) RP por ser mais rápido o processo de expressão.

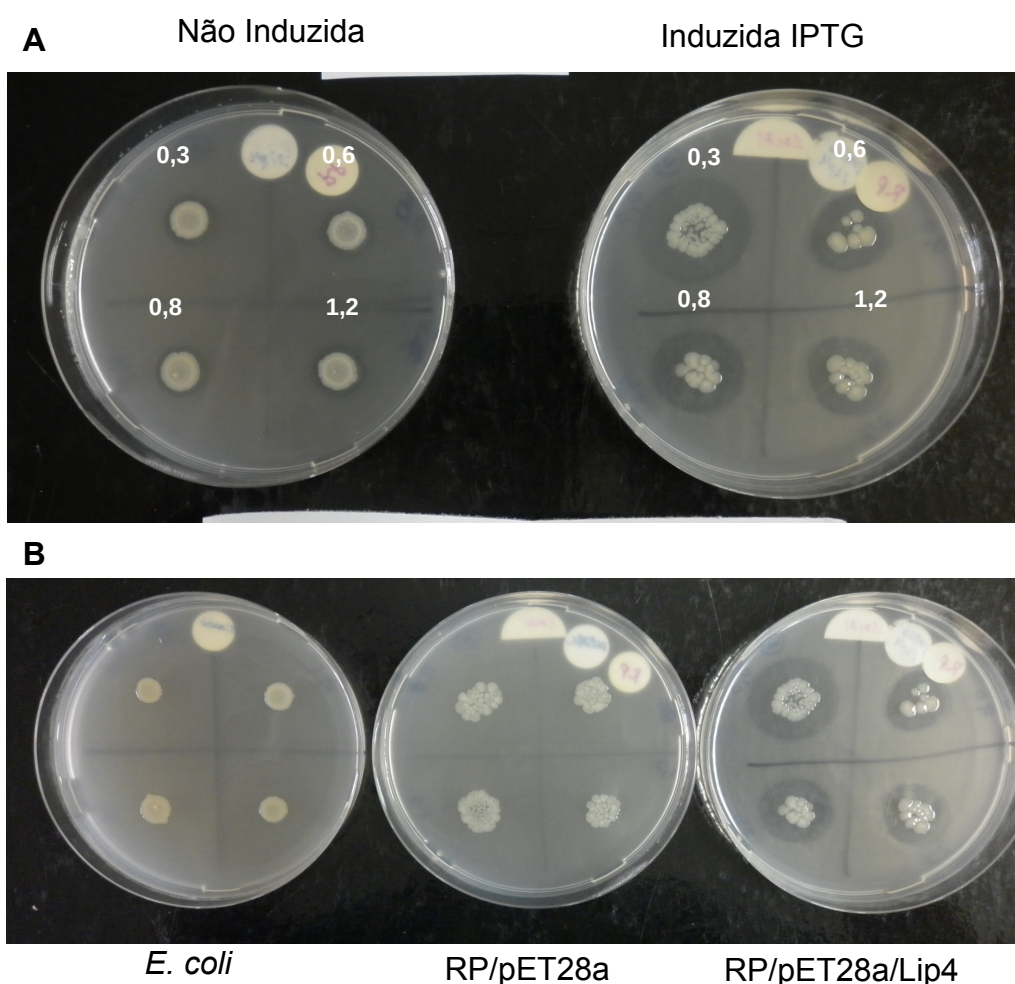


FIGURA 34 - Visualização do halo de hidrólise em meio sólido com tributirina 0,5% dos clones transformados geneticamente em BL21(DE3) RP. Clones crescidos até diferentes absorbâncias 600 nm (0,3;0,6;0,8;1,2). **(A)** Crescimento de clones em meio LB ágar na presença ou não do indutor IPTG (1 mm). **(B)** Crescimento sob indução dos clones com inserto Lip4 e controles sem a presença do inserto. As DOs (0,3; 0,6; 0,8; 1,2) dos clones são iguais a da figura A.

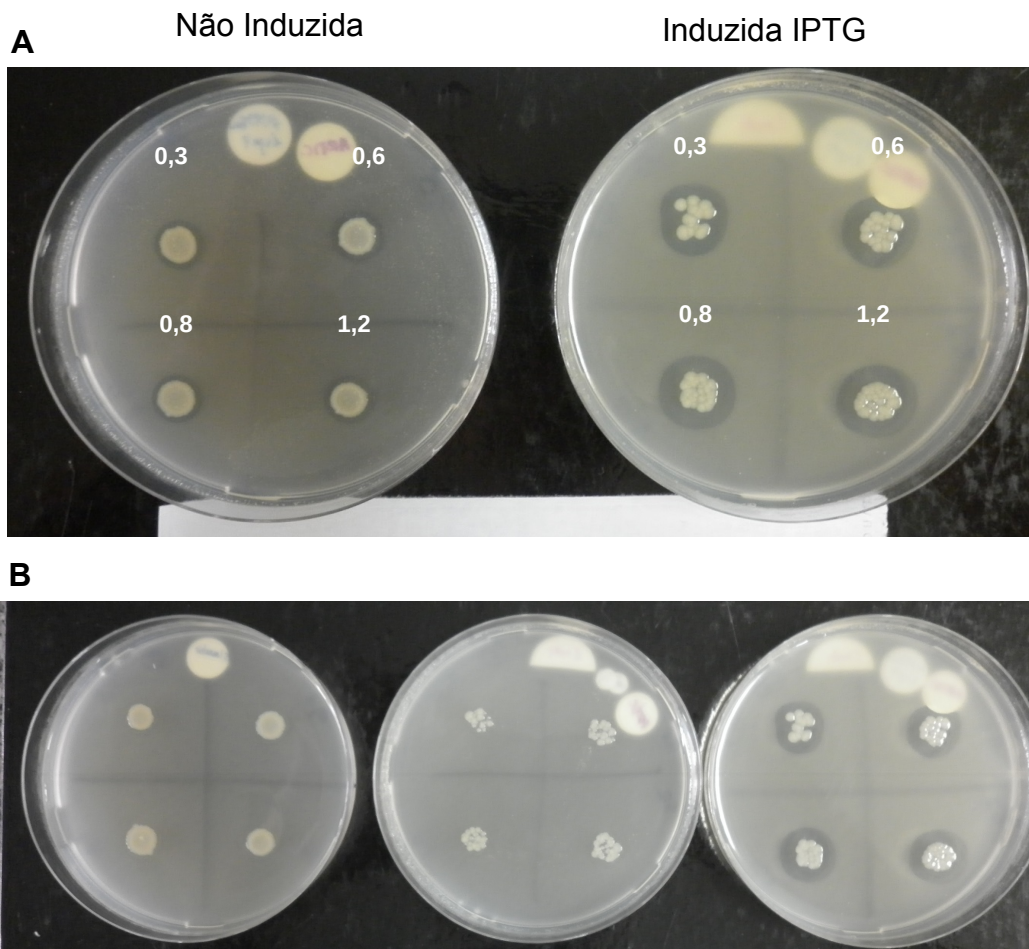


FIGURA 35 - Visualização do halo de lipídios em meio sólido com 20% lipídios em *E. coli* transformada com pET28a/lip4. Clones crescidos até diferentes absorvâncias 600_{nm} (0,3;0,6;0,8;1,2). **(A)** Crescimento de clones em meio LB ágar na presença ou não do indutor IPTG (1 mM). **(B)** Crescimento sob indução dos clones com inserto Lip4 e controles sem a presença do inserto. As DOs (0,3; 0,6; 0,8; 1,2) dos clones são iguais a da figura A.

O plasmídeo pET28a contendo o gene *lip4* foi sequenciado a partir das extremidades utilizando os iniciadores do vetor de expressão pET28, e confirmou-se que o gene *lip4* não havia sofrido mutação durante as etapas de amplificação e clonagem.

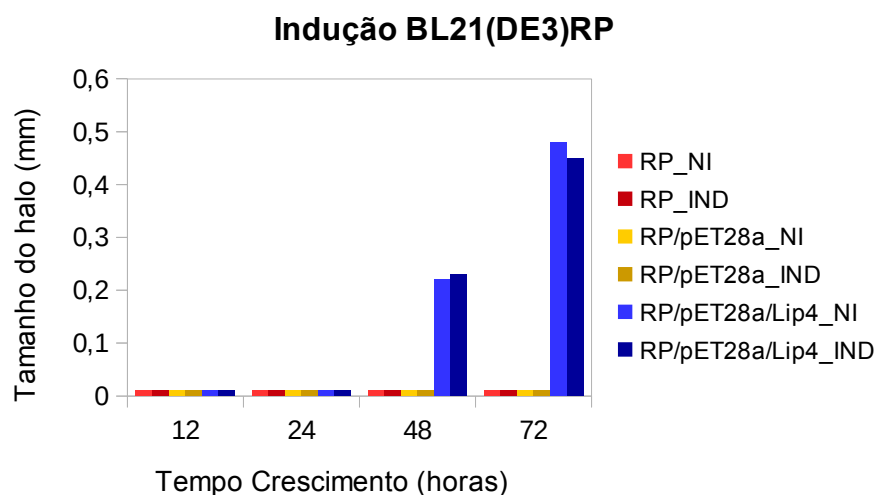


FIGURA 36 - Gráfico do tamanho do halo de degradação da Tributirina em meio ágar pelos clones da cepa BL21(DE3) RP.

Não foi observada expressão nos controles das células BL21 (DE3) RP com e sem plasmídeo pET28a com inserto ou vazio. **NI**. Não induzida. **IND**. Induzida.

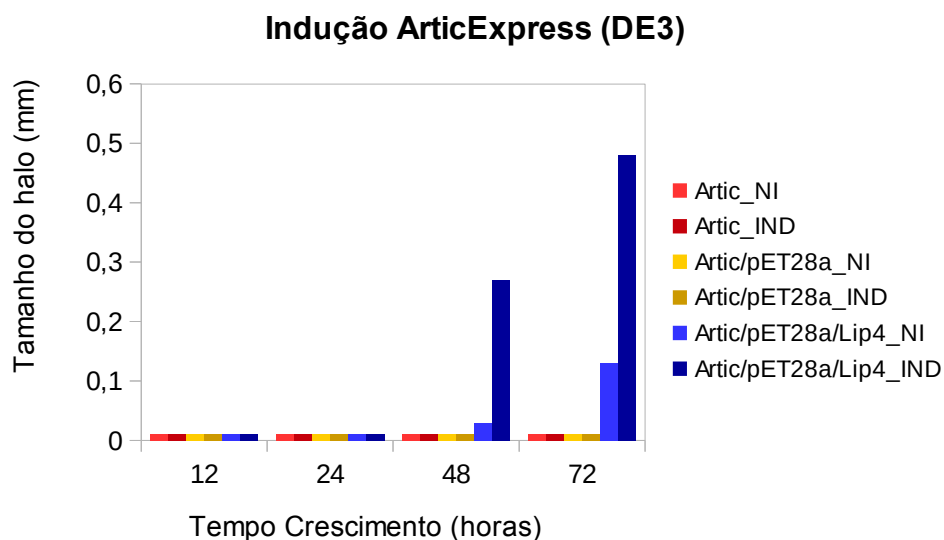


FIGURA 37 - Gráfico do tamanho do halo de degradação da Tributirina em meio ágar pelos clones da cepa ArticExpress (DE3).

Os controles das células de ArticExpress (DE3) sem e com plasmídeo de expressão pET28a vazio foram também feitos e não se observou halo de degradação. **NI**. Não induzida. **IND**. Induzida.

TABELA 11 – Medida dos halos de hidrólise dos clones induzidos.

HORAS	Artic/pET28a/Lip4*		RP/pET28a/Lip4*	
	Não Induzida	Induzida	Não Induzida	Induzida
12	0,01	0,01	0,01	0,01
24	0,01	0,01	0,01	0,01
48	0,03	0,27	0,22	0,23
72	0,13	0,48	0,48	0,45

Tamanho do halo de hidrólise formado ao redor dos clones Artic/pET28a/Lip4 e RP/pET28a/Lip4 incubados por 72 horas, na presença ou não do indutor IPTG.

(*) halos medidos em mm

4.1.7.2 Expressão e Purificação de Lip4

A proteína Lip4 com cauda de histidina foi devidamente expressa no experimento em larga escala na cepa BL21 (DE3) RP, como pode ser visualizado na FIGURA 38, onde o extrato celular pôde ser avaliado em gel desnaturante SDS-PAGE antes e após indução com IPTG por 4 horas. A presença de uma banda protéica superexpressa após a indução, indica que o sistema de expressão do clone RP/pET28a/Lip4 está funcionando. A proteína recombinante apresentou uma massa molecular de 31 kDa, sendo a teórica 29.3 kDa.

A purificação da enzima Lip4 foi realizada em uma única etapa de purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e eluída em tampão com concentrações crescentes de imidazol. As frações eluídas da Lip4, com 1 mL cada (FIGURA 38), foram combinadas, num volume final de 7 ml, e dialisadas para retirada do imidazol da solução. Após a diálise, a concentração das proteínas totais foi determinada por espectrofotometria, resultando numa solução de 28 mg mL⁻¹. Para as etapas posteriores de trabalho, a concentração protéica foi diluída em tampão de diálise até a concentração final de 15 mg mL⁻¹.

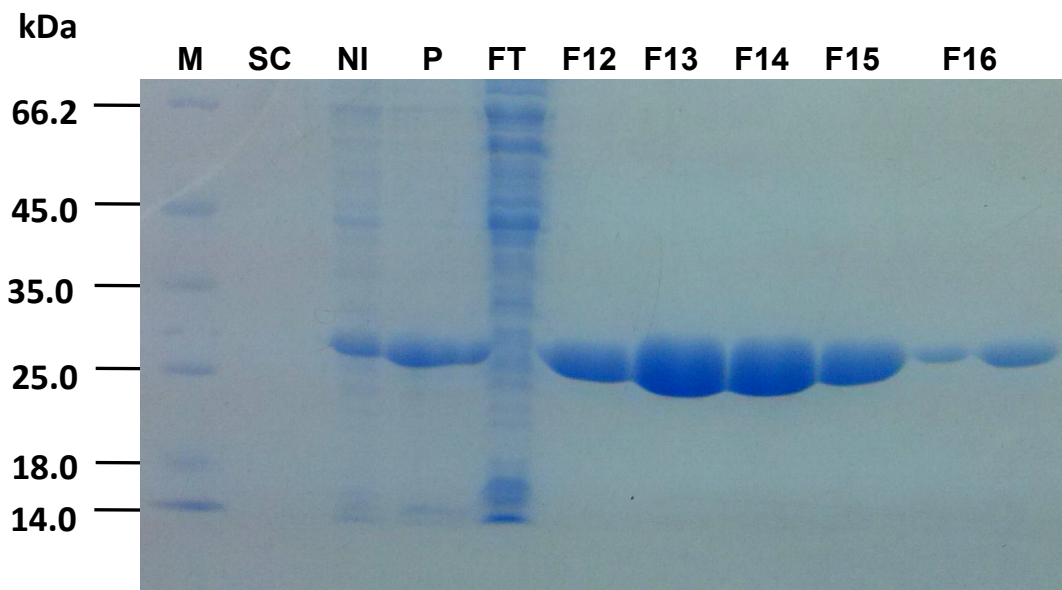


FIGURA 38 – Gel de SDS-PAGE 12% da Purificação de Lip4 por Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel.

M. *Ladder EZ-Run Protein Marker (Thermo Scientific)*. **SC.** Sobrenadante do Cultivo. **NI.** Não-Induzido; **P.** Precipitado. **FT.** Flow-Through. **F12 a F16.** Frações purificadas coletadas.

4.1.8 Determinação da atividade pela mutação no sítio ativo da Lip4

4.1.8.1 Mutação sítio dirigida do resíduo catalítico Ser⁹⁴

A fim de saber sobre a interação entre os resíduos que compõem a tríade catalítica do sítio ativo, foram realizados ensaios de mutação sítio dirigida, onde foram produzidos dois mutantes de Lip4. A estratégia teórica era abolir a atividade hidrolítica da enzima, para tanto, o aminoácido nucleofílico Ser⁹⁴ foi substituído por um resíduo hidrofóbico alanina (Lip4_{S94A}) e um hidrofílico cisteína (Lip4_{S94C}) (FIGURA 39), este último encontra-se presente no sítio ativo de uma Dienelactona hidrolase (DLH), uma lactonase homóloga que catalisa degradação de compostos aromáticos, como descrito por Pathak e colaboradores (1988) (Cys¹²³-Asp¹⁷¹-His²⁰²). Mutações em aminoácidos do sítio ativo da enzima DLH (DLH_{C123S} e DLH_{C123A}) mostraram que a troca para uma serina protease diminuiu consideravelmente a atividade da enzima na degradação tanto de compostos aromáticos quanto de ésteres de cadeia simples, enquanto que a mudança para uma alanina, tornou a DLH inativa (PATHAK;

ASHLEY;OLLIS, 1991).

4.1.8.2 Atividade hidrolítica da Lip4 e dos Mutantes Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C}

A proteína Lip4 e as linhagens Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C} foram transformadas geneticamente em cepas de *E. coli* BL21 (DE3) RP e os clones obtidos foram submetidos a testes em meio de cultivo sólido contendo substrato tributirina 0,5%, a fim de verificar se as linhagens mutantes haviam perdido a atividade hidrolítica.

A formação do halo de hidrólise foi observada durante 72 horas, como mostra a FIGURA 40. Pode-se verificar que apenas a linhagem selvagem apresentou halo ao redor da colônia, após período de incubação, indicando que o gene estava corretamente expresso e a enzima estava íntegra e ativa. Esse resultado leva a inferir que a mutação no sítio catalítico da enzima, causou a perda da atividade enzimática nas linhagens mutantes. A presença ou não do indutor IPTG no meio de cultivo também não auxiliou no processo de superexpressão da enzima, apenas corroborando com dados anteriores que a cepa BL21 (DE3) RP possui vazamento na expressão do gene.

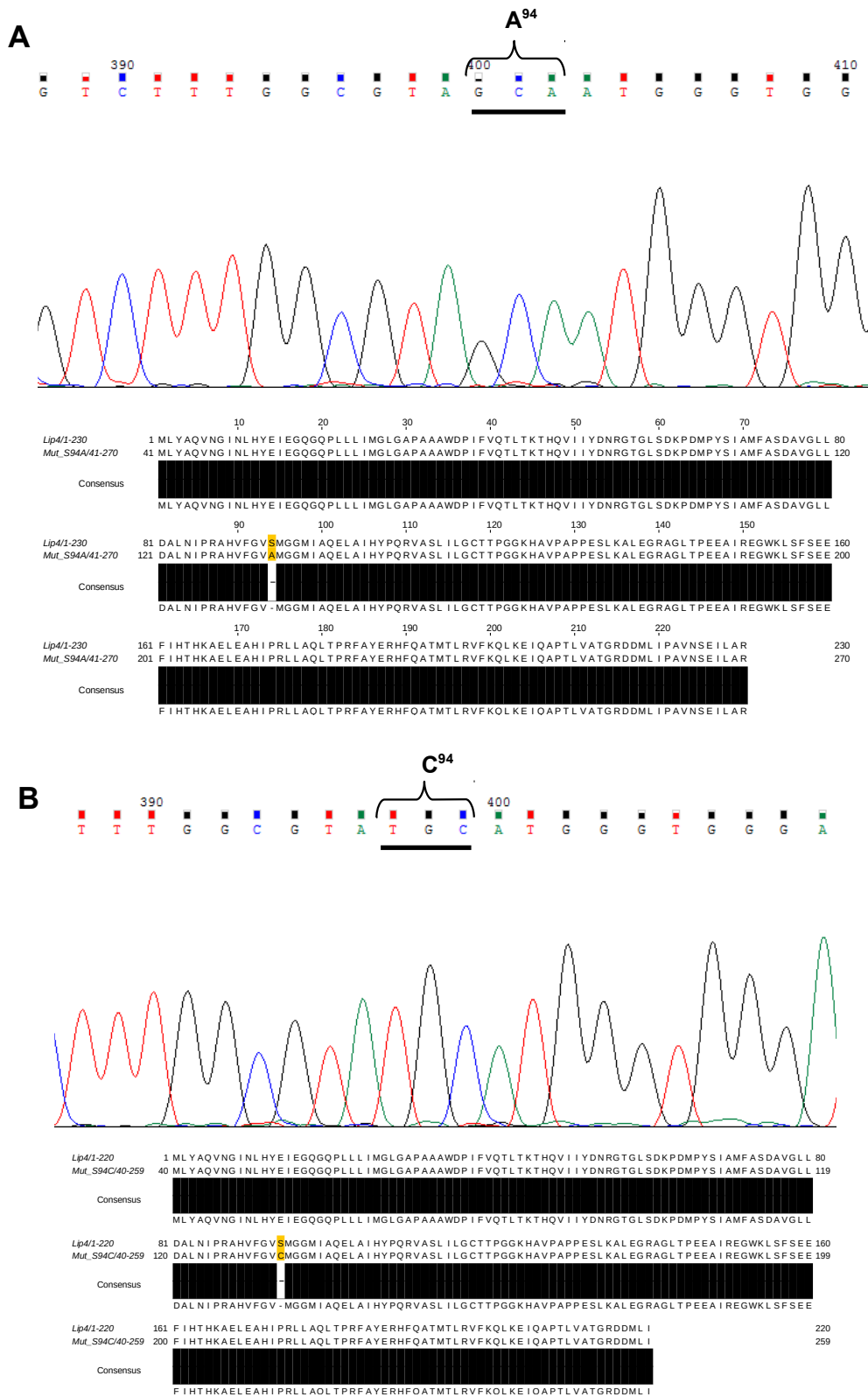


FIGURA 39 – Mutantes de Lip4, Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C}. Sequenciamento dos clones. **(A)** Lip4_{S94A} e **(B)** Lip4_{S94C}. O cromatograma indica o códon mutado de Alanina e Cisteína na posição do resíduo Ser⁹⁴. O alinhamento mostrado refere-se a sequência de aminoácidos das linhagens mutantes com a selvagem Lip4.

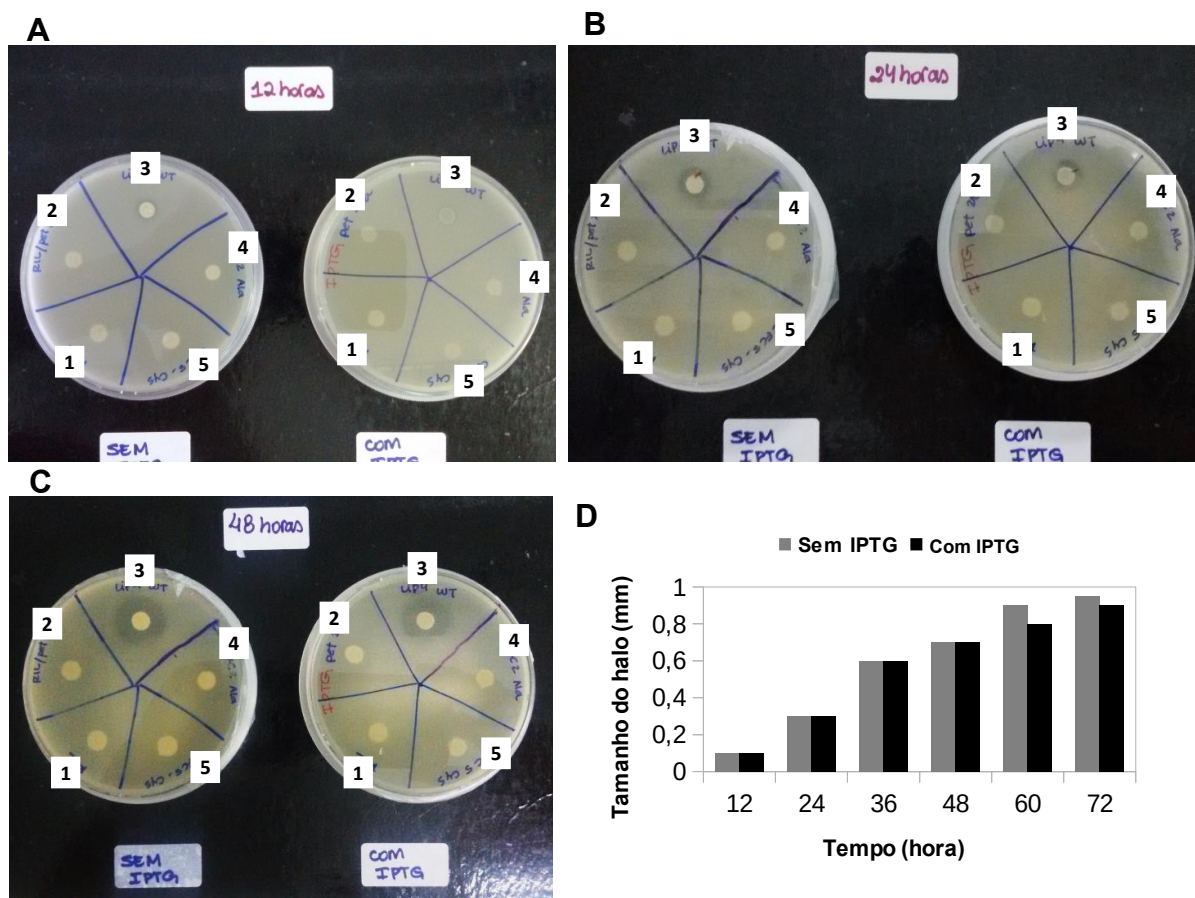


FIGURA 40 - Crescimento em meio de cultivo LB ágar com 0,5% Tributirina do clone Lip4 e mutantes Lip4^{S94A} e Lip4^{S94C}.

(A) 12 horas; (B) 24 horas; (C) 48 horas; (D) Gráfico tamanho dos halos de hidrólise da célula, do tipo selvagem, RP/pET28a/Lip4 formado em função do tempo, com e sem adição do indutor IPTG. 1. RP Vazia; 2. RP/pET28a; 3. RP/pET28a/Lip4; 4. RP/pET28a/Lip4^{S94A}; 5. RP/pET28a/Lip4^{S94C}.

4.1.9 Determinação da atividade lipolítica utilizando substratos naturais e artificiais

4.1.9.1 Visualização da especificidade da enzima lipolítica Lip4 em meio sólido com diferentes substratos.

Testes em placa contendo ágar emulsificado com substratos naturais tributirina (C₄) e trioleína (C₁₈) (FIGURA 41), permitiu visualizar a atividade das enzimas purificadas, Lip4 selvagem e as duas linhagens mutantes. Halos de hidrólise foram produzidos apenas pela enzima selvagem nas placas contendo tributirina. O halo maior foi observado em meio tamponado em pH 9, indicando a preferência da enzima Lip4 por meios de pH alcalinos. A enzima não foi ativa frente

ao meio ágar suplementado com lipases de maior cadeia de carbono, esse fato deve-se possivelmente, da enzima ser uma esterase com atividade em substratos com cadeia menor que dez carbonos (C<10).

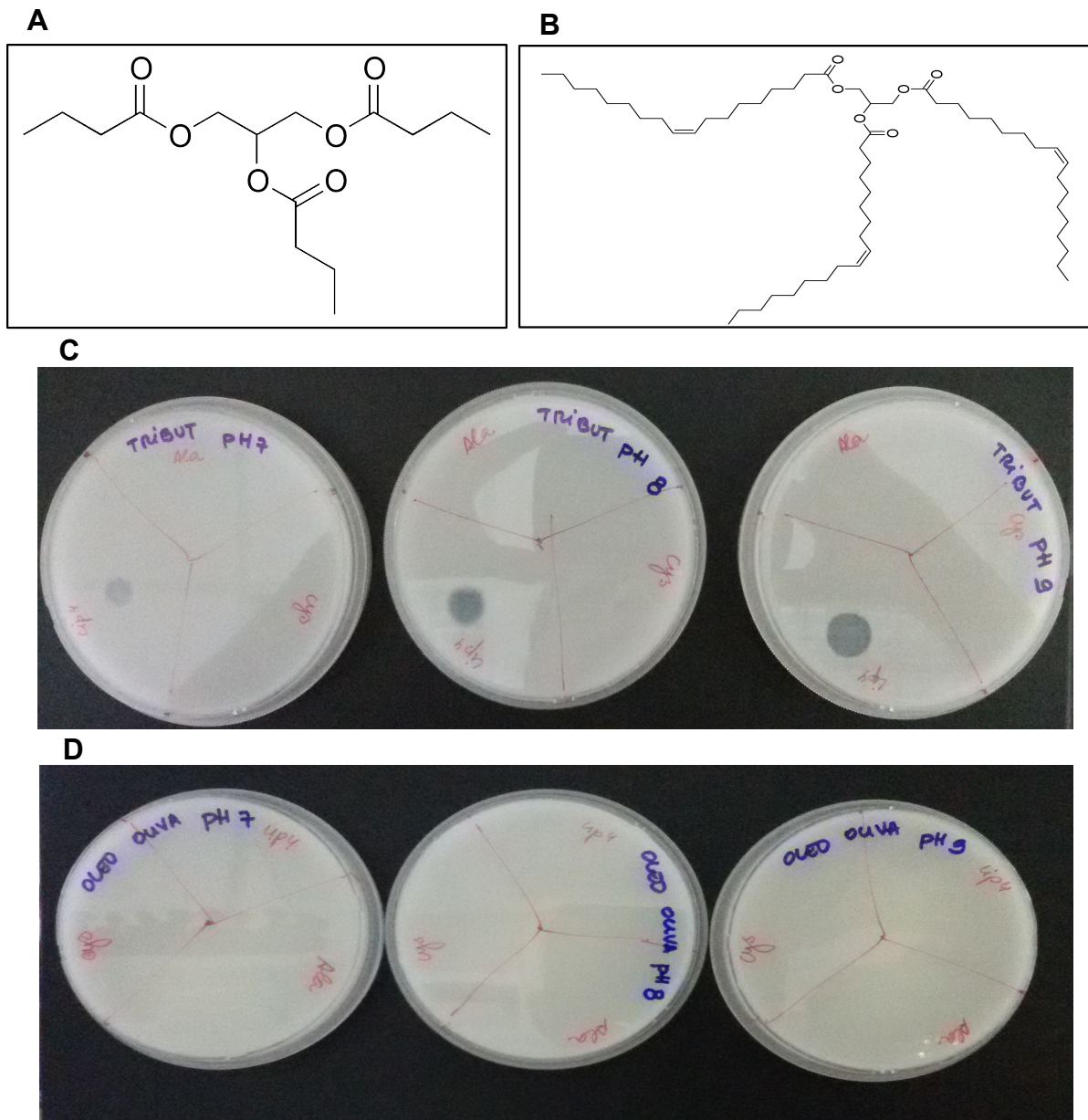


FIGURA 41 – Atividade enzimática da enzima Lip4 e das mutantes Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C} em ágar suplementado com substratos naturais.

As enzimas purificadas foram aplicadas (10 µL) no meio emulsionando com substrato em diferentes com valores de pH 7, 8 e 9. **(A)** Fórmula estrutural da tributirina (C₁₅H₂₆O₆) **(B)** Fórmula estrutural da tributirina (C₅₇H₁₀₄O₆) **(C)** Meio ágar com substrato tributirina 1%. **(D)** Meio ágar com óleo de oliva 1% como substrato.

Ensaio preliminares em placa utilizando substratos artificiais pNP monoacilésteres para determinar a especificidade de Lip4 contra ésteres de p-nitrofenila com grupos acila de diferentes comprimentos de cadeia de carbono, mostrou que a enzima Lip4 teve uma preferência pelo substrato de com grupamento acila de cadeia médio octanoato de p-nitrofenila (pNPC8) (FIGURA 42). Apesar das mutantes também apresentarem um halo de hidrólise, é visível uma diminuição da atividade comparada a enzima selvagem.

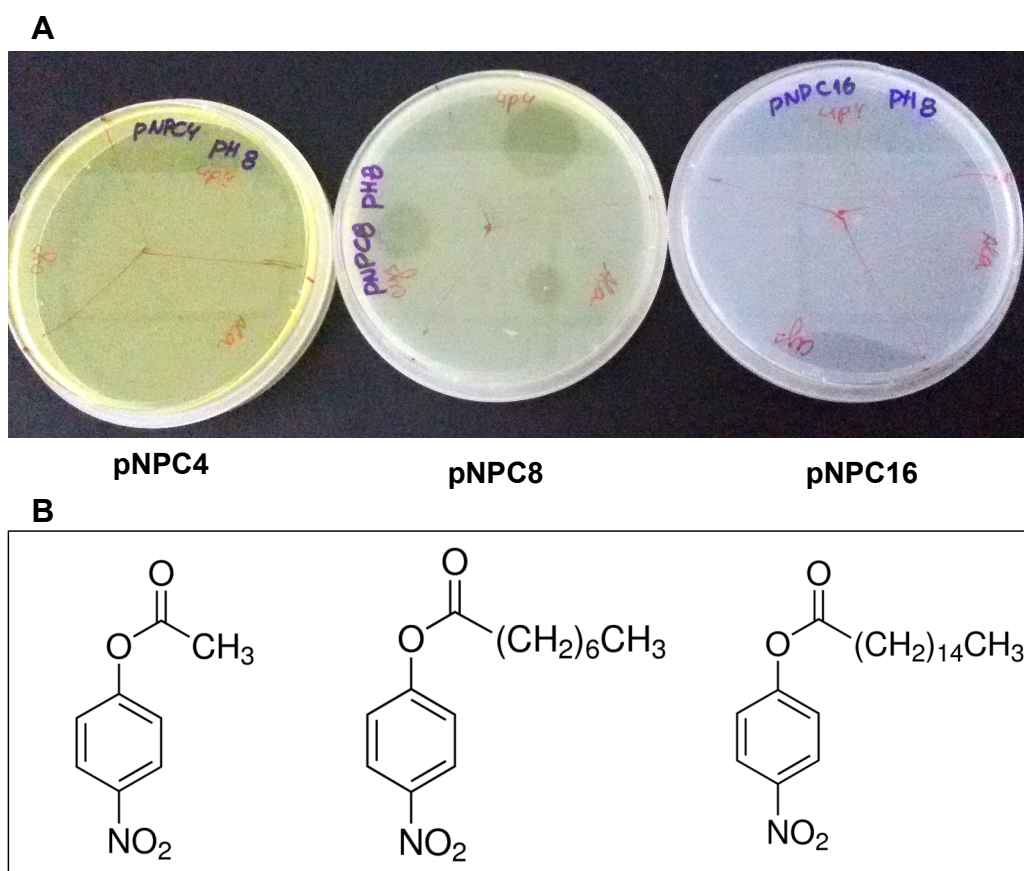


FIGURA 42 – Atividade enzimática em placa das enzimas purificadas em meio ágar suplementado com ésteres de pNP de diferentes comprimentos de cadeia de carbono. Foi aplicado 10 μ L da enzima Lip4 e das mutantes Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C} em meio ágar pH 8 com substratos de cadeia de 4, 8 e 16 carbonos. **(A)** Visualização do halo de hidrólise formado nos meios testados acima mencionados. Pode-se observar uma melhor atividade no substrato pNPC8. **(B)** Fórmula estrutural dos substratos utilizados posicionados abaixo dos meios testados.

4.1.9.2 Curva de calibração

A partir desses ensaios em placa, foi selecionado o éster octanoato de p-nitrofenila para testes espectrofotométricos com a enzima Lip4. Uma curva de calibração para o p-nitrofenol (pNP) foi realizada a fim de obter o cálculo da subtração do efeito da hidrólise não enzimática dos substratos (FIGURA 43). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol de p-nitrofenol produzido por minuto. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A equação obtida foi $f(x) = 117447x - 178,03$.

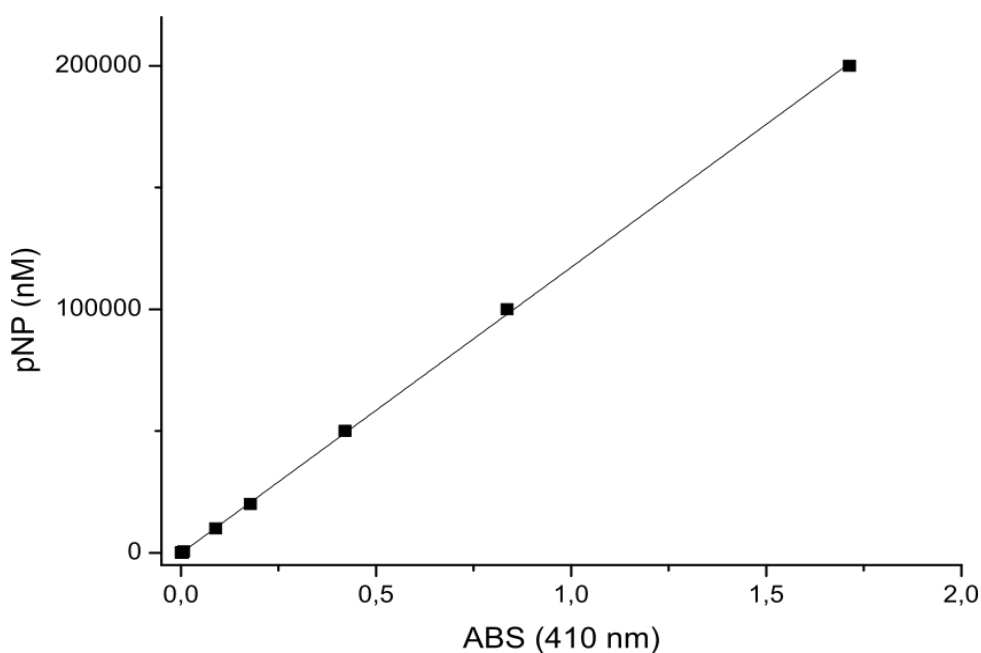


FIGURA 43 – Curva de Calibração da Absorbância em relação a concentração de pNP. Curva padrão utilizada para calcular a concentração do produto p-nitrofenol (pNP) formado durante a reação enzimática. O R quadrático da reta foi de 0,999.

4.1.9.3 Determinação da melhor concentração da enzima Lip4

Para tentar determinar a $V_{\text{máx}}$ da reação, a melhor concentração de enzima Lip4 foi previamente determinada por meio de testes utilizando uma variação na concentração de proteína no tampão reacional. Os valores variaram de 10 a 80 nM de proteína, usando 500 mM de pNPC8.

O gráfico de atividade mostra uma relação direta da velocidade com a concentração de enzima (FIGURA 44-A) e a atividade específica é levemente menor em concentrações inferiores a 50nM de proteína (FIGURA 44-B), como a enzima é

muito rápida e ocorre um consumo rápido do substrato, altas concentrações de enzima são inviáveis, já em baixa concentração de enzima, é difícil medir a formação do substrato, por limitação da técnica, por este motivo foi selecionada a concentração de 40 nM para os próximos experimentos de atividade enzimática nesta concentração de enzima podemos monitorar a formação de produto por pelo menos 7 minutos, fornecendo portanto, vários pontos para o cálculo da velocidade específica do que as demais testadas.

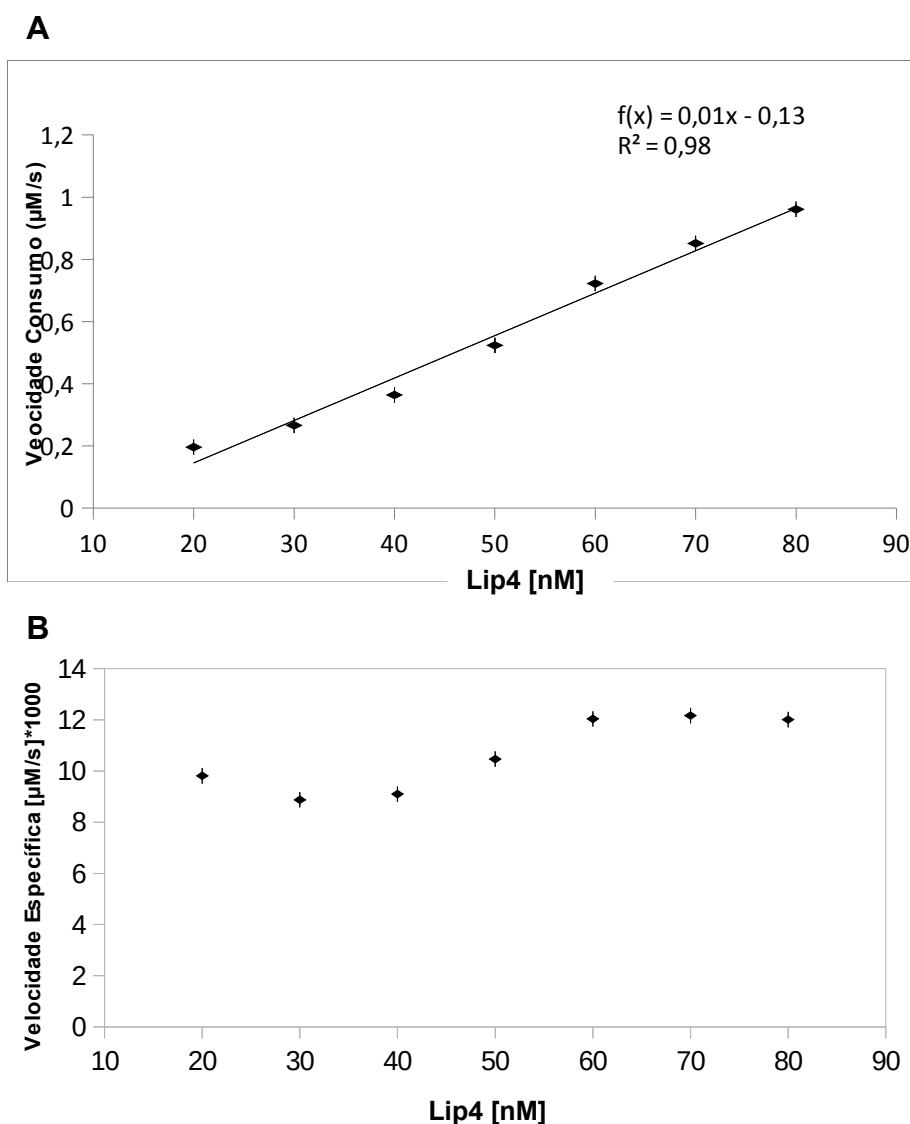


FIGURA 44 – Efeito da concentração da enzima Lip4 na velocidade da reação. **(A)** Velocidade de consumo de substrato calculada com base na concentração da enzima Lip4. **(B)** Atividade específica da enzima.

4.1.9.4 Efeito de diferentes valores de pH sobre a atividade de Lip4

O melhor pH de atividade foi testado em soluções tamponadas com valores de pH variando de 6,5 a 10,5 (FIGURA 45). A enzima foi mais ativa em pH 8,5. A velocidade de diminuição da atividade foi maior em pH ácidos, enquanto que em pH básicos, a inativação da enzima ocorreu de forma mais lenta, o que corroborou com os testes em placa, no qual os maiores halos foram visualizados em pH alcalinos. Essa característica da Lip4 em atuar melhor em altos valores de pHs, sugere uma tendência alcalofílica.

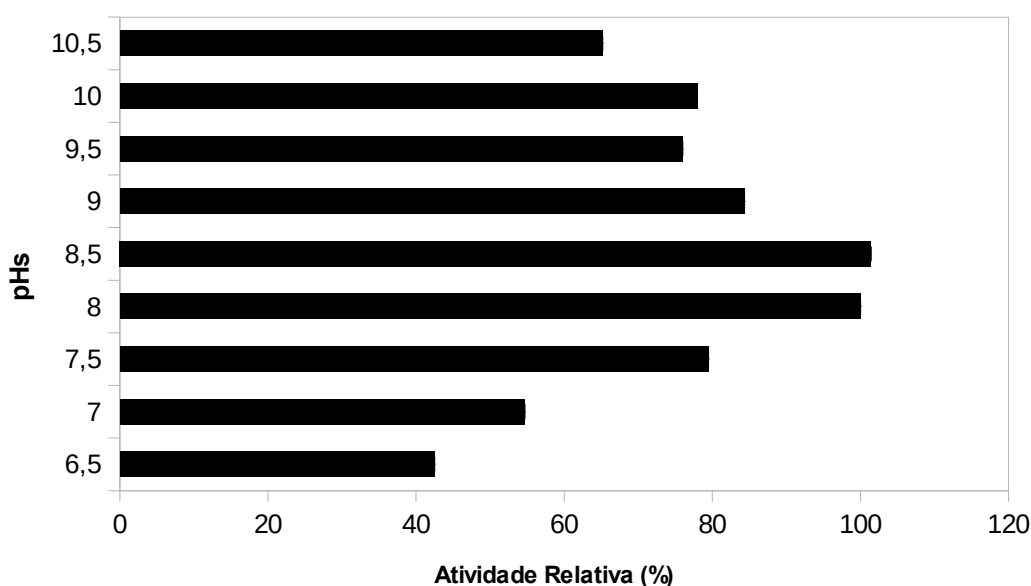


FIGURA 45 – Determinação do pH ótimo da reação enzimática.

A enzima Lip4 foi incubada em tampões com diferentes valores de pH. A atividade relativa foi determinada usando como base de referência o tampão com pH 8 (100% de atividade).

4.1.9.5 Avaliação da atividade enzimática em diferentes concentrações de íons metálicos

A atividade enzimática foi avaliada adicionando ao tampão reacional íons metálicos nas concentrações de 1 e 5 mM, usando 500 mM pNP octanoato como substrato e 40 nM de enzima a 30 °C durante 30 minutos, mas a atividade foi medida até 10 minutos. Em ambas condições, não foi detectado aumento efetivo da atividade de Lip4 na presença dos cátions. O efeito mais drástico, foi na presença do íon Zn^{2+} , que reduziu em 50% a atividade quando na concentração de 1 mM e para um terço, quando em 5 mM (TABELA 12).

TABELA 12 – Efeito dos íons metálicos sobre a atividade enzimática

ÍONS*	Atividade Relativa (%)	
	1mM	5mM
CaCl ₂	90 ± 0,02	90 ± 0,007
CoCl ₂	100 ± 0,002	107 ± 0,01
MgCl ₂	79 ± 0,01	80 ± 0,01
NiCl ₂	88 ± 0,01	86 ± 0,01
ZnCl ₂	54 ± 0,003	33 ± 0,001

*Atividade relativa calculada em comparação com controle, que foi realizado com mesmo tampão de atividade sem a presença de íons (100% ± 0,002). Os dados representam a média de três experimentos independentes.

4.1.9.6 Determinação do k_m e $V_{máx}$ da enzima Lip4

Com objetivo de tentar determinar as constantes K_m e $V_{máx}$ da reação enzimática, visto que por se tratar de uma esterase, existe a possibilidade de se obter uma constata de Michaelis-Menten, uma proteína reagindo com um substrato para a formação de um produto, foram testadas diferentes concentrações do substrato (80 a 600 μ M de pNPC8). O tampão reacional foi preparado em pH 8 e sem adição de nenhum íon metálico para estabilizar a atividade da enzima. A velocidade inicial foi calculada com base na concentração de 40 nM de Lip4 . Infelizmente os dados se encaixam melhor usando o Modelo de Hill do que o modelo de Michaelis-Menten, ainda não entendemos muito bem o que está ocorrendo mas temos algumas sugestões que estão discutidas a seguir. Segundo o modelo de Michaelis-Menten, o valor de K_m é 92,81 e $V_{máx}$ é 1,04, com $R^2= 0,955$, e segundo o modelo de Hill, K_m é 68,55 e $V_{máx}$ é 0,86, com $R^2= 0,994$ (FIGURA 46).

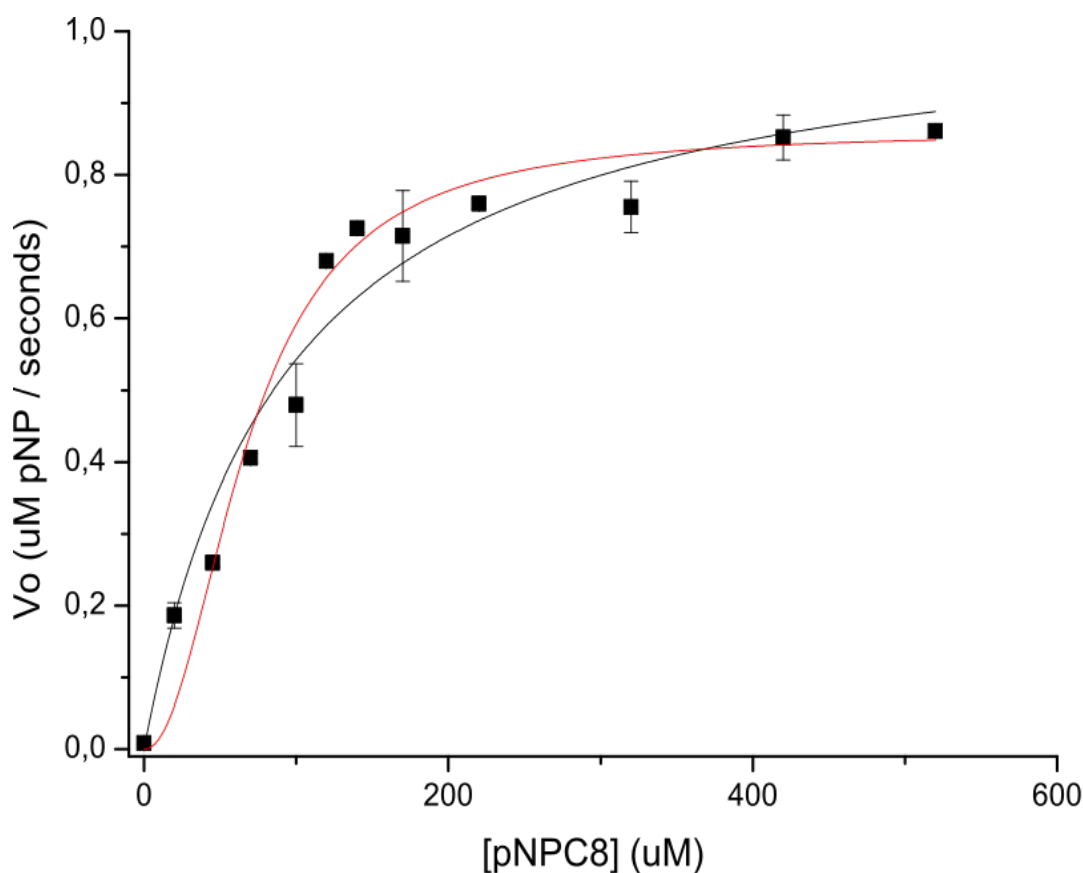


FIGURA 46 – Gráfico da cinética enzimática para os cálculos dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) de Lip4. Gráfico mostra resultados obtidos na tentativa de determinar as constantes enzimáticas do aparente K_m e $V_{máx}$. A curva de Michaelis-Menten está representada em preto e a curva de Hill em vermelho.

4.2 Determinação estrutural da esterase Lip4 por Cristalografia e Difração de Raio-X

4.2.1 Cristalização e determinação da estrutura tridimensional

4.2.1.1 Ensaios de cristalização

A proteína Lip4 purificada foi submetida testes de cristalização utilizando *kits* comerciais da empresa Hampton Research. A formação de alguns cristais pode ser visualizada após 21 dias na **condição 30** do *Kit* Index I (0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 0,1 M NaCl, e 1,5 M Sulfato de Amônio) e na **condição 75** do *Kit* Index II (0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 0,2 M Sulfato de Lítio Monohidratado e 25% p/v PEG 3350). Na FIGURA 47 pode-se observar os cristais inicialmente obtidos.

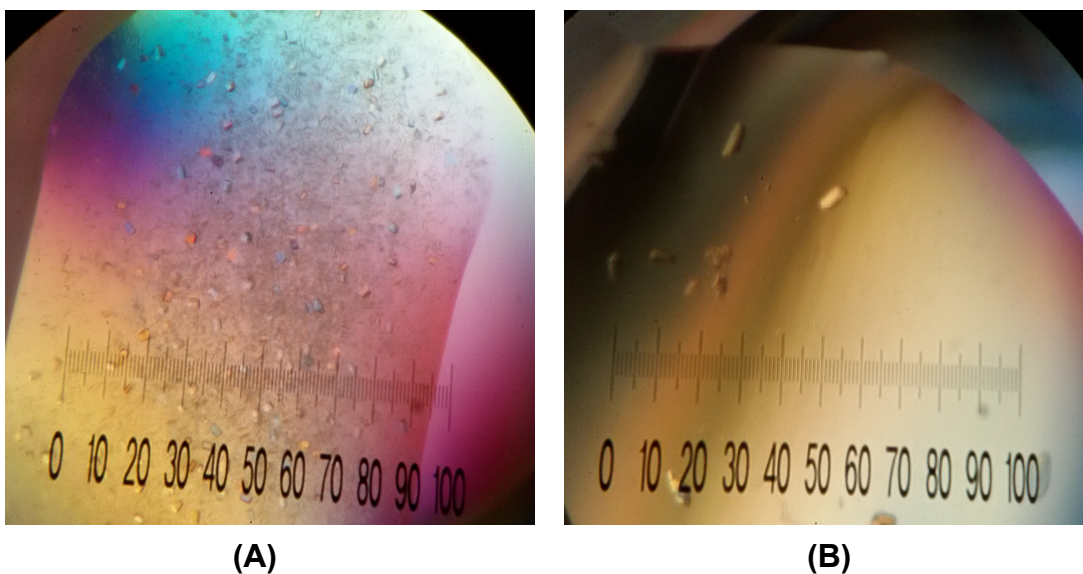


FIGURA 47 – Os primeiros cristais obtidos de Lip4.
(A) Cristais obtidos na condição 0,1 M Bis-Tris pH 6,5; 0,1 M NaCl; 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
(B) Cristais obtidos na condição 0,1 M Bis-Tris pH 6,5; 0,2 M $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 25% p/v PEG3350

A condição 30 permitiu a obtenção de cristais de tamanho pequeno com presença de muito precipitado, já os cristais visualizados na condição 75 apresentavam-se como *twinned*.

Para detectar um melhor resultado de cristalização, as condições promissoras foram otimizadas variando dos seus componentes, onde o tampão Bis-Tris foi modificado entre os valores de pH 6,1 – 7,1 e os precipitantes foram utilizados na concentração de Sulfato de Amônio (1 M; 1,3 M; 1,5 M e 2 M) e PEG 33350 (21 %; 23 %; 25 % e 27 %), permanecendo a concentração de sal inalterada.

4.2.1.2 Estratégias para derivatização dos cristais da proteína Lip4

A fim de determinar a estrutura 3D da enzima Lip4 foram realizadas três diferentes tentativas para obtenção os cristais, utilizando as condições otimizadas:

- a. *Microseeding*;
- b. Co-cristalização com substrato tributirina na concentração 4 mM, misturado à solução protéica antes da cristalização;
- c. Selênio-Metionina, na qual a enzima Lip4 foi expressa com substituição dos resíduos de metionina por selênio-metionina, utilizando essa metodologia no caso da

substituição molecular não funcionar, assim poderíamos determinar as fases experimentalmente por SAD ou MAD.

A melhor condição de cristalização obtida foi em 0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 0,1 M NaCl, e 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, na presença de 4 mM de substrato tributirina. Esse refinamento permitiu a visualização de cristais formados (FIGURA 48-A). Os cristais foram coletados e submetidos à difração de raio-X no anôdo rotatório “MicroMax-007HF” (Rigaku), do Instituto de Química-USP, e as imagens foram capturadas por 30 segundos. A melhor resolução obtida foi de 2.3 Å (FIGURA 48-B).

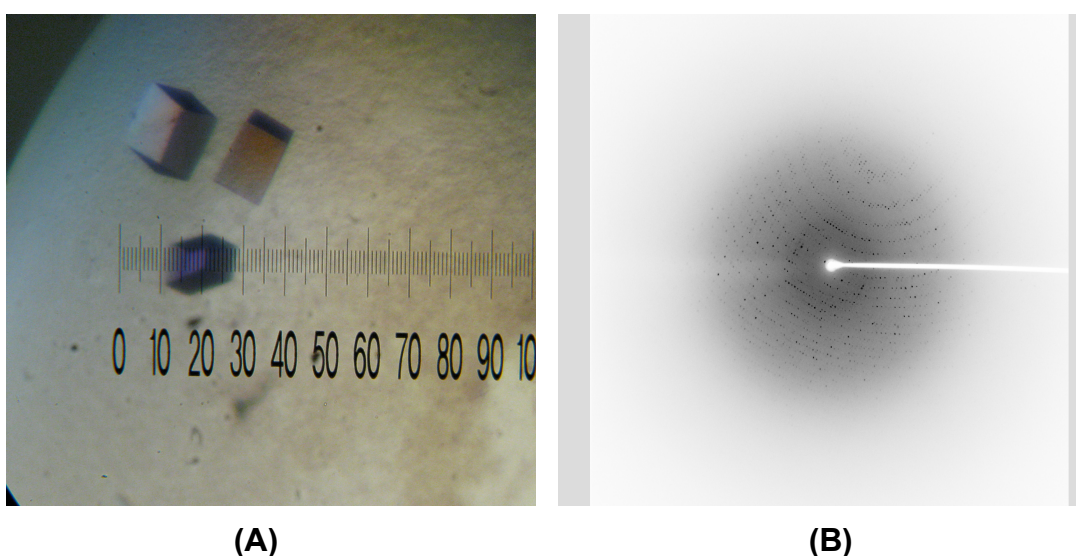


FIGURA 48 – Imagem do cristal de Lip4 obtidos pela co-cristalização com 4 mM de Tributirina. A condição na qual foi obtido o cristal 0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 0,1 M NaCl, e 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **(A)** Visualização dos cristais obtidos. **(B)** Padrão de difração de raio-X do cristal coletado

A proteína Lip4 marcada com Sel-Met foi expressa e induzida (FIGURA 49), e mais uma etapa de purificação por meio de Gel-filtração Analítica Superdex 75 foi adicionada em comparação com a proteína nativa, no entanto, até o momento, ainda não foram obtidos cristais.

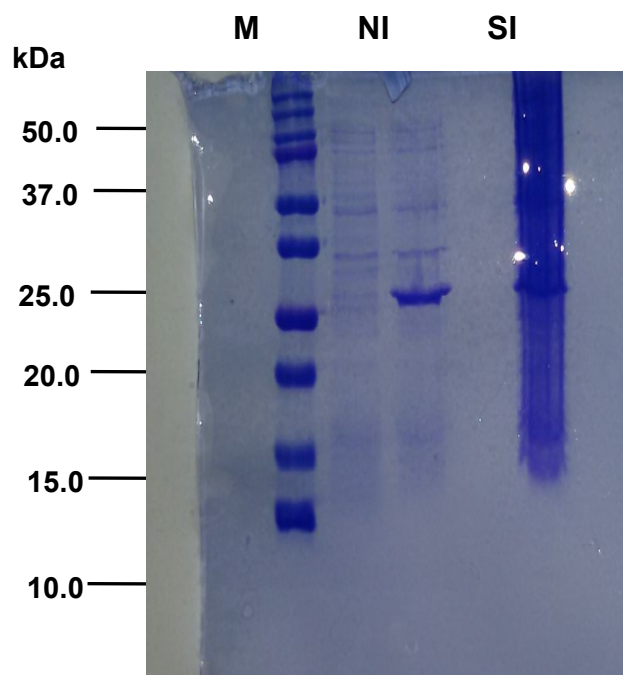


FIGURA 49 - Gel SDS-PAGE 12% da Lip4 induzida com Selênio-metionina. **M.** Precision Plus Protein Dual Color *Ladder* (BioRad). **NI.** Não-Induzida. **SI.** Sobrenadante Induzido.

4.2.1.3 Coleta e processamento dos dados de difração de raio-X

O conjunto de dados coletado foi processado usando o programa Mosfilm do pacote CCP4i (Projeto Computacional Colaborativo, 1994) e a estatística do processamento dos dados está mostrada na tabela a seguir (TABELA 13). Lip4 cristalizou no grupo espacial primitivo ortorrômbico $P2_12_12_1$, no qual foram encontradas 4 moléculas na unidade assimétrica.

TABELA 13 - Processamento dos dados de difração de raios-X de Lip4 com tributirina.

Parâmetros da Célula Unitária	Lip4 com Tributirina
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros da Célula Unitária	
a(Å)	71.850
b(Å)	106.171
c(Å)	146.135
Resolução (Å) ¹	30-2.30 (2.38-2.30)
Nº de reflexões observadas	296.448
Nº de reflexões únicas	50.655
i/sigma ¹	13.4 (2.3)
Completeza (%) ¹	99.9 (100)
Multiplicidade ¹	5.7 (5.9)
R _{meas} (%) ¹ R _{pin} (%) ¹	10.7 (90.6), 4.3 (36.9)
CC½ da última camada	0.768
Nº de imagens	321 (0.5 graus/imagem)
Comprimento de onda (Å)	1.54

¹Os valores em parênteses se referem a resolução da última camada.

$$R_{\text{merge}} = (S |I - \langle I \rangle|) / (I)$$

4.2.1.4 Refinamento dos dados e obtenção da estrutura tridimensional

As fases iniciais foram geradas usando o programa PHASER e o modelo com 29% de identidade (FIGURA 50), descrita como sendo uma β-cetoadipato enol-lactonase de *Burkholderia xenovorans* LB400 (PDBID: 2XUA). Com base no mapa gerado, o programa ARP/wARP (PERRAKIS et al., 1999) melhorou o modelo original e conseqüentemente melhorou a qualidade do mapa. .

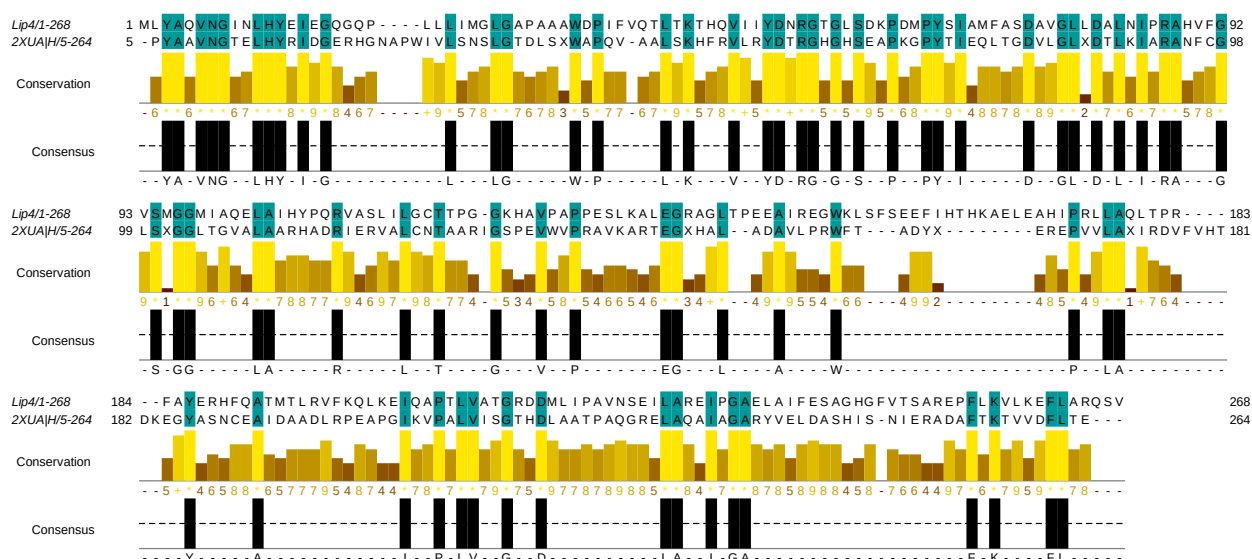


FIGURA 50 – Alinhamento da Lip4 com o modelo PcaD (PDBID: 2XUA) usado na substituição molecular. Em destaque estão as regiões consenso entre as duas seqüências de proteína. Figura gerada pelo Jalview 2.8.2 (WATERHOUSE et al., 2009)

O modelo foi refinado manualmente por meio da interface gráfica COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004) e pelo programa REFMAC5 do pacote do CCP4, e os valores atuais de R_{factor} e R_{free} são 0,21 e 0,28, respectivamente. A estrutura foi checada por correção estereoquímica usando o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993). O Ramachandran plot (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968) mostrou que de todos os 852 resíduos não-prolina e não glicina, 91,8% estão localizados em regiões mais favorecidas, 7,3% estão em regiões adicionalmente favoráveis, 0,6% estão em regiões generosamente permitidas e 0,4%, ou seja, três aminoácidos estão em regiões atribuídas como não favoráveis (FIGURA 51).

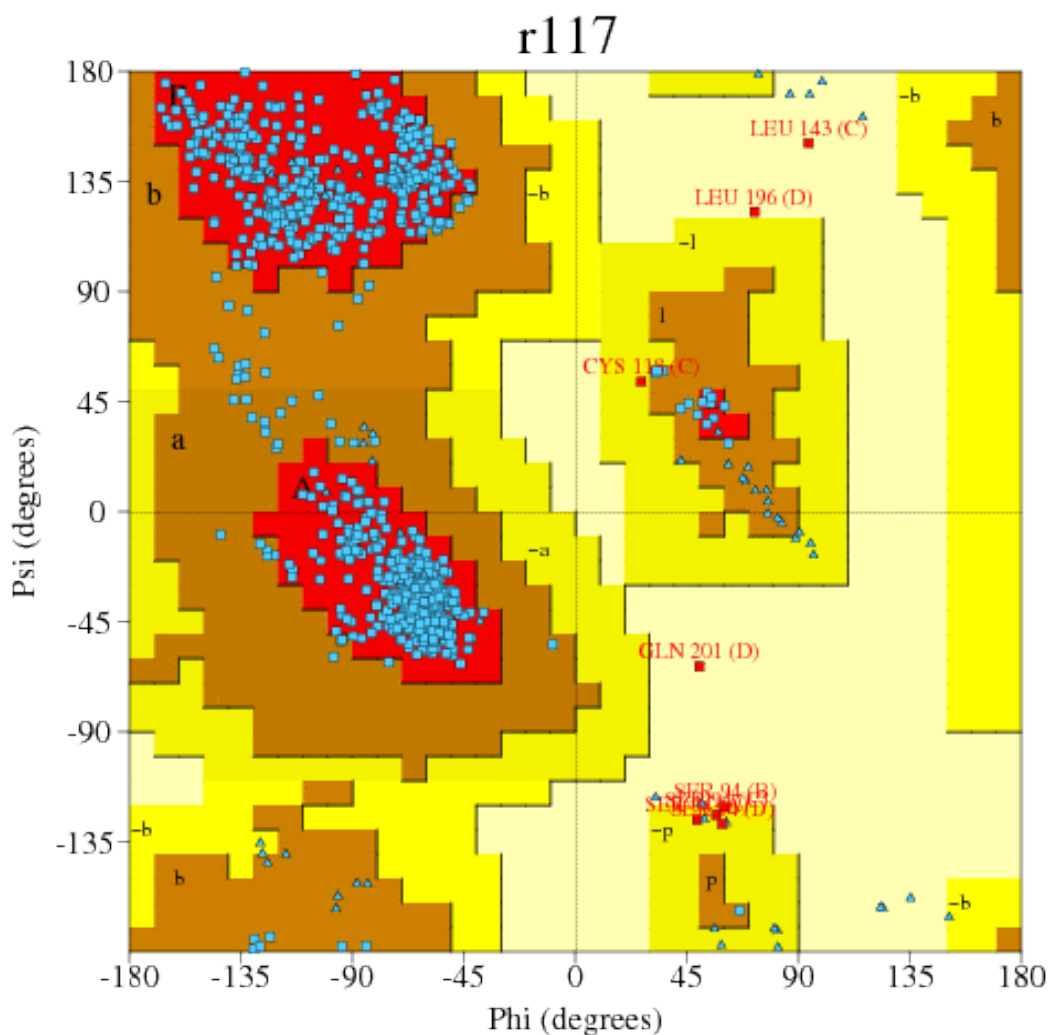


FIGURA 51 – Ramachandran plot da estrutura da enzima Lip4. A maioria dos resíduos da estrutura de Lip4, 91,8%, estão localizados em regiões mais favorecidas, sendo 7,3% estão em regiões adicionalmente favoráveis.

Há 4 moléculas de Lip4 na unidade assimétrica, segundo o programa de análise de modelos de interface PISA do pacote do CCP4 (FIGURA 52) sendo a interface enterrada entre as cadeias é inferior a $623,8 \text{ \AA}^2$, o que corresponde ao valor de complexação significativa (*complexation significance score* – CSS) de zero, sugerindo que Lip4 apesar das quatro moléculas na unidade assimétrica, apresentase como um monômero. Com o objetivo de comprovar que a enzima Lip4 se encontra na forma monomérica, foi realizada uma eluição da proteína usando uma coluna de exclusão por tamanho (Superdex 75). Os resultados obtidos demonstram que a proteína possui um volume de eluição de 16,5 mL, que corresponde a uma

massa molecular de 26 kDa, condizente com a forma monomérica (massa molecular teórica de 29.9 kDa) (FIGURA 53).

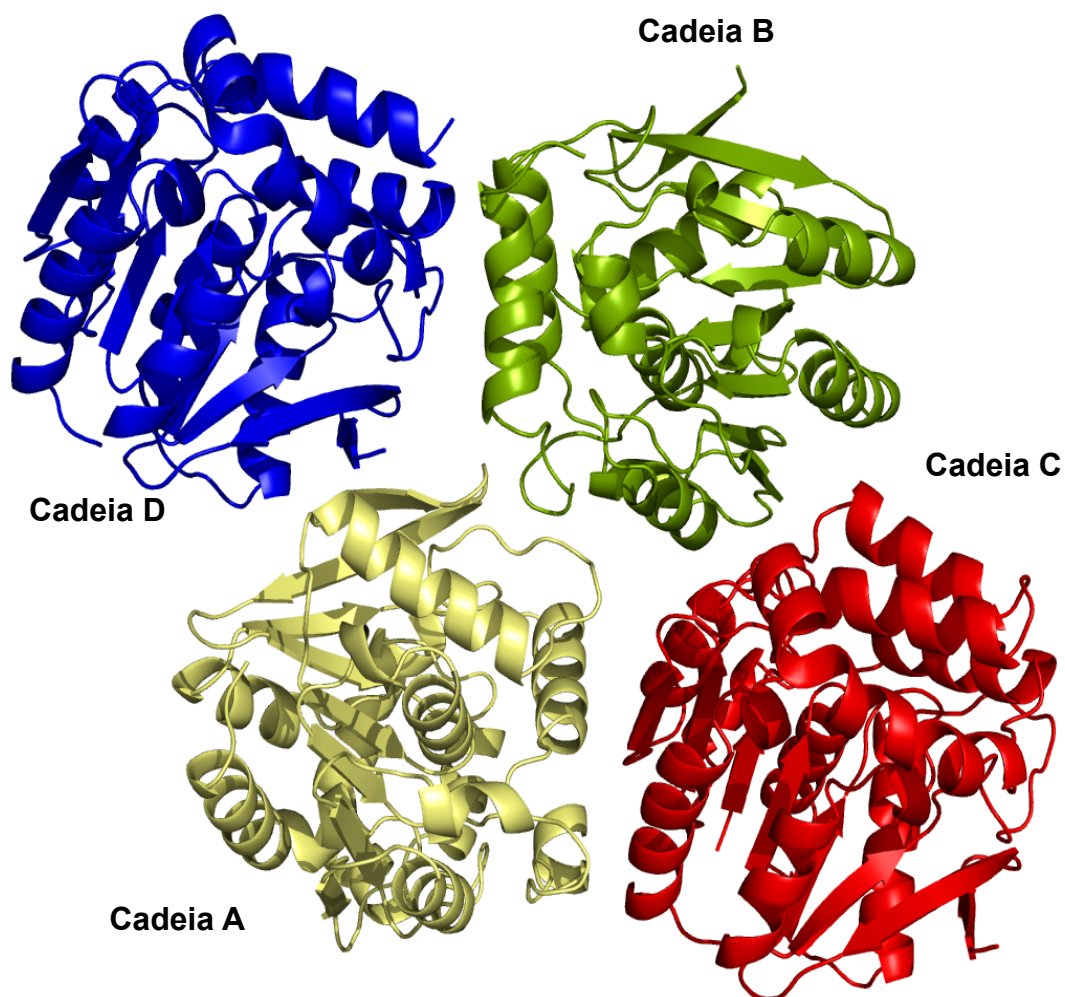


FIGURA 52 – Enzima Lip4 mostrando as quatro moléculas presentes na unidade assimétrica. Cadeias A, B, C e D correspondem as moléculas individuais da enzima. Figura gerada pelo programa Pymol (DELANO, 2002).

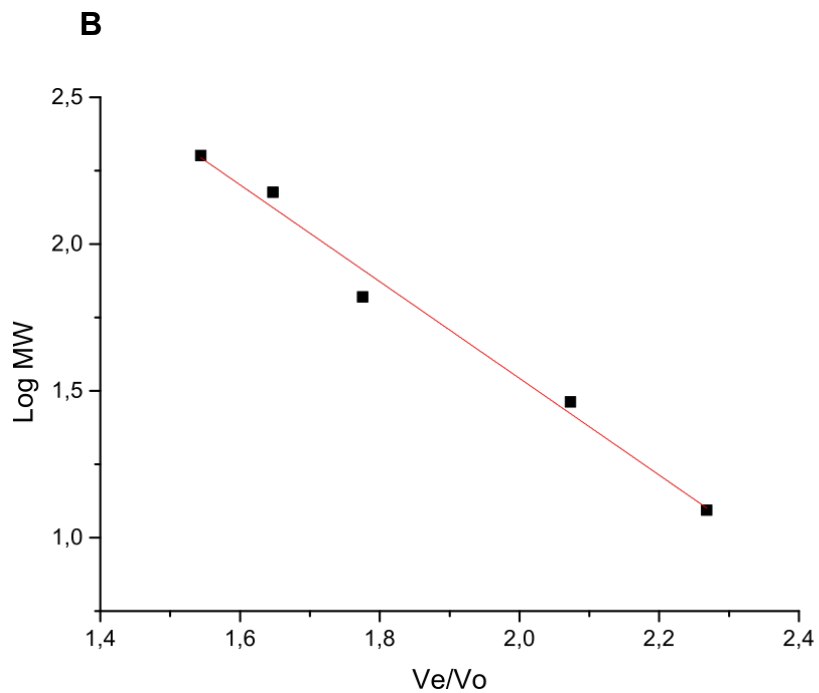
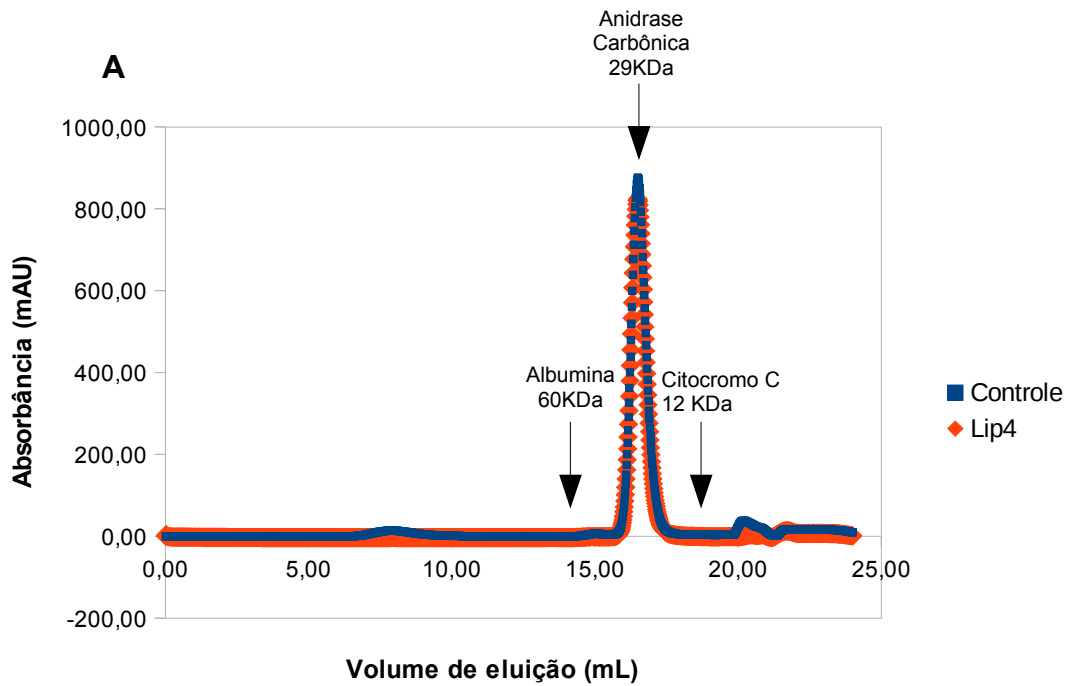


FIGURA 53 – Eluição da enzima Lip4 na coluna de Gel Filtração Superdex 75. **(A)** Cromatograma da eluição da Lip4 após aplicação da amostra com os controles usados para calcular massa molar (MM). **(B)** Gráfico da curva padrão das massas moleculares em relação ao volume de eluição das amostras (V_e/V_o). A equação da reta utilizada para os cálculos foi $f(x) = -1,64x + 4,83$, com $R^2 = 0,98$.

4.2.1.5 Análise estrutural da enzima Lip4

A estrutura da Lip4 apresentou uma homologia estrutural com a família das α/β hidrolases, por apresentar uma disposição de estrutura conservada composta por 8 fitas- β paralelas circundadas por 12 α -hélices, sendo apenas a fita β_2 , a única disposta antiparalelamente as demais fitas- β (FIGURA 54).

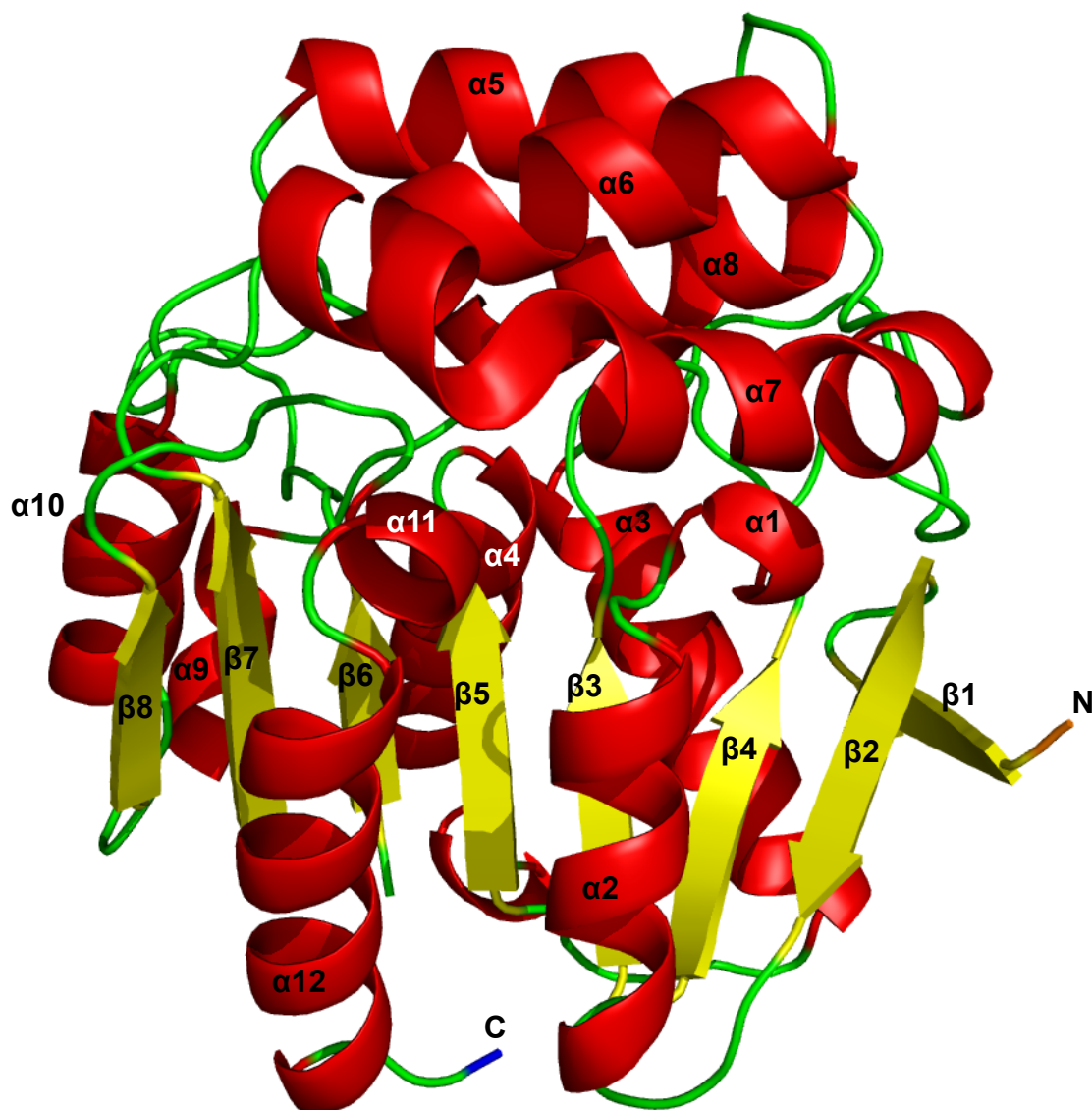


FIGURA 54 – Representação esquemática da estrutura secundária da enzima Lip4 mostrando a estrutura conservada da família das α/β hidrolases. As α -hélices (vermelho) intercalando com as fitas- β (amarelo). Em destaque pode-se visualizar o resíduo C-terminal (azul) e N-terminal (laranja). Figura produzida pelo PyMol (DELANO, 2002).

A estrutura secundária da enzima Lip4 tem o arranjo composto por três fitas- β (β 1, β 2 e β 3), seguidas por duas hélices (α 1 e α 2) e uma disposição de $\alpha/\beta/\alpha$ intercaladas (β 4, α 3, β 5, α 4 e β 6), onde está localizado na alça que une a fita- β 5 e a α 4, o motivo conservado Gly-X-Ser-X-Gly, no qual se posiciona o resíduo nucleofílico Ser⁹⁴ (FIGURA 55 e 56). Após essa região é observado um conjunto composto por cinco α -hélices (α 5, α 6, α 7, α 8 e α 9) que se designa como a região de domínio CAP, região a qual permite a entrada e saída do substrato no sítio ativo da enzima. E por último estão as fitas β 7, onde se encontra o resíduo ácido catalítico da tríade (Asp²¹⁷), a α 10, a β 8, no qual se localiza o aminoácido His²⁴⁵ conservado, e as hélices α 11 e α 12.

Por meio da interface gráfica mostrando a nuvem de densidade eletrônica, é possível observar os resíduos que compõem a tríade catalítica, Ser⁹⁴-Asp²¹⁷-His²⁴⁵ (FIGURA 57). Até o momento não foi observada nenhuma densidade eletrônica próxima ao sítio ativo de nenhuma das 4 moléculas presentes na unidade assimétrica, o que se pode inferir que a enzima Lip4 provavelmente não co-cristalizou com o produto ou com o substrato, apesar do substrato e o produto estarem presentes na solução de cristalização, eles não estão ligados a proteína de forma estável.

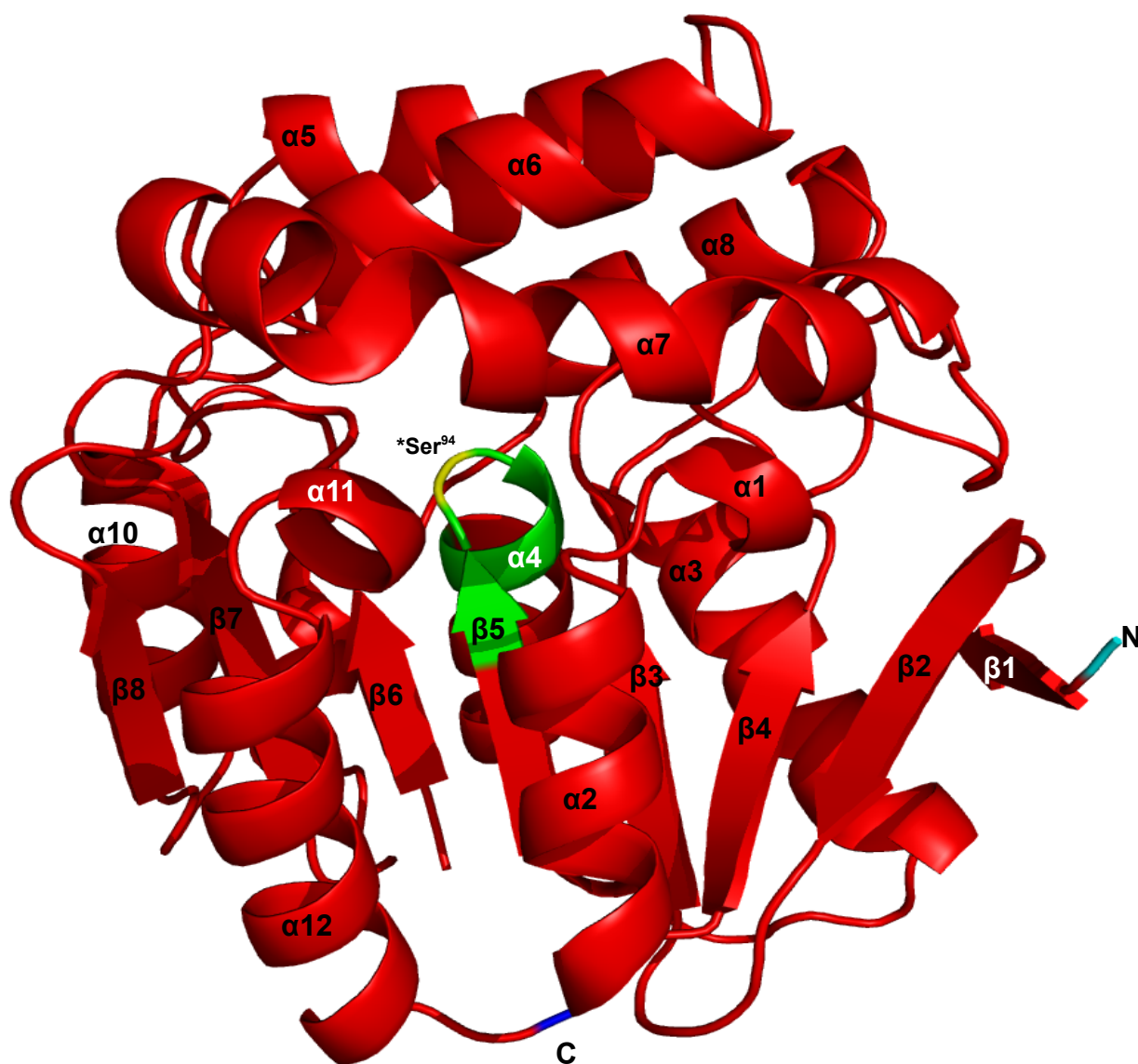


FIGURA 55 – Representação esquemática da estrutura da Lip4 destacando o motivo conservado Gly-X-Ser-X-Gly. Em destaque pode-se observar a alça, entre as $\beta 5$ e a $\alpha 4$, onde está localizada a região nucleofílica. A posição do resíduo de Ser⁹⁴ está destacado em amarelo. Figura produzida pelo PyMol (DELANO, 2002).

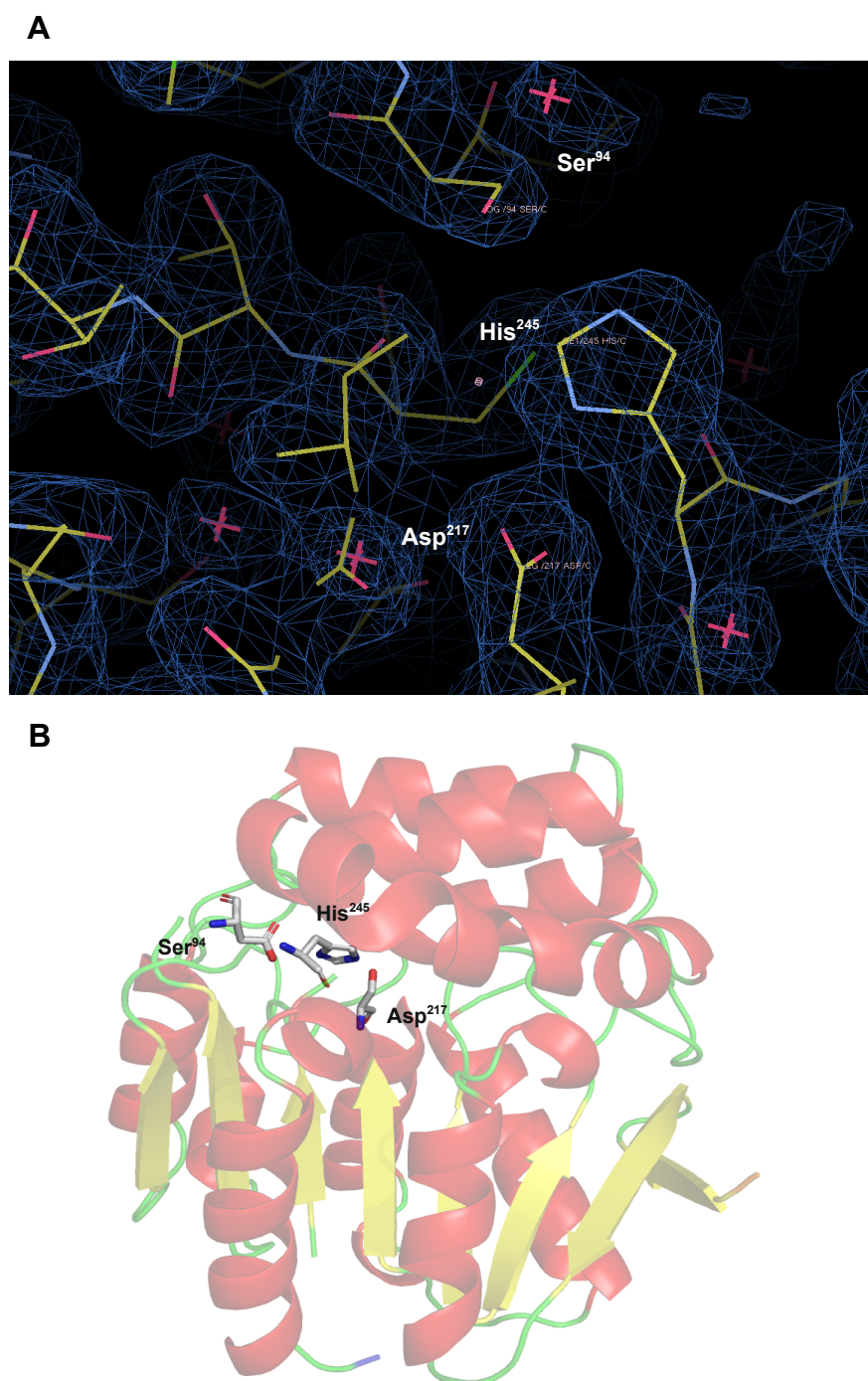


FIGURA 56 – Esquema representativo da tríade catalítica Ser⁹⁴- Asp²¹⁷- His²⁴⁵.

(A) Mapa da nuvem de densidade eletrônica, mostrando que não há presença de ligante no sítio ativo (Figura obtida pela interface COOT usando nível de mapa de 1/Å³). **(B)** Posição da tríade catalítica na estrutura da Lip4, Ser⁹⁴- Asp²¹⁷- His²⁴⁵. A imagem está na mesma conformação que a apresentada na FIGURA 53 (Figura produzida pelo PyMol).

O domínio CAP, formado pelas α 5- α 8, que atua como uma tampa, está posicionada acima do domínio α/β hidrolase e é conhecida por proteger a serina supostamente ativa numa porção hidrofóbica dentro da molécula (FIGURA 56 e 58). A flexibilidade desta tampa, possibilita a entrada do substrato no sítio ativo e liberação do produto formado (FIGURA 57).

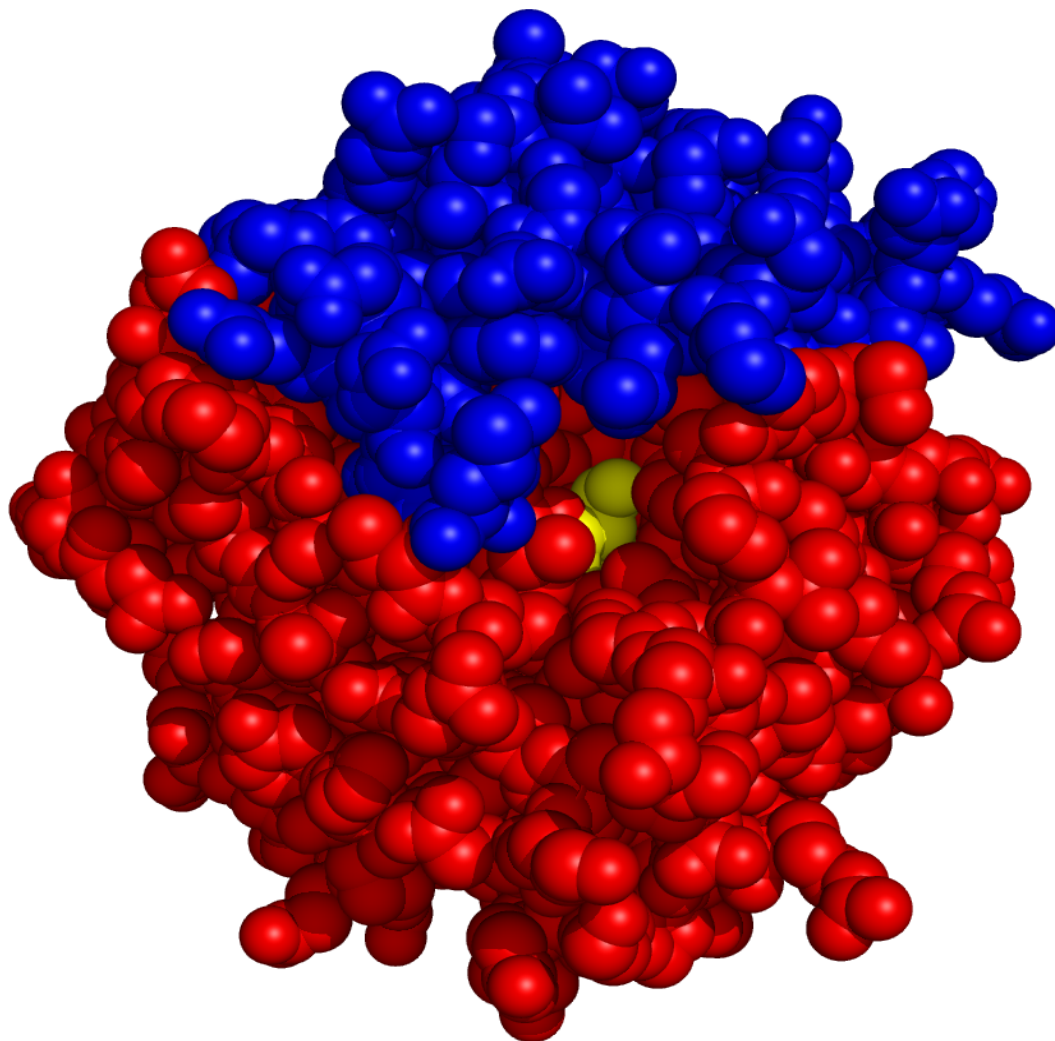


FIGURA 57 – Representação esquemática do Domínio CAP da molécula Lip4. A presença do domínio CAP (azul) pode ser visualizado acima do domínio α/β hidrolase (vermelho), nesta figura. A Ser⁹⁴ (amarela) está protegida na porção hidrofóbica no sítio ativo da enzima. (Figura produzida pelo PyMol).

O sítio ativo, formado pelos resíduos da tríade catalítica, Ser⁹⁴- Asp²¹⁷- His²⁴⁵, estão fazendo uma rede de interações de hidrogênio (FIGURA 58). A medida da distância entre o grupo hidroxil da Ser⁹⁴ e N^{δ2} do anel imidazólico da His²⁴⁵ é 3,22 Å, enquanto que as distâncias entre O¹ e O² do grupo carboxila da cadeia lateral do Asp²¹⁷ ao N^{δ1} da His²⁴⁵ é 2,87 e 3,76 Å, respectivamente. O mecanismo de catálise entre os resíduos que compõem o sítio catalítico, está descrito detalhadamente no item 1.5.1, FIGURA 12.

Como esperado, as regiões que exibem um valor de fator-B alto, são as partes mais flexíveis da molécula, como as regiões de alça ou os resíduos de superfície. A flexibilidade do domínio CAP pode ser percebido na FIGURA 59, onde os resíduos móveis da enzima Lip4 estão em grande parte localizados nessa região. A ausência de ligante na cristalização da proteína não possibilitou saber se a tampa está na conformação aberta ou fechada, porém uma sobreposição entre a enzima Lip4 e a cadeia A do modelo PcaD (PDBID: 2XUA) que foi cristalizada com ligante preso a enzima, permitiu observar diferenças significativas de posicionamento entre os resíduos que compõem o domínio CAP (FIGURA 60).

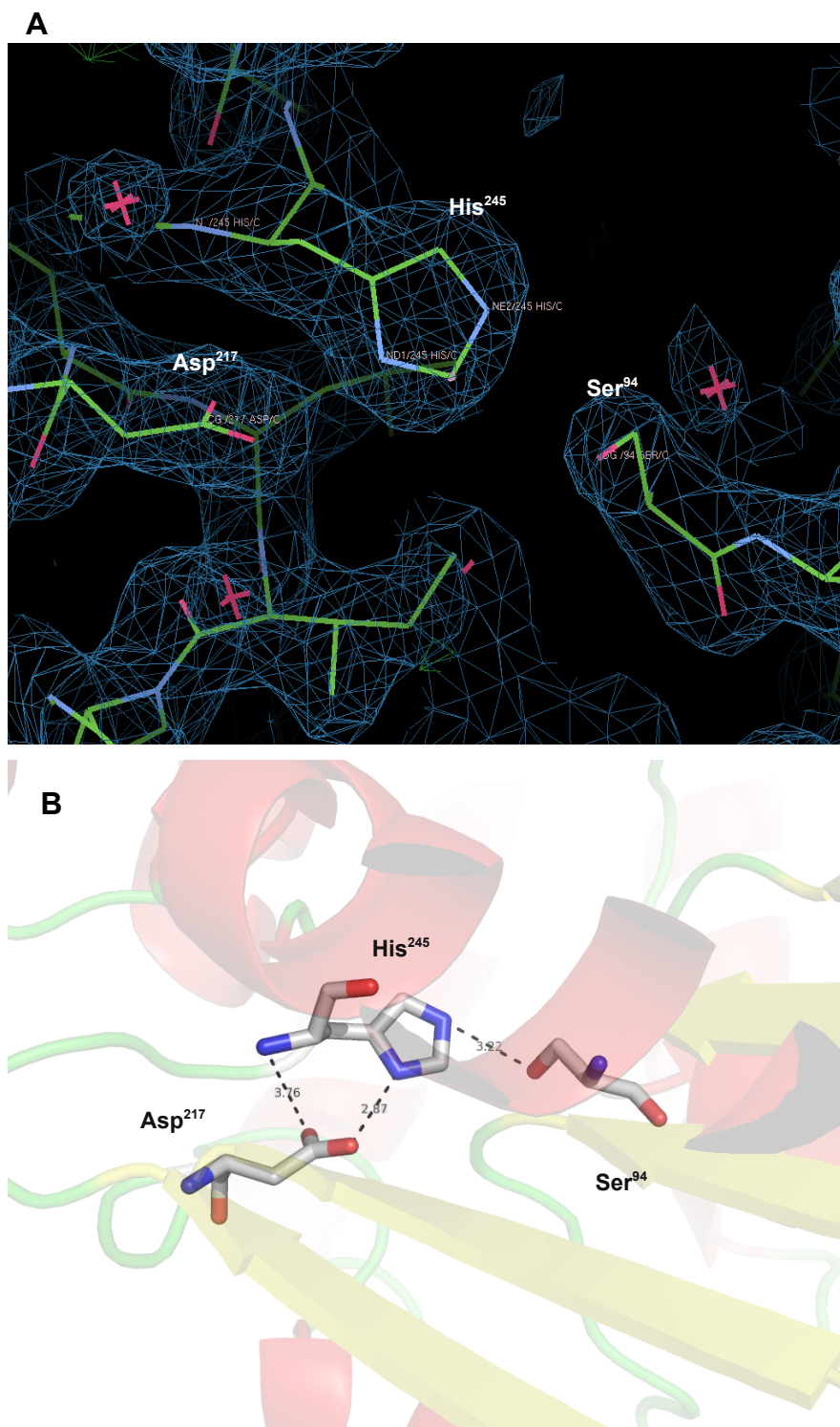


FIGURA 58 – Esquema representativo das interações de hidrogênio da tríade catalítica em Lip4.

(A) Mapa da nuvem de densidade eletrônica, mostrando a proximidade da tríade catalítica (Figura obtida pela interface COOT). **(B)** Esquema representativo das ligações entre a tríade (Figura produzida pelo PyMol).

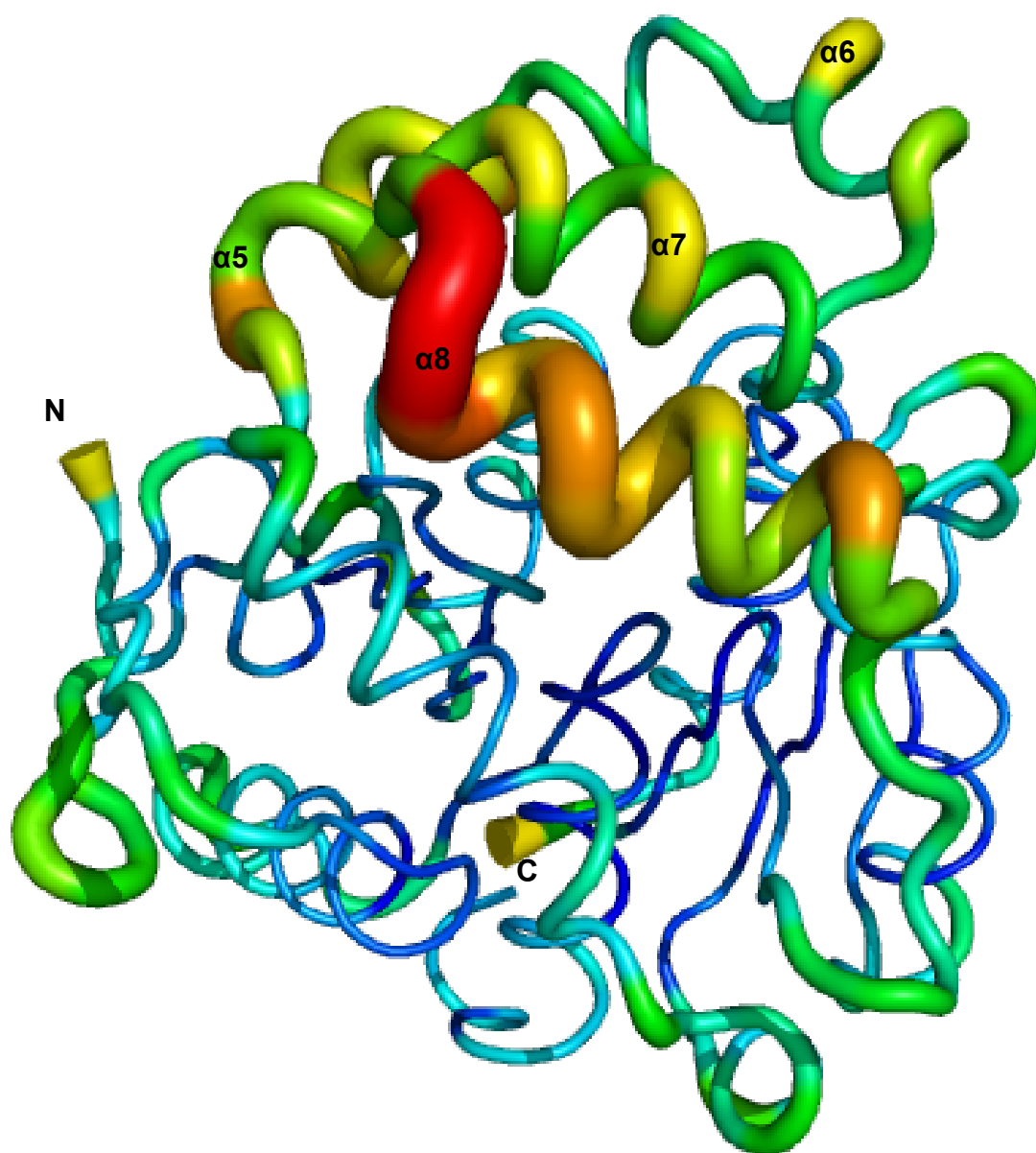


FIGURA 59 – Estrutura da Lip4 colorida segundo o valor do fator-B. Regiões coloridas em vermelho são as com valores de fator-B mais elevado e as colorida em azul com baixos valores de fator-B. Os resíduos móveis estão localizados na parte de cima da estrutura, correspondente ao domínio CAP. (Figura produzida pelo PyMol).

A sobreposição entre as duas moléculas (r.m.s.d.: 2.3 Å) permitiu inferir que a diferença de posição entre os resíduos que compõem as hélices $\alpha 5$ a $\alpha 8$, pode estar relacionada a ausência do ligante na estrutura cristalizada da Lip4. Sendo assim, a tampa que permite a entrada do substrato, não está na sua conformação aberta, diferente do que foi predito para PcaD de *B. xenovorans* LB400, pois o ligante permaneceu preso ao sítio ativo durante a formação do cristal da proteína (FIGURA 60) (BAINS et al., 2011).

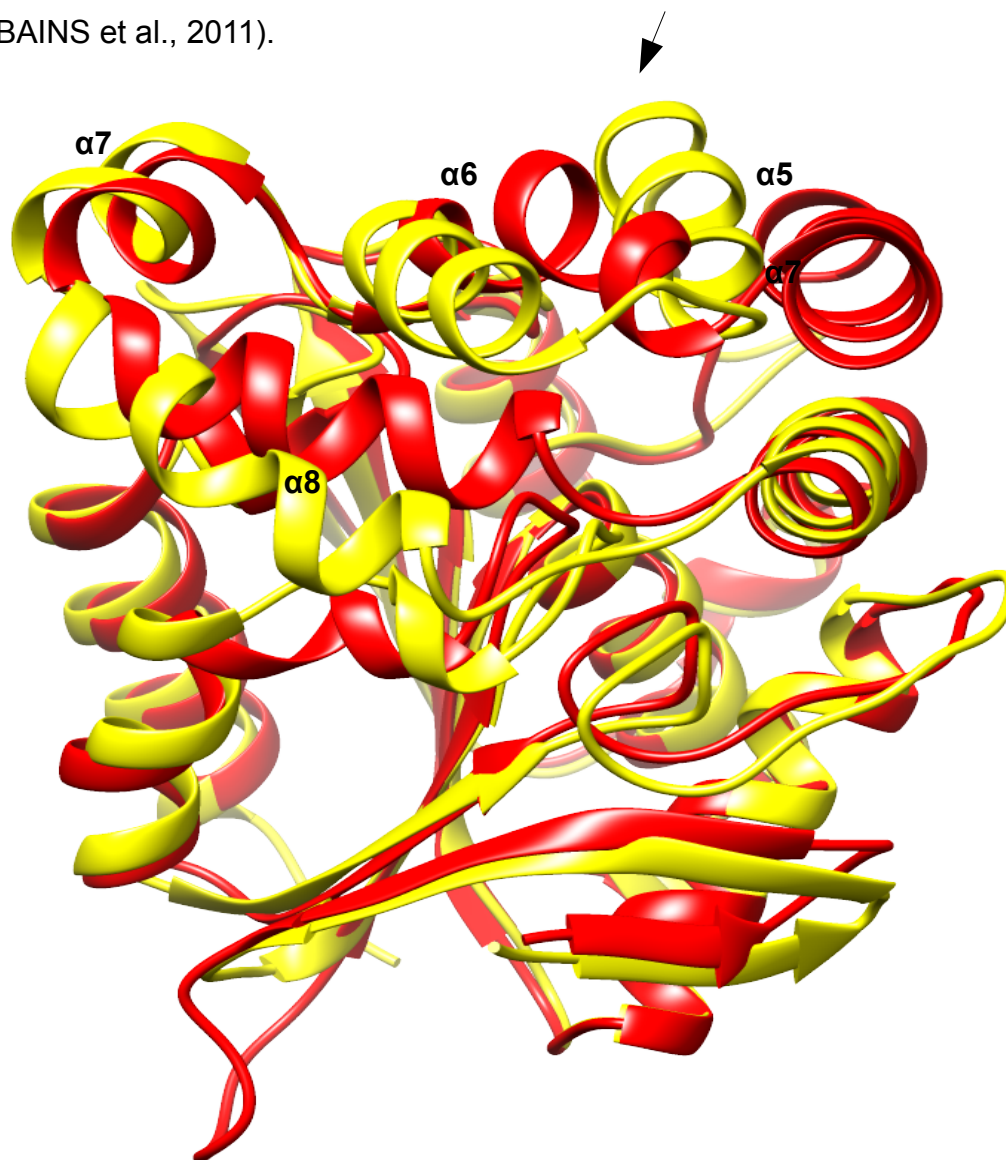


FIGURA 60 – Sobreposição estrutural da Lip4 com modelo PcaD (PDBID: 2XUA). A enzima Lip4, colorida em amarelo e a enzima modelo PcaD, colorida em vermelho se sobrepõem, exceto pelas regiões de α -hélices que formam o domínio CAP, indicado pela seta. A enzima PcaD se encontra na conformação aberta (Figura gerada pelo programa Chimera 1.10.1 (PETTERSEN et al., 2004).

4.2.2 Estudos Funcionais

4.2.2.1 Dicroísmo circular e estabilidade térmica da Lip4 e mutantes

Ensaio de dicroísmo circular sugerem que a composição de estrutura secundária entre os mutantes, Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C} e a proteína tipo selvagem Lip4 apresentaram-se praticamente a mesma (FIGURA 61). Desta forma, a mutação na serina foi capaz de abolir com a atividade enzimática da proteína sem afetar a estrutura da proteína.

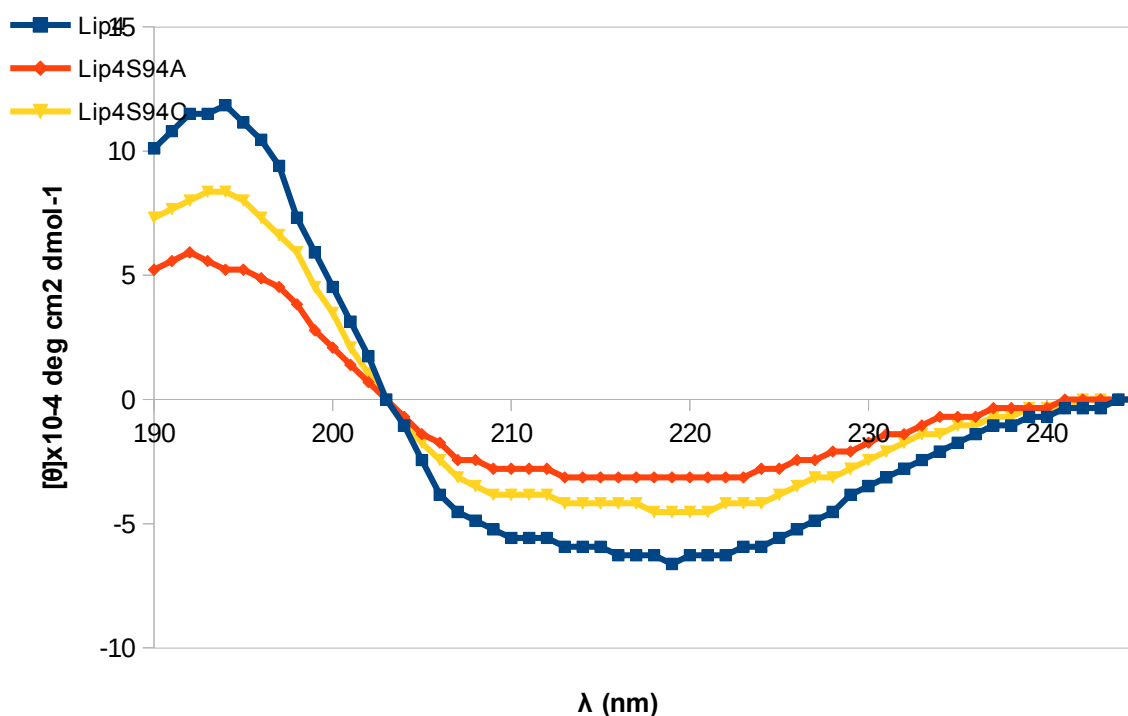


FIGURA 61 – Espectro de dicroísmo circular da Lip4 e das linhagens mutantes. A estrutura global das linhagens mutantes e da selvagem mantiveram-se próximas, indicando que a mutação sítio dirigida não causou desenovelamento protéico.

Testes de estabilidade térmica por *thermalshift* foram realizados para averiguar se a mutação causou modificação na estabilidade dos mutantes. O ensaio 1 (ANEXO 4) mostrou que o tampão de diálise é menos estável para as três linhagens em estudo. Já o ensaio 2 e 3 (ANEXOS 5 e 6) que utilizavam o tampão reacional de atividade, com diferença na ausência e presença do íon Ca^{2+} (1 mM), respectivamente, mostraram que a presença desse íon no meio, não tem efeito protetor sobre Lip4 e Lip4_{S94C}, onde ambas possuem um resíduo nucleofílico no sítio ativo, já a mutação para Alanina (Lip4_{S94A}) teve a elevação de um grau (°C)

na estabilidade da proteína (TABELA 14).

TABELA 14 – Média de temperatura (T_m) da Estabilidade térmica da enzima Lip4 e das mutantes Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C} nos 3 diferentes tampões testados*.

ENSAIO	Lip4	Lip4 _{S94A}	Lip4 _{S94C}
	Média T_m (°C)		
1	42	45	48
2	46,5	45,5	51
3	45,5	46,5	50,5

***Ensaio 1:** 10 mM Tris-HCl pH8; 10 mM NaCl e 1 mM MgCl₂; **Ensaio 2:** 50 mM Tris-HCl pH 8; 0,03% p/v Triton-X; e **Ensaio 3:** 50 mM Tris-HCl pH 8; 0,03% p/v Triton-X100; 1 mM CaCl₂.

Uma das razões encontradas para o mutante Lip4_{S94C} ter uma conformação mais estável termicamente que Lip4, pode ser pelo fato do resíduo de cisteína Cys⁹⁴ interagir com o outro resíduo de cisteína presente na cadeia polipeptídica nativa (Cys¹¹⁸). A análise da estrutura 3D da Lip4 mostrou que os dois resíduos se encontram muito próximos no dobramento da proteína, a uma distância de 2,88 Å, o que é considerado dentro de uma faixa aceitável para realização de ligações de pontes dissulfeto entre os átomos de enxofre na molécula (FIGURA 62).

Essa interação torna a molécula menos móvel, possivelmente dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, levando então a perda ou redução da sua atividade lipolítica.

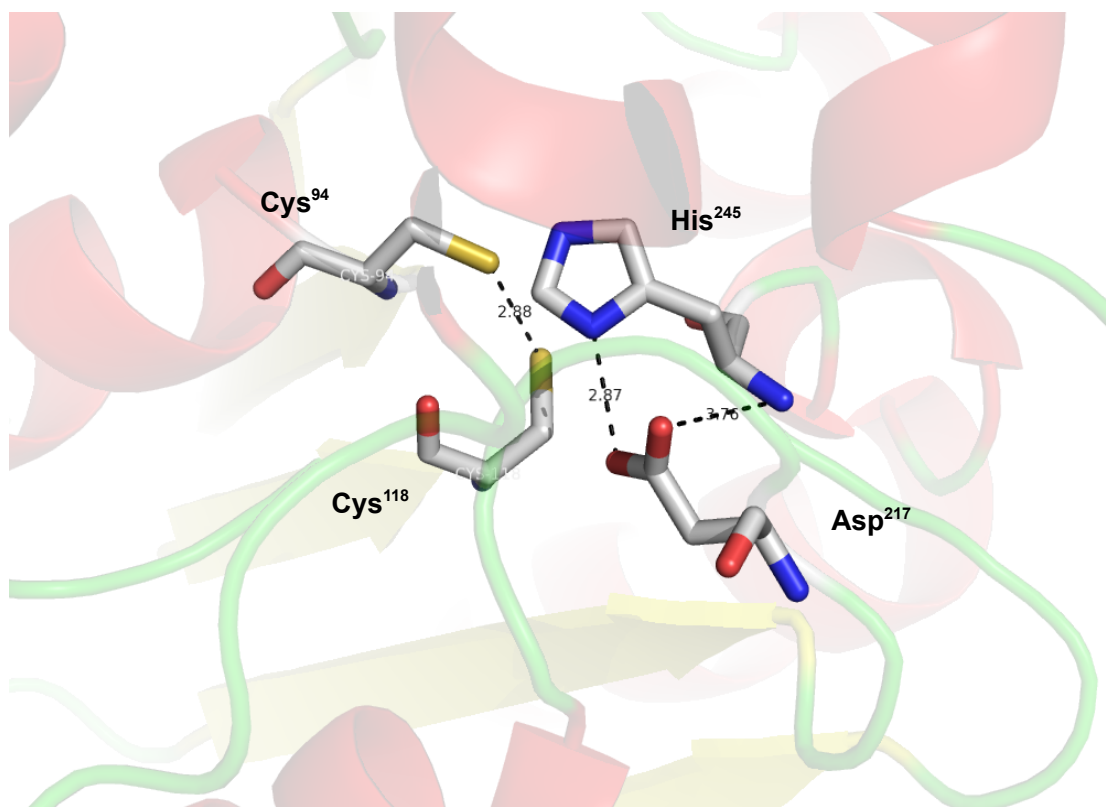


FIGURA 62 – Esquema representativo da mutagênese *in silico* mostrando a possível interação de pontes dissulfeto.

A linhagem mutante Lip4_{S94C} pode interagir formando pontes dissulfeto com outro aminoácido de Cys¹¹⁸ localizado próximo na cadeia polipeptídica (Figura produzida pelo PyMol).

5 Discussão

5.1 Construção da Sub-biblioteca, Expressão, Purificação e Caracterização da Enzima Lip4

Análises da estrutura primária da enzima Lip4 indicaram que essa enzima possui as três características essenciais para ser classificada como membro da família das α/β hidrolases: a presença de, pelo menos, cinco fitas β paralelas, a tríade catalítica na ordem, composta por Ser⁹⁴-Asp²¹⁷-His²⁴⁴, e a presença de um “loop” nucleofílico composta pelos resíduos Gly⁹²-Val⁹³-Ser⁹⁴-Met⁹⁵-Gly⁹⁶ (no topo canônico da fita β 5) que abriga a serina catalítica (FIGURA 55).

Com base em análises filogenéticas, a sequência de aminoácidos apresentada pela Lip4 pertence a família V das lipases bacterianas (FIGURA 29). Membros dessa família são conhecidos por exibir uma sequência de aminoácidos similar a várias enzimas bacterianas não-lipolíticas, mas que possuem a estrutura típica das α/β hidrolases e a tríade catalítica localizada em regiões conservadas (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Por conseguinte, a proteína com maior similaridade a Lip4, é um β -cetoacil-CoA hidrolase, que pertence a família das não-lipolíticas, hidrolases citosólicas (programa ESTER: abH 08.12), na qual estão incluídas as enzimas epóxido hidrolases e haloalcanos dehalogenases. Conforme a maioria das enzimas selecionados a partir de bibliotecas metagenômica, pouca informação acerca do micro-organismo de origem pode ser obtida, dificultando a análise, bem como sobre a família V das lipases bacterianas.

Apenas 5 membros dessa família foram isolados, clonados e parcialmente caracterizados: i) a esterase Est2 isolada a partir de uma linhagem produtora de etilacetato *Acetobacter pasteurians* que apresentou atividade máxima a 78 °C e em pH 7,8, e hidrolisando triglicérides de cadeia curta triacetina (C₂) e triprotionina (C₃) (KASHIMA et al., 1998; 1999); ii) a carboxilesterase isolada de *Helicobacter pylori*, EstV, teve a atividade máxima atingida a 50 °C e pH 10, mostrando preferência por ésteres de p-nitrofenil de cadeia curta (C₂-C₆) e triacilglicerídeo tributirina (C₄) e uma típica cinética de Michaelis-Menten ao invés do fenômeno da ativação interfacial, como nas lipases verdadeiras (RUIZ et al., 2007); iii) uma lipase de biblioteca metagenômica de rúmen de boi, RlipE2, exibindo atividade máxima a 30 °C e pH

7.5, e a única com atividade em ésteres de cadeia longa (C_{12} , C_{16} , C_8) e trioleína (C_{18}) (LIU et al., 2009); iv) a esterase FCLip1 isolada por genoma “walking” de uma bactéria hipertermófila *Fervidobacterium changbaicum*, teve atividade ótima a 78 °C e pH 7.8, e preferência por p-nitrofenil ésteres de cadeia média (C_{10}) e triglicerídeo tricapilina (C_8) (CAI et al., 2011); v) e uma serina hidrolase ativa em pH 9 e com aumento da atividade na presença de íons Ca^{+2} , sendo inibida quando íon Zn^{+2} era adicionado ao tampão de reação. AlipC, mostrou atividade a uma ampla gama de substratos de pequena e média cadeia de ésteres (C_4 , C_8 , C_{12}), porém sua melhor atividade foi frente ao pNPC8 (PRIVÉ et al., 2013).

A enzima Lip4 foi superexpressa em uma linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) RP e purificada em apenas uma única etapa, por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, devido a presença da cauda de *His-Tag*, inserida por clonagem na sequência de aminoácidos que compõem a Lip4. Esse único passo de purificação enzimática diminui o tempo de execução do processo de obtenção da proteína pura, com isso, o gasto de materiais utilizados, e aumenta a eficiência na produção e concentração da enzima.

Lip4 teve ótima atividade em pHs 8-9 (alcalinos) e teve preferência por hidrolisar tributirina (C_4), mas não trioleína (C_{18}) e teve uma maior atividade em p-nitrofenil de cadeia média (C_8). Glogauer e colaboradores (2011) tiveram resultados parecidos em testes realizados em placa, onde halos de hidrólise foram maiores em cadeias de oito carbonos do que contra tributirina. Esses resultados podem ocorrer devido ao fato da atividade não depender apenas do comprimento da cadeia, mas leva em consideração outros fatores, como por exemplo a solubilidade do triacilglicerol e a qualidade da emulsificação em meio semi-sólido. Ensaio de cinética para determinar as constantes enzimáticas sugeriram que a enzima Lip4 possui uma curva hiperbólica dentro do modelo de Michaelis-Menten, compatível com comportamento esperado para uma esterase, uma vez que o comportamento cinético das lipases verdadeiras em meio aquoso não pode ser descrito por esse modelo, que atua somente em sistemas homogêneos, onde substrato e enzima estão solubilizados (JAEGER et al., 1994). Entretanto, novos ensaios de espectrofotometria precisam ser realizados, com o objetivo de confirmar os dados obtidos até o momento, uma vez que foi observado que a enzima Lip4 tem uma

velocidade de reação muito rápida, sendo necessário a repetição do ensaio com baixos valores de concentração de enzima.

Embora esterases e lipases catalisem a mesma reação, suas sequências variam amplamente, com exceção das regiões bem conservadas. A Lip4, devido sua especificidade de substrato e a presença de uma assinatura de sequência de esterase, pode ser determinada tipicamente como uma esterase. Foi observado também, que as enzimas mais semelhantes a Lip4, presentes no banco de dados, com uma identidade em torno de 44%, permitindo inferir que a Lip4 é um novo membro da família V das lipases bacterianas.

Membros dessa família são conhecidos como β -cetoadipato enol lactonases e possuem como substrato um β -cetoadipato enol-lactona. Essa enzima catalisa o quarto passo na via de degradação do protocatecol em β -cetoadipato que é o precursor do succinil-CoA e acetil-CoA, compostos presentes na via do β -cetoadipato, a maior rota catabólica para compostos aromáticos (HARWOOD; PARALES, 1996).

A enzima EML28, é uma esterase identificada como β -cetoadipato enol-lactona hidrolase, também teve preferência por ésteres de cadeia curta (C_4), tendo sua atividade diminuída a medida que o comprimento da cadeia aumentava (PARK et al., 2007b)

Na análise da estrutura cristalográfica de outras enzimas β -cetoadipato enol-lactona hidrolases depositadas no PDB, não foram encontrados íons Ca^{+2} ligados à cadeia de aminoácidos. A ausência deste íon deve-se ao fato de que apenas as lipases verdadeiras têm dependência por cálcio para um maior desempenho da sua atividade e estabilidade, fato que não ocorre com a Lip4, já que é considerada uma esterase (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). A presença de cálcio diminuiu em 10% a atividade da esterase, enquanto que a presença de Zn^{+2} , reduziu em mais de 50% a atividade enzimática (FIGURA 45), dados que corroboram com os descritos para a enzima alipC, uma serina hidrolase da família V (PRIVÉ et al., 2013). Entretanto, a presença de 5 mM de cobalto, foi capaz de aumentar sutilmente a atividade da Lip4, comparada aos demais íons, porém o motivo pelo qual esse fato ocorre, ainda precisa ser investigado.

Uma maneira sugerida para aprimorar os resultados de afinidade pelos íons

metálicos, seria repetir os ensaios testando a adição de EDTA ao tampão reacional. Esse ácido tem função de atuar como quelante, retirando qualquer metal que possa estar agregado à estrutura da proteína. Esse tratamento prévio, ajudará a descobrir se a enzima tem preferência por algum íon especificamente.

Mutações sítio-dirigidas no sítio ativo da enzima Lip4 permitiram verificar uma perda da atividade hidrolítica das mutantes em placa contendo substratos naturais como o triglicerídeo tributirina (C₄), porém uma atividade em menor grau que a Lip4 selvagem, foi exibida em ésteres de cadeia de carbono médias (FIGURA 42), testes espectrofotométricos precisam ser realizados para uma melhor conclusão dos resultados. A substituição do resíduo nucleofílico Ser⁹⁴ por uma cisteína, teve como base uma proteína isolada de um micro-organismo marinho *Vibrio* sp. GMD509, denominada Vlip509, que se caracterizaria como uma esterase, agrupada filogeneticamente com as enzimas Dienelactona hidrolases (DLH), que possuem como característica marcante a presença de uma Cisteína catalítica dentro do pentapeptídeo, Gly-X₁-Cys-X₂-Gly (PARK et al., 2007). Essa DLH também é uma das enzimas do ramo clorocatecol da via β -cetoadipato e catalisa a hidrólise irreversível de dienelactona para maleiacetato, uma reação similar a realizada pela enol-lactona hidrolase no ramo de degradação do catecol ou paracatecoate (SCHIMIDT; KNACKMUSS, 1980). A enzima Vlip509 apresentou atividade lipolítica em ágar de tributirina, sendo ativa também frente a diferentes ésteres de p-nitrofenil, tendo sua atividade ótima em pNPC₄, a 30 °C e pH 8,5. Experimentos de mutação de uma cisteína por uma serina no resíduo nucleofílico foi realizado por Cheah e colaboradores (1993), onde a mutante não perdeu completamente a atividade de hidrólise da dienelactona, apenas foi reduzida.

5.2 Determinação estrutural da esterase Lip4 por Cristalografia e Difração de Raio-X

A esterase Lip4 revelou uma similaridade de sequência com a β -cetoadipato enol lactonase, também conhecida como enol-lactona hidrolase (ELH). O gene codificante dessa enzima pertence ao agrupamento gênico catabólico do protocatocote, homólogo a enzima PcaD (PDBID: 2XUA), descrita por Bains e colaboradores (2011) e integrante na via β -cetoadipato, de degradação de

compostos aromáticos (FIGURA 4). Os cristais obtidos da enzima Lip4 foram difratados por raio-X e um mapa completo foi obtido e combinado com o modelo experimental da enzima PcaD por meio de substituição molecular.

5.2.1 Enol-lactona hidrolase (PcaD) de *B. xenovorans* LB400

A enol-lactona hidrolase (ELH), converte a estrutura terminal cíclica, β -ceto adipato enol-lactona em β -ceto adipato, onde os metabólitos aromáticos são convertidos em intermediários do ciclo de Krebs. Essa enzima serve como papel central no processamento e degradação de compostos aromáticos de ocorrência natural e poluentes ambientais (BAINS et al., 2011).

Apesar de importância biológica e estrutural dessa enzima, poucas foram estruturalmente caracterizadas, o que limita a possibilidade de projetar racionalmente enzimas com melhores propriedades catalíticas. Apenas duas ELH possuem estruturas 3D depositadas no banco de dados de proteínas (PDB), uma proveniente de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PDBID: 3OM8) e outra de *Burkholderia xenovorans* LB400 (PDBID: 2XUA), sendo apenas essa última estudada com mais detalhes.

Com o objetivo de entender o mecanismo de ação da EHL, Bains e colaboradores (2011) obtiveram a estrutura tridimensional da PcaD de *B. xenovorans* LB400 em complexo com um produto análogo, o ácido levulínico. A PcaD cristalizou como um dímero na unidade assimétrica (monômeros A e H) e sua estrutura tridimensional pertence ao dobramento das $\alpha\beta$ hidrolases (ABH), onde seis α -hélices estão circundando um núcleo com oito fitas- β , e apenas a β 2 se posiciona de forma antiparalela e é maior que as demais fitas- β (FIGURA 63). PcaD possui um serina catalítica (Ser¹⁰⁰) no sítio ativo e que compõe a tríade catalítica Ser¹⁰⁰-Asp²¹⁷-His²⁴⁴.

A PcaD co-cristalizou com o produto análogo, o ácido levulínico, que ficou retido no sítio ativo de um dos monômeros da proteína (cadeia H), sugerindo que os sítios ativos de cada monômero atuam independentemente. A co-estrutura obtida possibilitou um estudo sobre a ligação e liberação do produto formado, bem como as mudanças conformacionais dos aminoácidos envolvidos. A região de alça do domínio CAP é 50% menor que estruturas homólogas relacionadas, indicando que

essa região funciona numa conformação global, ao invés da dinâmica abre-fecha, observada em alguns membros da família ABH.

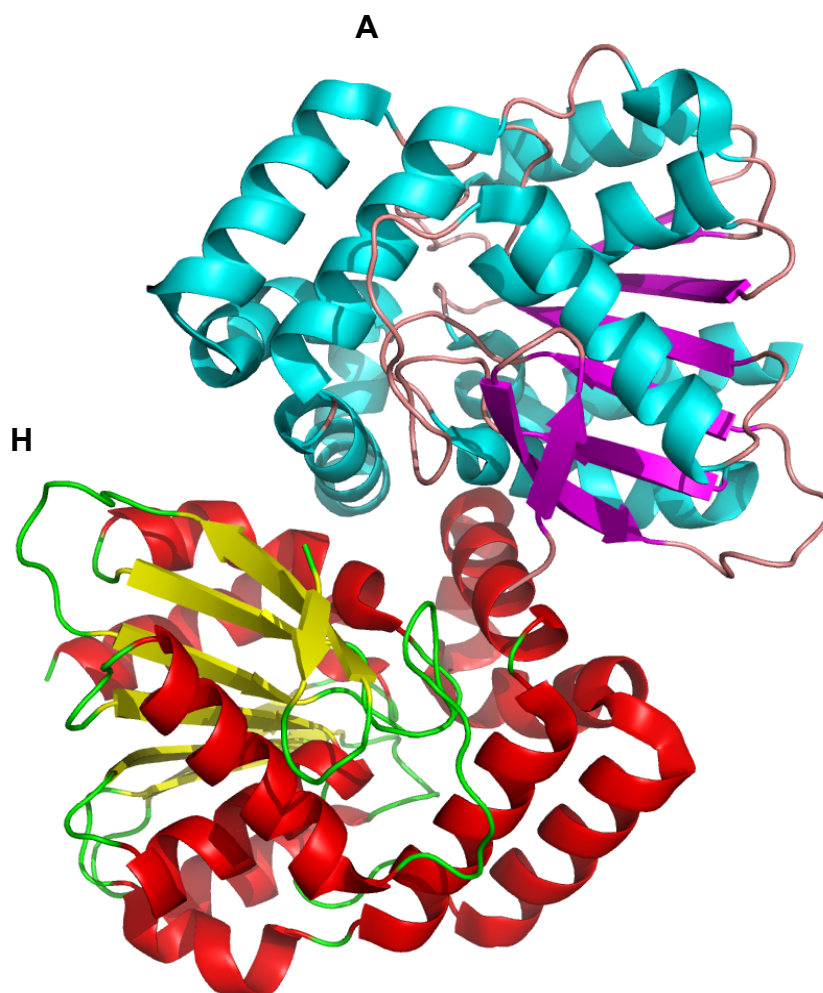


FIGURA 63 – Representação da estrutura molecular em 3D da lipase de *Burkholderia xenovorans* LB400 (PDB:2XUA).

Representação em forma de “cartoon” da estrutura tridimensional de PcaD com o monômero H destacado com α -hélices em vermelho e fita- β em amarelo e o monômero A destacado com a α -hélices em verde e fita- β em roxo. FONTE: Adaptado de Bains et al. (2011). (Figura produzida pelo PyMol).

Uma região flexível existente nas lipases verdadeiras, conhecida como tampa, permite a ocorrência dessa dinâmica de abre-e-fechar, expondo o sítio ativo da proteína na presença do substrato. Esse mecanismo é controlado pela solubilidade

do meio onde a enzima se encontra, onde em baixas quantidades de água, essa tampa se abre para que a ligação enzima-substrato aconteça, esse evento é conhecido como intervenção artificial. Entretanto, a enzima Lip4, apresentou uma estrutura mais rígida, o domínio CAP, composto pelas α -hélices $\alpha 5$ a $\alpha 8$, como já observado entre membros da família das $\alpha\beta$ hidrolases, no entanto, domínios constituídos de menos de 4 hélices tendem a resultar em enzimas monoméricas (LAI et al., 2008), corroborando com os dados apresentados para Lip4, que foi identificada como um monômero pela cromatografia de exclusão. Pela análise da estrutura 3D da enzima Lip4 sobreposta a homóloga PcaD, foi possível inferir que o domínio CAP encontra-se numa conformação fechada, diferente do modelo que cristalizou na conformação aberta. A nuvem de densidade eletrônica obtida pela interface COOT, não identificou a presença de nenhuma molécula no sítio ativo da enzima cristalizada, nem do substrato tributirina utilizado na etapa de formação do cristal de proteína, quanto do produto formado, ligado ao sítio ativo da enzima (FIGURA 58).

5.2.2 Organização gênica da via β -cetoadipato

Os genes que codificam as enzimas envolvidas na via catabólica aromática estão em geral, fisicamente associados em operons ou em agrupamentos gênicos (FIGURA 64-A). Posicionam-se adjacentes aos genes de transporte, responsáveis por captar o substrato aromático, e genes regulatórios, que codificam reguladores de transcrição, que co-evoluíram com as enzimas que formam a maquinaria catabólica (DÍAZ et al., 2013). Entretanto, apesar dos genes que codificam o ramo catecol (*cat*) e o protocatecoate (*pca*) encontrarem-se agrupados, nenhuma ordem particular dentro desses agrupamentos é mantida entre as espécies (FIGURA 64-B) (BAINS et al., 2011). Para a enzima Lip4, nenhuma ORF foi verificada a montante ou a jusante do gene *lip4*, podendo inferir que a Lip4 é transcrita monocistronicamente.

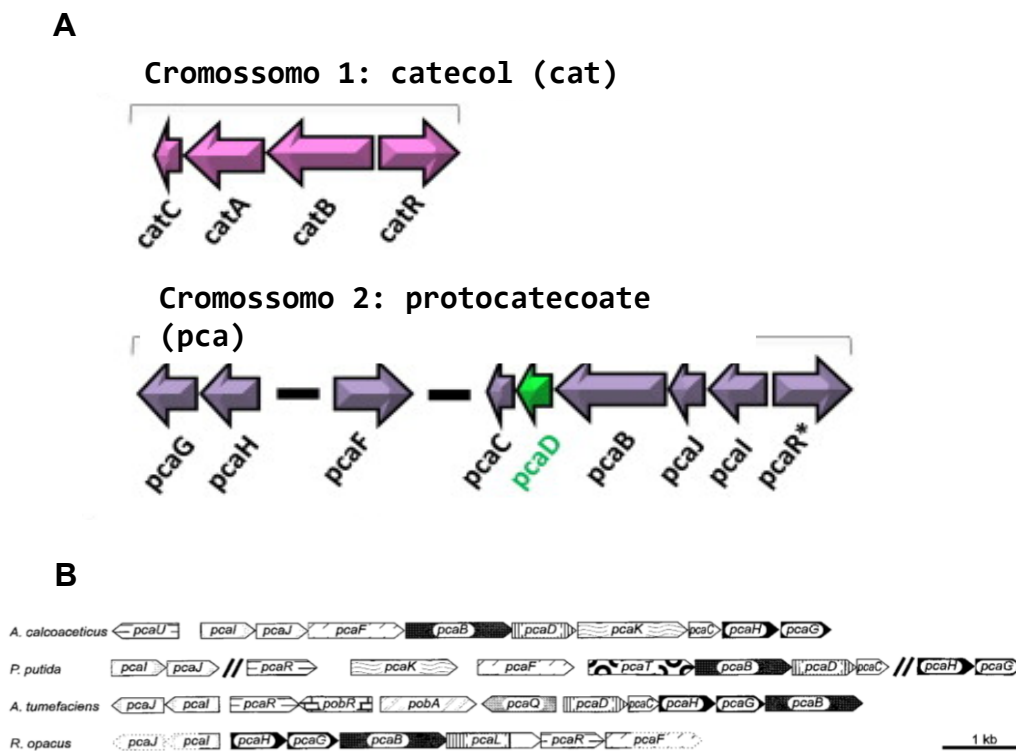


FIGURA 64 – Organização genética da via β -cetoadipato.

(A) Organização da via β -cetoadipato da *Burkholderia xenovorans* LB400, codificada no cromossomo. O agrupamento gênico do ramo intermediário de degradação de compostos aromáticos catecol (cat) e protocacoate (pca). A enzima β -cetoadipato enol-lactona hidrolase (PcaD) está destacada. (B) Estrutura do agrupamento gênico do catabolismo do protocatecoate em diferentes bactérias, mostrando que não ocorre uma sequência entre os genes. O papel de cada enzima está descrito detalhadamente no item 5.2.2. Os genes *catR* e *pacR* são descritos como possíveis reguladores. FONTE: Adaptado Bains et al. (2011); Eulberg et al., (1998).

Os resíduos de aminoácidos críticos para catálise enzimática são conservados entre as proteínas, porém permutações entre espécies permitiram assumir uma organização gênica própria e um conjunto de características regulatórias, ou identidades, que são específicas para um determinado grupo de bactérias na qual é encontrada (HARWOOD; PARALES, 1996). Alguns organismos carregam somente uma porção da via, ou os dois ramos da via convergem para pontos diferentes entres espécies de bactérias.

Os genes que codificam as enzimas dos três últimos passos da via β -cetoadipato, apresentam algumas divergências adquiridas ao longo da evolução. As enzimas que hidrolisam o anel lactona (*pcaD* e *catD*) compartilham apenas 52% de

identidade na sequência de nucleotídeos, enquanto que os genes *catIJF/pcaIJF* possuem 99% de identidade (HARTNETT; ORNSTON, 1994). As enzimas lipolíticas frequentemente apresentam estruturas tridimensionais similares, apesar de uma baixa homologia entre as sequências (JAEGER *et al.*, 1999), de modo que a modelagem molecular por homologia pode ser empregada como ferramenta para analisar algumas possíveis características estruturais da lipase Lip4.

O aumento exponencial no uso de lipases e esterases na biotecnologia em comparação com outras enzimas hidrolíticas indica uma crescente demanda na busca de novos genes lipolíticos. Características interessantes apresentadas por essas enzimas como, não requisição de co-fatores, estabilidade em solventes orgânicos, ampla especificidade de substrato, estereoseletividade (LEE *et al.*, 2004), torna importante a caracterização da Lip4, com objetivo de trazer novos conhecimentos sobre os membros da família V, contribuindo no desenvolvimento de aplicações biotecnológicas presente neste grupo de enzimas.

Portanto, o emprego da genômica estrutural permite a obtenção de modelos tridimensionais úteis das proteínas por uma combinação com modelos estruturais comparativos, gerando estruturas em alta resolução (VITKUP *et al.*, 2001), tornando a construção de novas vias catabólicas a partir do conhecimento da estrutura de proteínas de micro-organismos ainda não conhecidos, com finalidade de remover as lacunas existentes no processo de biorremediação microbiana, com obtenção de novas linhagens com habilidade de degradar poluentes resistentes do ambiente (RAMOS *et al.*, 2011).

Devido suas características ao longo dos anos, os solos de TPI são considerados ricas fontes de carbono, e isso poderia ter favorecido a seleção natural da espécie codificando o gene *lip4*. Brossi e colaboradores (2014) analisando a estrutura da comunidade de solos de TPI em comparação com os solos adjacentes na busca por genes responsáveis por passos chaves no ciclo do carbono, concluíram que a riqueza de carbono e nutrientes dos solos antropogênicos facilita o surgimento de genes relacionados a degradação de hidrocarbonetos aromáticos. Esses compostos aromáticos não são substratos preferidos para crescimento e em muitos casos, a síntese de enzimas catabólicas é reduzida quando certos fontes de carbonos facilmente metabolizáveis estão simultaneamente presentes (LI *et al.*,

2010).

A enzima Lip4 se mostrou uma candidata promissora para estudos biotecnológicos, principalmente aos relacionados as áreas de biodegradação de compostos aromáticos, uma vez que a produção de recombinantes é conveniente devido solubilidade da proteína, fácil purificação por meio de cromatografia de afinidade e alto rendimento. O conhecimento da estrutura tridimensional na esterase Lip4 permitirá o aprofundamento dos estudos relacionados a atividade e estabilidade enzimática.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Um gene codificando uma nova esterase, nomeada Lip4, foi isolado a partir de uma Biblioteca metagenômica de solo Amazônico, por meio de rastreo funcional em meio de cultivo contendo substrato tributirina. O solo de Terra Preta de Índio por ser rico no nutriente carbono proveniente em grande parte pela ação antrópica, pode ter possibilitado surgimento de bactérias transitórias, que se aproveitam de condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento metabólico e crescimento. Embora não se saiba exatamente qual o verdadeiro substrato ou a função fisiológica da enzima, é possível dizer que ela poderia potencialmente ser usada como um biocatalisador nas reações de hidrólise e síntese realizados dentro das indústrias farmacêuticas e de química fina. Muitas aplicações industriais são realizadas sob condições alcalinas, mais especificamente na indústria de detergentes.

As principais conclusões relacionadas ao trabalho e a algumas características de Lip4 foram:

- Os clones Fos1 e Fos4 foram confirmados positivamente para capacidade de hidrolisar tributirina após uma segunda transformação genética. O DNA fosmidial foi empregado na construção de sub-bibliotecas, permitiu obter um clone com fragmento gênico a partir do clone Fos4, de aproximadamente 2,3 kb com atividade hidrolítica;
- O gene denominado *lip4* foi sequenciado por técnica de “genome walking” até obtenção da sequência de nucleotídeos de 854 pb, codificante da enzima lipolítica Lip4 com 268 aminoácidos, com massa molecular de 29309.9 kDa com ponto isoelétrico teórico de 6,06;

- A enzima foi identificada como uma carboxilesterase, membro da família V das lipases bacterianas. Possui similaridade com domínio conservado de uma β -cetoacil-CoA enol-lactona hidrolase, uma importante enzima na via β -cetoacil-CoA. Essa via é codificada cromossomalmente em algumas espécies de bactérias e fungos encontrados nos solos, que atuam na degradação de compostos aromáticos, com objetivo de reciclar as moléculas de carbono para obtenção de energia para crescimento microbiano.
- Lip4 foi superexpressa em BL21 (DE3) RP, purificada em uma única etapa de cromatografia de afinidade
- Atua hidrolisando ésteres naturais de cadeia curta (tributirina) e ésteres artificiais de p-nitrofenila de cadeia média (pNPC8), mas não tem atividade hidrolítica em ésteres de cadeia longa. Tem atividade ótima em pH alcalino, especificamente entre a faixa de pH de 8 e 9.
- A presença de íons metálicos no tampão reacional não aumentou a estabilidade da enzima Lip4, mas o íon Zn^{+2} reduziu em mais de 50% a atividade enzimática, podendo-se inferir que essa enzima seja uma serina hidrolase (PRIVÉ et al., 2013).
- Os cristais obtidos pertencem ao grupo espacial $P2_12_12_1$, com 4 moléculas presentes na unidade assimétrica;
- A substituição molecular realizada a partir do mapa gerado para Lip4, permitiu observar a localização da tríade catalítica Ser⁹⁴-Asp²¹⁷-His²⁴⁵, no qual a Ser⁹⁴ está situada dentro do pentapeptídeo conservado G-X-S-X-G, e indicou a presença do domínio CAP na região mais flexível da enzima;
- Duas mutantes, Lip4_{S94A} e Lip4_{S94C}, foram construídas para testar atividade da enzima pela mudança de resíduos de aminoácidos no sítio catalítico, demonstraram a perda de atividade pelos mutantes, mas ambos mantiveram sua conformação estrutural, observada por testes de dicroísmo circular.

Dentre as enzimas lipolíticas descritas, as de origem microbiana são comercialmente mais úteis, levando a um aumento na tendência do mercado na

procura de novas fontes microbianas para produção dessas enzimas (WILLERDING et al., 2011). O desenvolvimento de novas e melhoradas enzimas será o elemento chave no reino emergente da biotecnologia (GUPTA et al., 2003). Uma avaliação preliminar do potencial biotecnológico da esterase Lip4 possibilitou sugerir que essa enzima tem potencial para aplicação na biocatálise, com destaque para produção de biodiesel por transesterificação em meio orgânico, uma vez que é uma enzima importante na via β -cetoadipato de degradação de compostos aromáticos.

Futuros experimentos:

Em relação a atividade da enzima Lip4:

(a) Refazer ensaios de estabilidade com íons, testando a adição de EDTA ao tampão da enzima, pois este ácido é quelante de íons metálicos e permite avaliar a especificidade da enzima por algum íon;

(b) Repetir experimento de K_m e $V_{máx}$ para obter uma melhor curva de Michaelis-Menten, diminuindo a concentração inicial de Lip4;

(c) Fazer testes de atividade enzimática com linhagens mutantes para confirmar a diminuição ou perda da atividade pela mutação do sítio ativo;

Em relação a estrutura e função da enzima Lip4:

(a) Realizar novas etapas de refinamento para diminuir fatores de R_{free} e R_{factor} , e reposicionar os aminoácidos que estão em posições não favoráveis dentro do Ramachandran plot, a fim de obter uma estrutura em alta resolução para depósito no PDB;

(b) Colocar um agente redutor (β -mercaptoetanol ou DTT) no tampão da enzima da linhagem mutante Lip4_{S94C} e verificar se o rompimento da ponte dissulfeto torna a proteína ativa, uma vez que o resíduo Cisteína do sítio ativo fica livre para interagir nucleofilicamente com a Histidina.

(c) Redigir e submeter artigos científicos relacionadas com resultados obtidos de caracterização e resolução da estrutura da Lip4.

REFERÊNCIAS*

ALDRICH. Sigma-Aldrich. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w222305?lang=pt®ion=BR>>. Acessado em: 7 de Maio de 2015.

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 Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARPINGY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochem. J.**, v. 343, p. 177-183, 1999.

BAINS, J.; KAUFMAN, L.; FARNELL, B.; BOULANGER, M. J. A product analog bound form of 3-oxodipate-enol-lactonase (PcaD) reveals a multifunctional role for the divergent cap domain. **J. Mol. Biol.**, v. 406, p. 649-658, 2011.

BARON, A. M. Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise. 154 f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2008.

BELL, P. J.; SUNNA, A.; GIBBS, M. D.; CURACH, N. C.; NEVALAINEN, H.; BERGQUIST, P. L. Prospecting for novel lipase genes using PCR. **Microbiol.**, v.148, p. 2283-2291, 2002.

BIANCO, R. A.; VICENTE, E. J.; ASTOLFI-FILHO, S.; SAKATA, S.; MIYAMOTO, M.; LEOMIL, L.; PEREIRA, J. O. Rastreamento de enzimas lipolíticas em biblioteca metagenômica de solo da Amazônia. In: **26. Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Anais. Foz do Iguaçu, 2011. n. 1963-2.

BLOW, D. More of catalytic triad. **Nature**, p. 694-695, 1990.

BRAGG, L.; TYSON, G. W. Metagenomics using next-generation sequencing. **Methods Mol. Biol.**, v. 1096, p. 183-201, 2014.

BROOKS, A. A.; ASUMODO, N. U. Lipase production by strains of *Aspergillus* species isolated from contaminated body creams. **J. Toxicol. Environ. Health Sci.**, v.3, p. 311-316, 2011.

BROSSI, M.J.L.; MENDES, L.W.; GERMANO, M.G.; LIMA, A.B.; TSAI, S.M. Assessment of bacterial *bph* gene in Amazonian Dark Earth and their adjacent soils. **PLOS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.

CAI, J.; XIE, Y.; SONG, B.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; FENG, Y. *Fervidobacterium changbaicum* Lip1: Identification, cloning and characterization of the thermophilic lipase as a new member of bacterial lipase family V. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 89, p. 1463-1473, 2011.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrado de ácidos graxos poliinsaturados. **Quim. Nova**, v. 26, p. 75-80, 2003.

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

CHEAH E.; AUSTIN C.; ASHLEY G. W.; OLLIS, D. Substrate-induced activation of dienelactone hydrolase: an enzyme with a naturally occurring Cys-His-Asp triad. **Protein. Eng.**, v. 6, p. 575-583, 1993.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

CHU, X.; HE, H.; GUO, C.; SUN, B. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v.80, p. 615, 2008.

COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT, NUMBER 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 50, p.760-763, 1994.

COTTRELL, M. T.; MOORE, J. A.; KIRCHMAN, D. L. Chitinases from uncultured microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 2553-2557, 1999.

COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C. M.; BALL, M.; FRANCOU, F.; NORMAND, P.; HELYNCK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S. J.; HOPKE, J.; OSBOURNE, M. S.; AUGUST, P.R.; NALIN, R.; GUÉRINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drugs discovery from natural products. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 49-55, 2003.

COUTO, G. H.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; CHUBATSU, L. E.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Isolation of a novel lipase from metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genet. Mol. Res.**, v. 9, p. 514-523, 2010.

COWAN, D. A. Microbial genomes – an untapped resource. **Tibtech.**, v. 18, 2000.

CUNHA, T. J. F.; MADARI, B. E.; CANELLAS, L. P.; RIBEIRO, L. P.; BENITES, V. M.; SANTOS, G. A. Soil organic matter and fertility of anthropogenic dark earths (Terra Preta de Índio) in the Brazilian Amazon basin. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 33, p. 85-93, 2009.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Exploring microbial diversity-a vast below. **Science**, v. 309, p.1331–1133, 2005.

DAHIAYA, P.; PURKAYASTHA, S. Isolation, screening and production of extracellular alkaline lipase from a newly isolated *Bacillus* sp. PD-12. **J. Biol. Sci.**, v.11, p-381-387, 2011.

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

DANIEL, R. The Metagenomics of soil. **Nature**, v. 3, p. 470-478, 2005.

DE SIMONE, G.; MENCHISE, V.; MANCO, G.; MANDRICH, L.; SORRENTINO, N.; LANG, D.; ROSSI, M.; PEDONE, C. The crystal structure of a hyper-thermophilic carboxylesterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. **J. Mol. Biol.**, v. 314, p. 507-518, 2001.

DELANO, W. L. The PyMol moleculargraphics system. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. <http://www.pymol.org>

DÍAZ, E.; JIMENEZ, J. I.; NOGALES, J. Aerobic degradation of aromatic compounds. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 24, p. 431-442, 2013.

DROZDOWICZ, A. Bactérias de solo. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 17-66.

DUAN, C. J.; XIAN, L.; ZHAO, G. C.; FENG, Y.; PANG, H.; BAI, X. L.; TANG, J. L.; MA, Q. S.; FENG, J. X. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. **J. Appl. Microbiol.**, v. 107, p. 245-256, 2009.

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, p. 3637-3645, 2006.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. COOT: model building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.**, v. 60, p. 2126-2132, 2004.

EULBERG, D.; LAKNER, S.; GOLOVLEVA, L. A.; SCHLÖMANN, M. Characterization of a Protocatechuate Catabolic Gene Cluster from *Rhodococcus opacus* 1CP: Evidence for a Merged Enzyme with 4-Carboxymuconolactone-Decarboxylating and 3-Oxo adipate Enol-Lactone-Hydrolyzing Activity. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1072-1081, 1998.

EXXONMOBIOL. The outlook for energy: a view to 2040, (available at www.exxonmobil.com/en/energy/energy-outlook/global-landscape/overview). 2015.

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

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. **Environ. Microbiol.**, v. 7, p. 1996-2010, 2005.

FU, C.; HU, Y.; XIE, F.; GUO, H.; ASHFORTH, E. J.; POLYAK, S. W.; ZHU, B.; ZHANG, L. Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 90, p. 961-973, 2011.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 803-816, 2011.

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

GILLESPIE, D. E.; BRADY, S. F.; BETTERMANN, A. D.; CIANCOTTO, N. P.; LILES, M. R.; RONDON, M. R. CLARDY, J.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 4301-4306, 2002.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. In: REES, R. M.; BALL, B. C.; CAMPBELL, C. D.; WATSON, C. A. (Ed.). **Sustainable management of soils organic matter**. Wallingford, UK: CAB International, 2001. p. 190-194.

GLOGAUER, A.; MARTINI, V. P.; FAORO, H.; COUTO, G. H.; MÜLLER-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. **Microbiol. Cell Factories**, v. 10, p. 1-15, 2011.

GOMEZ-ALVAREZ, V.; REVETTA, R. P.; DOMINGO, J. W. S. Metagenome analyses of corroded concrete wastewater pipe biofilms reveals a complex microbial system. **BMC Microbiol.**, v. 12, 2012. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/122>.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nat. Protoc.**, v. 1, p. 2876-2890, 2006.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 59, p. 15-32, 2002.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and

biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HADDOCK, J. D. Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons: enzyme structure and catalytic mechanisms. In: TIMMIS, K.N. (Ed.) **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Berlin: Springer-Verlag, 2010. p. 1058-1069.

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

HANDELSMAN, J. Sorting out metagenomes. **Nature Biotech.**, v. 23, n. 1, 2005.

HANSAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzym. Microb. Tech.**, v.39, p. 235-251, 2006.

HARDMAN, F.; SJÖLING, S. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active from uncultured bacteria of marine sediment. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 59, p. 524-534, 2007.

HARTNETT, G. B.; ORNSTON, L. N. Acquisition of apparent DNA slippage structures duringb extensive evolutionary deivergence of *pcaD* and *catD* genes encoding identical catalytic activites in *Acetobacter calcoaceticus*. **Gene**, v. 142, p. 23-79, 1994.

HARWOODS, C.S.; PARALES, R.E. The β -keto adipate pathway and biology of self-identity. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 553-590, 1996.

HAUSMANN, S.; JAEGER, K. E. Lipolytic Enzymes from bacteria. TIMMIS, K.N. (Ed.) **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Berlin: Springer-Verlag, 2010. p. 1099-1126.

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

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*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 3113-3116, 2000.

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

HUBE, B.; STEHR, F.; BOSSENZ, M; MAZUR, A.; KRETSCHMAR, M.; SCHÄFER, W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. **Arch. Microbiol.**, v. 174, p.362-374, 2000.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY NOMENCLATURE. **Enzyme nomenclature 1992**. San Diego: IUBMB, 1992. 862 p.

ISMAIL, W.; GESCHER, J. Epoxy Coenzyme A Thioester Pathways for Degradation of Aromatic Compounds. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 5043-5051, 2012.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **J.Mol. Catal. B Enzym.**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.

IWAI, S.; CHAI, B.; SUL, W.J.; COLE, J.R.; HASHSHAM, S.A. Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. **ISME J.**, v. 4, p. 279-285, 2010.

- JAEGER, K. E.; RANSAK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.15, p. 29-63, 1994.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- JAEGER, K. E.; MANFRED, T.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotech**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: biology, tree-dimensional structures, and biotechnological applications. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315-351, 1999.
- JANSEN, R.G. Detection and determination of lipases (Acylglycerol Hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v. 18, p. 650-657, 1983.
- KAKIRDE, K. S.; PARSLEY, L. C.; LILES, M. R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomic. **Soil Biol. Biochem.**, v. 42, p. 1911-1923, 2010.
- KASHIMA, Y.; IJIMA, M.; OKAMOTO, A.; KOIZUMI, Y.; UDAKA, S.; YANAHIDA, D. F. Purification and characterization of intracellular esterases related to ethylacetate formation in *Acetobacter pasteurianus*. **J. Ferment. Bioeng**, v. 85, p. 584-588, 1998.
- KASHIMA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKANO, T.; TAYAMA, K.; KOIZUMI, Y.; UDAKA, S.; YANAGIDA, F. Cloning and characterization of ethanol-regulated esterase genes in *Acetobacter pasteurianus*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 87, p. 9-27, 1999.
- KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v. 4, p. 363-371, 2009.
- KHAN, M.; JITHESH, K.; MOOKAMBIKAY, R. Cloning and characterization of two functionally diverse lipases from soil metagenome. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 59, p. 21-31, 2013.
- KENNEDY, J.; OLEARY, N.D.; KIRAN, G.S.; MORRISEY, J.P.; O'GARA, F.; SELVIN, J.; DOBSON, A.D.W. Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. **J. Appl. Microbiol.** v. 111, p. 787-799, 2011.
- KHELEBNOVIK, A.; RISA, Ø; SKAUG, T; CARRIER, T. A.; KEASILNG, J. D. Regulatable Arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture. **J. Bacteriol**, v. 182, p. 7029-7094, 2000.
- KIM, E. K.; JANG, W. H.; KO, J.H.; KANG, J. S.; NOH, M. J. Lipase and its modulator from *Pseudomonas* sp. strain KFCC 10818: Proline-to-glutamine substitution at position 112 induces formation of enzymatically active lipase in the absence of the modulator. **J. Bacteriol.**, v.183, p. 5937-5941, 2001.
- KIM, H. K.; LIU, J. W. CARR, P. D.; OLLIS, D. L. Following directed evolution with crystallography: structural changes observed in changing the substrate specificity of diene lactone hydrolase. **Biol. Cryst.**, v. 61, p. 920-931, 2005.
- 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 Express. Purif.** v. 45, p. 315-323, 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, 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. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 393, p. 45-49, 2010.
- KNIETSCH, A.; WASCHKOWITZ, T.; BOWIEN, S.; HENNE, A.; DANIEL, R. Construction and screening of metagenomics libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for gene conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 1408-1416, 2003.
- KOSAS, M.; RAGAUSKAS, A.J. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. **Trends Biotech.**, v. 29, p. 53-61, 2011.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Trends Genet.**, v. 22, p. 29-37, 1970.
- LÄMMLE, K.; ZIPPER, H.; BREUER, M.; HAUER, B.; BUTA, C.; BRUNNER, H.; RUPP, S. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **J. Biotech.**, v. 127, p. 575-592, 2007
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 283-291, 1993.
- LAWRENCE, R. C.; FRYER, T. F.; REITER, B. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. **Nature**, v. 213, p. 1264-1265, 1967.
- 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. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 65, p. 720-726, 2004.
- LEE, M. H.; LEE, C. H.; OH, T. K.; SONG, J. K.; YOON, J. H. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, p. 7406-7409, 2006.
- LEE, M.H.; LEE, S. W. Bioprospecting potential of the soil metagenome: novel enzymes and bioactivities. **Genomic Inform.**, v. 11, p. 114-120, 2013.
- LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GERMAN, L.A.; McCANN, J.; MARTINS, G. C.; MOREIRA, A. Soil fertility and production potential. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian dark earths; origin, properties and management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.105-124.
- LENFANT, N.; HOTELIER, T.; VELLUET, E.; BOURNE, Y.; MARCHOT, P.; CHATONNET, A. ESTHER, the database of the α/β hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p. 423-429, 2013.
- LEOMIL, L.; REIS, A. M. M.; TAVARES, P.; ARAUJO, J. F.; KRUGER, R. H.; ASTOLFI-FILHO, S. A. Construção de biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio. In: **24. Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Anais. Brasília, 2007. p. 56.
- LESLIE, A. G. W. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data, Joint CCP4 + ESF-EAMCB. **Newslett. Protein Crystallogr.**, v. 26, 1992.
- LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Compt. Str. Biotech. J.**, v. 2, 2012.
- LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P.; THIES, J.E.; O'NEIL, B. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Org. Geochem.**, v. 11, p. 206-213, 2010.
- LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A.; MOTA, M. Deep Agar-diffusion test for preliminary screening of lipolytic activity of fungi. **J. Microbiol. Methods**, v. 14, p. 193-200, 1991.

LIMA, H. N.; SCHAEFER, C. E. R.; MELLO, J. W. V.; GILKES, R. J.; KER, J. C. Pedogenesis and pre-Colombian land use of “Terra Preta Anthrosols” (“Indian black earth”) of Western Amazonia. **Geoderma**, v. 110, p. 1-17, 2002.

LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.; SPOERING, A. L.; ENGELS, I.; CONLON, B. P.; MUELLER, A.; SCHÄBERLE, T. F.; HUGHES, D.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES, L.; STEADMAN, V.; COHEN, D. R.; FELIX, C. R.; FETTERMAN, K. A.; MILLETT, W. P.; NITTI, A. G.; ZULLO, A. M.; CHEN, C.; LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, 2015. doi:10.1038/nature14098

LIU, K.; WANG, J.; BU, D.; ZHAO, S.; McSWEENEY, C.; YU, P.; LI, D. Isolation and biochemical characterization of two lipases from metagenomi library of China Holstein cow rumen. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 35, p. 605-611, 2009.

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

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

MACOY, A. G.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **J. Appl. Cryst.**, v. 40, p. 658-674, 2007.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipase. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, v. 3, p. 193-217, 1985.

MADARI, B. E.; CUNHA, T. J. F.; NOVOTNY, E. H.; MILORI, D. M. B.; MARTIN-NETO, L.; BENITES, V. M.; COELHO, M. R.; SANTOS, G. A. Matéria Orgânica dos Solos Antrópicos da Amazônia (Terra Preta de Índio): Suas Características e Papel na Sustentabilidade da Fertilidade do Solo. In: Eds. TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. N.; WOODS, W. (Eds). **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: Universidade Federal do Amazonas Embrapa Amazônia Ocidental, 2010.p 172-188.

MARUYAMA, T.; NAKAJIMA, M.; ICHIKAWA, S.; NABETANI, H.; FURUSAKI, S.; SEKI, M. Oil—Water Interfacial Activation of Lipase for Interesterification of Triglyceride and Fatty Acid. **JAOCs**, v. 77, p. 1121-1127, 2000.

MCLEAN, R. J. C.; KAKIRDE, K. S. Enhancing Metagenomics Investigations of Microbial Interactions with Biofilm Technology. **J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 22246-22257, 2013.

MEILLEUR, C.; HUPÉ, J. F.; JUTEAU, P.; SHARECK, F. Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, v. 36, p. 853-861, 2009.

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. 389–396, 2009

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B.W. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 9, p. 732-737, 1999.

NARDINI, M.; LANG, D. A.; LIEBETON, K.; JAEGER, K.; DIJKSTRA, B. W. Crystal structure of pseudomonas aeruginosa lipase in the open conformation: The prototype for family i.1 of bacterial lipases. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 31219–31225, 2000.

- NIESEN, F. H.; BERGLIND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nat. Protoc.**, v. 2, p. 2212-2221, 2007.
- OLANIRAN, A. O.; IGBINOSA, E. O. Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern – properties, distribution and microbial degradation processes. **Chemosphere**, v. 83, p. 1297-1306, 2011.
- OLLIS, D. L.; NGAI, K. L. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic data of diene lactone hydrolase from *Pseudomonas* sp. B13. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 9818-9819, 1985.
- OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B. W.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; RAMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHARF, J. *et al.* The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Eng.**, v. 5, p. 197-211, 1992.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Quim. Nova**, v. 29, p. 93-99, 2006.
- PARK, S.; KIM, S.; KANG, S. G.; WOO, J.; LEE, J.; CHOI, H.; KIM, S. A new esterase showing similarity to a putative diene lactone hydrolase from a strict marine bacterium, *Vibrio* sp. GMD509. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, p. 107-115, 2007a.
- PARK, H.; JEON, J. H.; KANG, S. G.; LEE, J.; LEE, S.; KIM, H. Functional expression and refolding of a new alkaline esterase, EML28 from deep-sea sediment metagenome. **Protein Express. Purif.**, v. 52, p. 340-347, 2007b.
- PATHAK, D.; NGAI, K. L.; OLLIS, D. X-ray crystallographic structure of diene lactone hydrolase at 2.8 Å. **J. Mol. Biol.** v. 204, p. 435-445, 1988.
- PATHAK, D.; ASHLEY, G.; OLLIS, D. Thiol protease-like active site found in the enzyme diene lactone hydrolase: localization using biochemical, genetic, and structural tools. **Proteins**, v. 9, p. 267-279, 1991.
- PERRAKIS, S.; MORRIS, R.; LAMZIN, V.S. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. **Nat. Struct. Biol.**, v. 6, p. 458-463, 1999.
- PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comp. Chem.**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.
- PLEISS, J.; FISCHER, M.; PEIKER, M.; THIELE C.; SCHMID, R. D. Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 10, p. 491–508, 2000.
- PRIVÉ, F.; KADERBHAI, N. N.; GIRDWOOD, S.; WORGAN, H. J.; PINLOCHE, E.; COLLAN, N. D.; HUWS, S. A.; NEWBOLD, C. J. Identification and characterization of three novel lipases belonging to families II and V from *Anaerovibrio lipolyticus* 5ST. **Plos One**, v. 8, 2013.
- RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Adv. Protein Chem.**, v. 23, p. 283-438; 1968.
- RAMOS, J. L.; MARQUÉS, S.; DILLEWIJN, P.; URGEL, M. E.; SEGURA, A.; DUQUE, E.; KRELL, T. GONZÁLEZ, M. I. R.; BURSAKOV, S.; ROCA, A.; SOLANO, J.; FERNÁNDEZ, M. NIQUI, J. L.; TOBIAS, P. P.; WITTICH, R. M. Laboratory research aimed at closing the gaps in microbial bioremediation. **Cell Press.**, v. 29, p. 641-647, 2012.
- RIESENFELD, C. R.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environ. Microbiol.**, v. 6, p. 981-989, 2004.

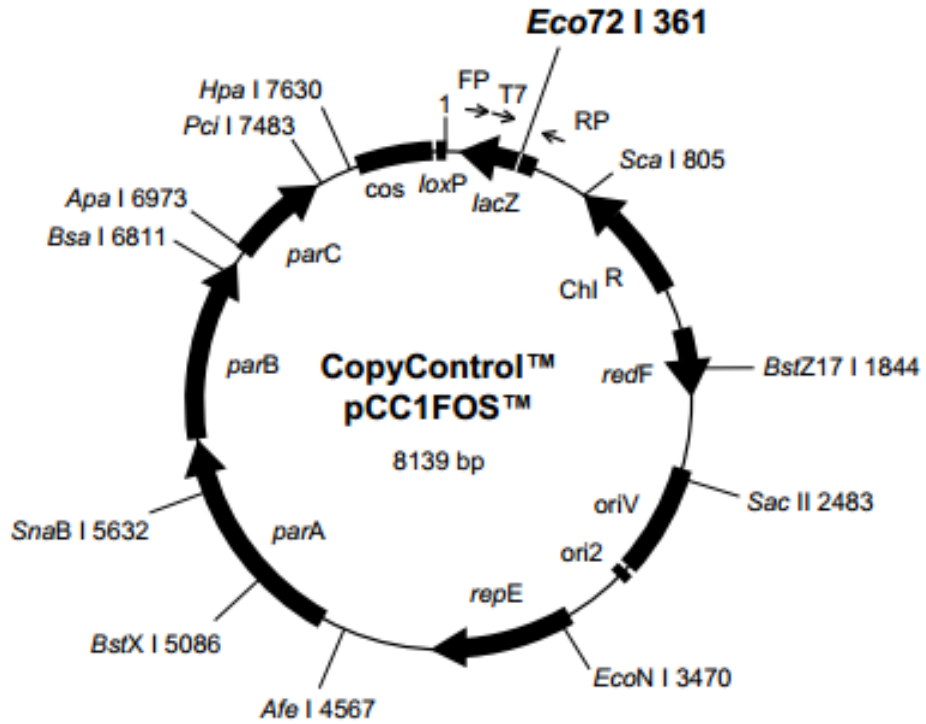
- RHEE, J. K.; AHN, D. G.; KIM, Y. G.; OH, J. W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone sensitive lipase family, cloned from a metagenome library. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p. 817-825, 2005.
- ROH, C.; VILLATTE, F.; KIM, B. G.; SCHMID, R. D. Screening and purification for novel cytochrome b5 from uncultured environmental microorganisms. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 475-480, 2007.
- RONDON, M. R.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Tibtech October**, v.17, p. 403-409, 1999.
- RUIZ, C.; PASTOR, F. I.; DIAZ, P. Isolation of lipid- and polysaccharide-degrading micro-organisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp. CR-179. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.40, p. 218-227, 2005.
- RUIZ, C.; FALCOCCHIO, S.; PASTOR, F. I.; SASO, I.; DIASZ, P. *Helicobacter pylori* EstV: identification, cloning and characterization of the first lipase isolated from epsilon-proteobacterium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 2423-2431, 2007.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 2001.
- SANGEETHA, R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. **Res. J. Microbiol.**, v. 6, p. 1-24, 2011.
- SCHLEIF, R. AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. **FMES**, p. 1-18, 2010.
- SCHLÖMANN, M.; SCHMIDT, E.; KNACKMUSS, H. J. Different types of diene lactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria. **J. Bacteriol.**, v.172, p. 5112-5118, 1990.
- SCHLÖMANN, M. Evolution of chlorocatechol catabolic pathways. **Biodegradation**, v. 5, p. 301-321, 1994.
- SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Environ. Biotech.**, v. 14, p.303-310, 2003.
- SCHMIDT, E.; KNACKMUSS, H. J. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. **Biochem. J.**, v. 192, p. 339-347, 1980.
- SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and α/β hydrolase fold. **Methods. Enzymol.**, v. 284, p. 85-107, 1997.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BENERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotech. Adv.**, v. 19, p.627-662, 2001.
- SIMON, G.; CRAVATT, B. F.; Activity-based Proteomics of Enzyme Superfamilies: Serine Hydrolases as a Case Study. **J Biol Chem.**, v. 285, p. 11051-11055, 2010.
- SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. **Appl. Environ. Microbiol.** v.77, p. 1153-1161, 2011.
- STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 247, p. 105-111, 2005.

- STEELE, H. L.; JAEGER, K. E.; DANIEL, R.; STREIT, W. R. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. **J. Mol. Microbiol. Biotech.**, v. 16, p. 25-37, 2009.
- STREIT, W. R.; DANIEL, R.; JAEGER, K. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. **Curr. Opin. Biotech.**, v.15, p. 285-290, 2004.
- STUDIER, F. W.; MOFFATI, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J. Mol. Biol.**, v. 189, p. 113-30, 1986.
- TAMURA, S.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 8, p. 1596-1599, 2007.
- TEIXEIRA, W. G.; MARTINS, G. C. Soil physical characterization. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). **Amazonian dark earths; origin, properties and management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.271-286.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p.4673-4680, 1994.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil, from genes to ecosystems. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, p. 240-245, 2002.
- UCHIYAMA, T.; ABE, T.; IKEMURA, T.; WATANABE, K. Substrate-induced gene expression of environmental metagenoma libraries for isolation in catabolic genes. **Nature Biotech.**, v. 23, p. 88-93, 2005.
- UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 20, p. 616-622, 2009.
- 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.; BADENTILLSON, H.; PFANNKONCH, C.; ROGERS, Y-H.; SMITH, H. O. Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. **Science**, v. 304, p. 66-74, 2004.
- VITKUP, D.; MELAMUD, E.; MOULT, J.; SANDER, C. Completeness in structural genomics. *Nature Struc. Biol.*, v. 8, p. 559-566, 2001.
- VOGET S.; LEGGEWIE C.; UESBECK 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.
- WALKER, I.; EASTON, C.J.; OLLIS, D. L. Site-directed mutagenesis of diene lactone hydrolase produces diene lactone isomerase. **Chem. Comm.**, p. 671-672, 2000.
- WANG, Y.; WEI, D. Q.; WANG, J. F. Molecular dynamics studies on T1 lipase: insight into a double-flap mechanism. *Journal of Chemical Informatics Model*, vol. 50, p. 875-878, 2010.
- WARD, B. B. How many species of prokaryotes are there? **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, p. 10234-10236 2003.
- WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M. A; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1189-1191, 2009.
- WEINER, M. P.; ANDERSON, C.; JERPSETH, B.; WELLS, S.; JOHNSON-BROWNE, B.; VAILLANCOURT, P. Studier pET system vectors and hosts. **Strateg. Mol. Biol.** v.7, n.2, p.41-43, 1994.

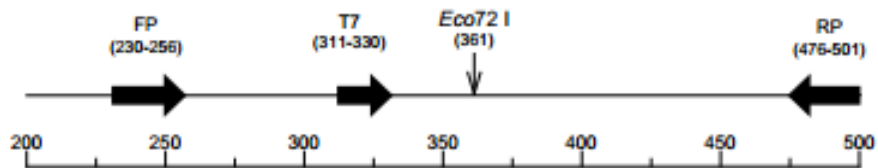
- WELLS, T. J.; RAGAUSKAS, A. J. Biotechnological opportunities with the β -keto adipate pathway. **Cell Press**, v. 30, p. 627-637, 2012.
- WILD, J.; HRADECNA, Z.; SZYBALSKI, W. Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vector and genomic clones. **Genome Res.**, v. 12, p. 1434-1444, 2002.
- WILLERDING, A. L.; OLIVEIRA, L. A.; MOREIRA, F. W.; GERMANO, M. G.; CHAGAS, A. F. Lipase activity among bacteria isolated from Amazonian Soils. **Enzyme Res.**, v. 2011, 2011. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/720194>
- WILLIAMS, P. A.; SAYERS, J. R. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. **Biodegradation**, v. 5, p. 195-217, 1994.
- WHEELER, D. L.; BARRETT, T.; BENSON, D. A.; BRYANT, S. H.; CANESE, K.; CHETVERNIN, V.; CHURCH, D. M.; DICUCCIO, M.; EDGAR, R.; FEDERHEN, S.; FEOLO, M.; GEER, L. Y.; HELMBERG, W.; KAPUSTIN, Y.; KHOVAYKO, O.; LANDSMAN, D.; LIPMAN, D. J.; MADDEN, T. L.; MAGLOTT, D. R.; MILLER, V.; OSTELL, J.; PRUITT, K. D.; SCHULER, G. D.; SHUMWAY, M.; SEQUEIRA, E.; SHERRY, S. T.; SIROTKIN, K.; SOUVOROV, A.; STARCHENKO, G.; TATUSOV, R. L.; TATUSOVA, T. A.; WAGNER, L.; YASCHENKO, E. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 13-21, 2008.
- WONG, H.; SCHOTZ, M. C. The lipase gene family. **J. Lipid Res.**, v. 43, p. 993-999, 2002.
- WU, C.; SUN, B. Identification of a novel esterase from metagenomic library of Yangtze river. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, p. 187-193, 2009.
- YANG, H.; WONG, M. W. Oxyanion hole stabilization by C-H-O interaction in a transition state—a three-point interaction model for *Cinchona* Alkaloid-catalyzed asymmetric methanolysis of meso-cyclic anhydrides. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 135, p. 5808-5818, 2013.
- YUN, J.; RYU, S. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. **Microb. Cell Fact.**, v. 4, 5 p., 2005.
- ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade Microbiana como Indicador de Qualidade do Solo. **Cad. Ciên. Tecnol.**, v. 20, p. 391-411, 2003.
- ZHU, X.; LARSEN, N. A.; BASRAN, A.; BRUCE, N. C.; WILSON, I. A. Observation of an Arsenic Adduct in an Acetyl Esterase Crystal Structure. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 2008-2014, 2003.

ANEXOS

ANEXO 1: Mapa do vetor pCC1FOS

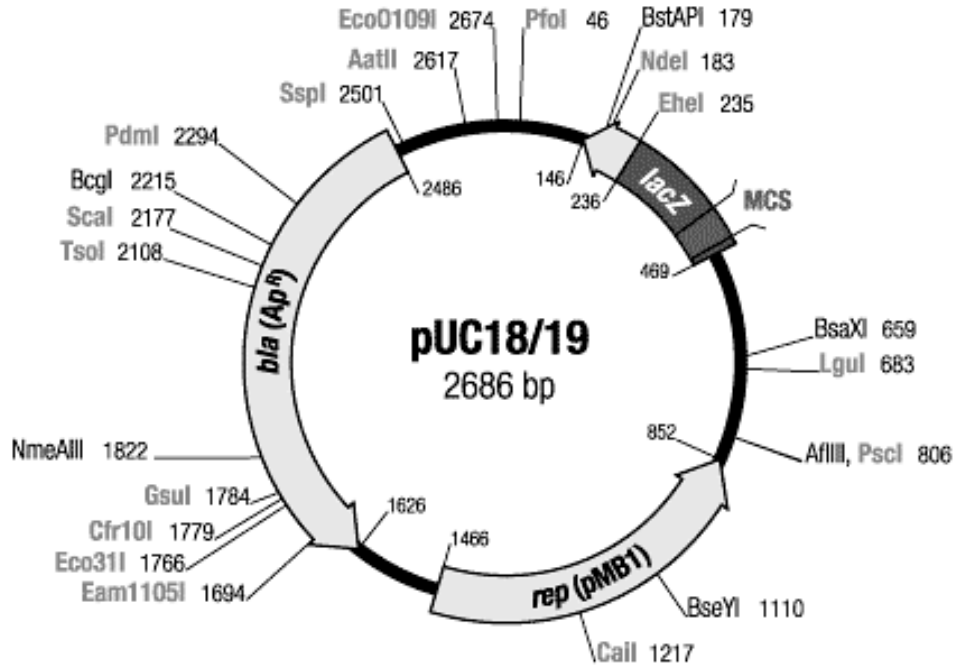


Note: Not all restriction enzymes that cut only once are indicated above. See Appendix E for complete restriction information. Primers are not drawn to scale.

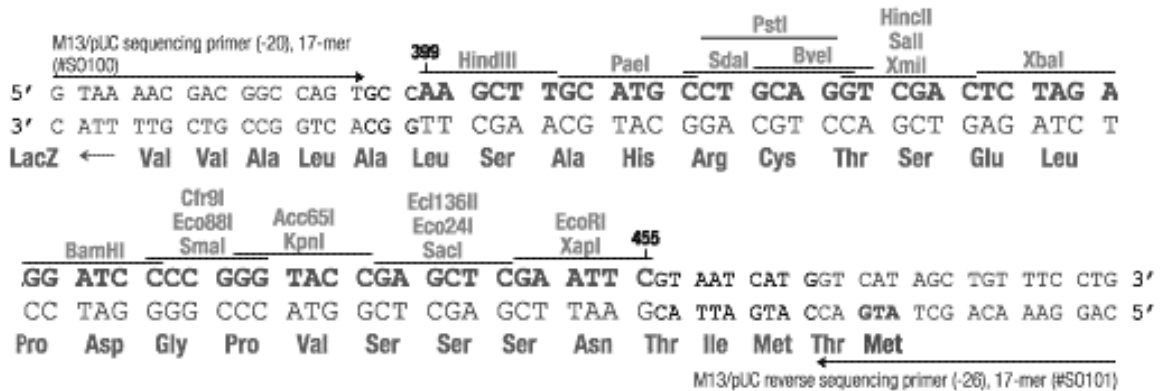


FP = pCC1™/pEpiFOS™ Forward Sequencing Primer 5' GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG 3'
 RP = pCC1™/pEpiFOS™ Reverse Sequencing Primer 5' CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC 3'
 T7 = T7 Promoter Primer 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

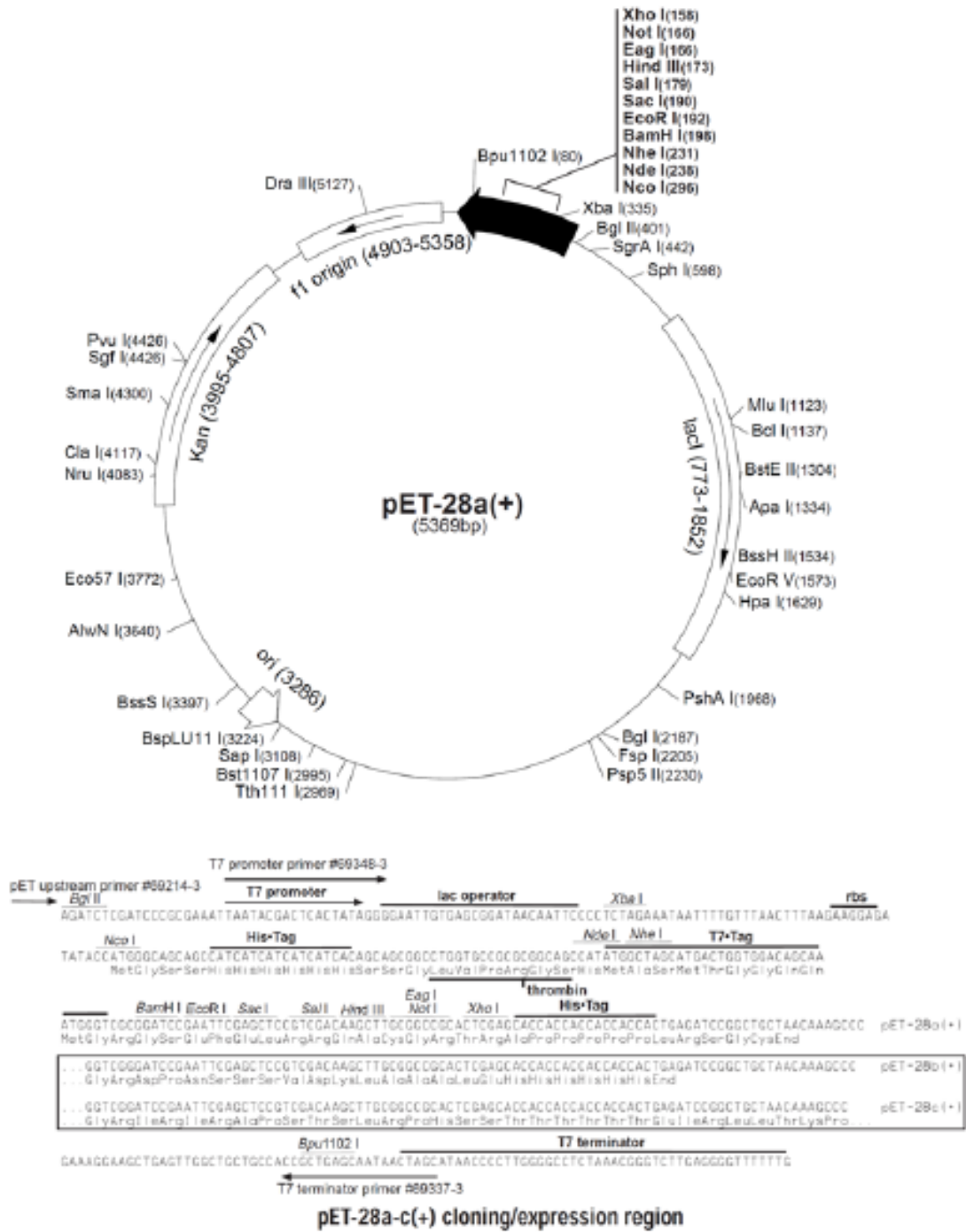
ANEXO 2: Mapa do vetor pUC18



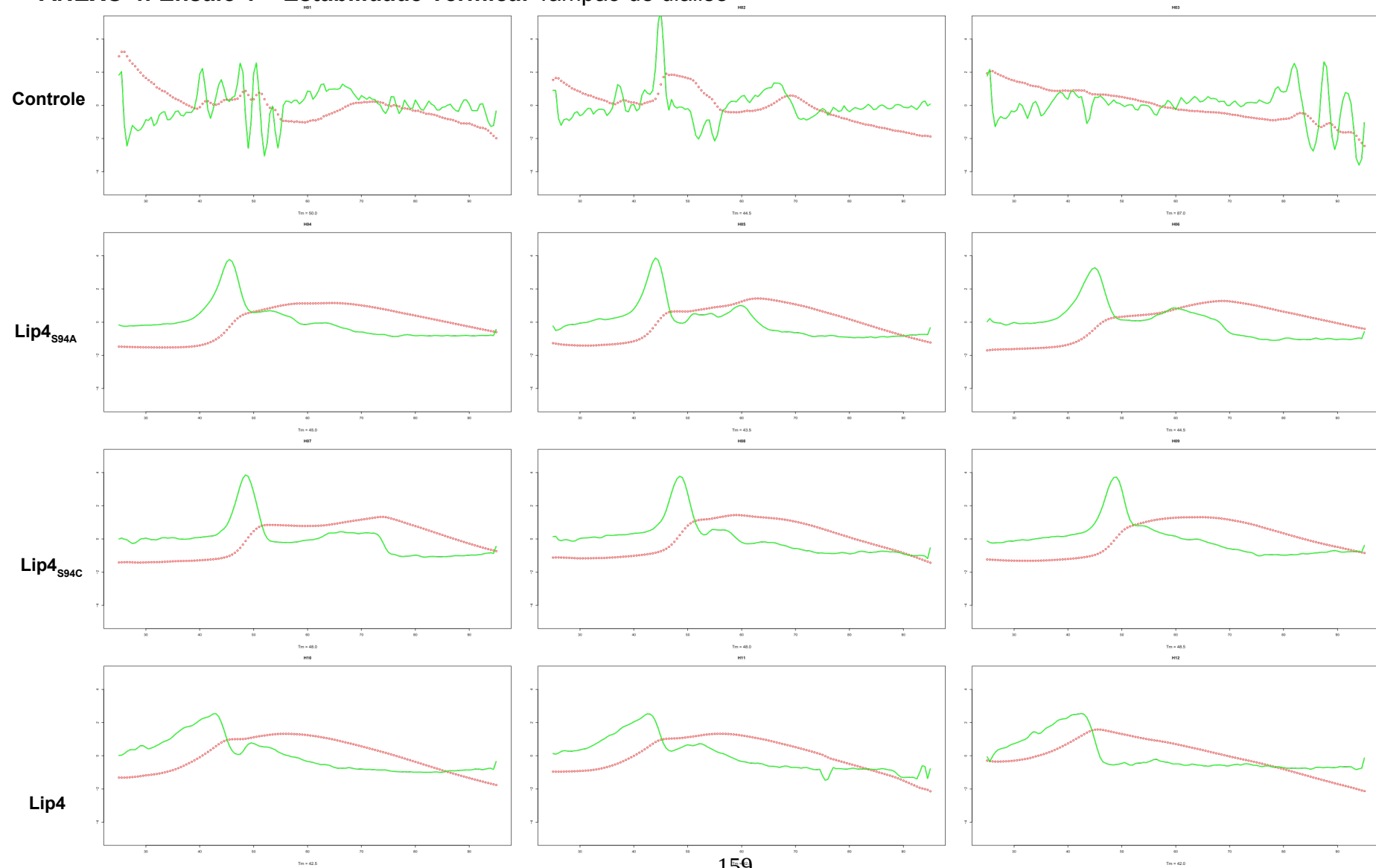
Multiple cloning sites of pUC18



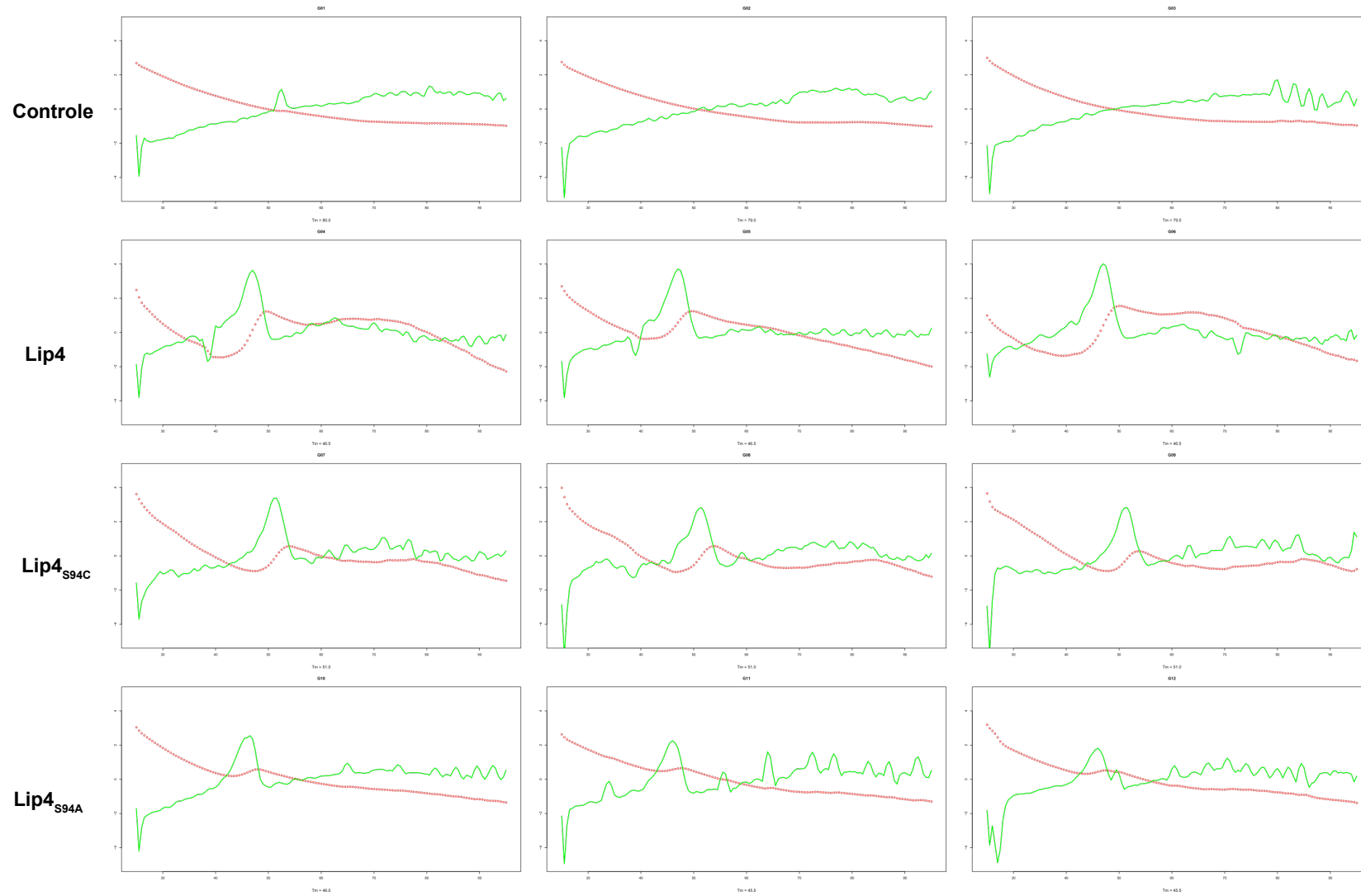
ANEXO 3: Mapa do vetor pET28a



ANEXO 4: Ensaio 1 – Estabilidade Térmica: Tampão de diálise



ANEXO 5: Ensaio 2 – Estabilidade Térmica: Tampão de Atividade com íon Ca^{2+}



ANEXO 6: Ensaio 3 – Estabilidade Térmica: Tampão de Atividade sem adição íon Ca^{2+}

