THAÍS CARVALHO MAESTER

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
FUNCIONAL DE SEQUÊNCIAS GENÔMICAS
CODIFICADORAS DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2015

THAÍS CARVALHO MAESTER

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE
SEQUÊNCIAS GENÔMICAS CODIFICADORAS DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Versão original.

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

Maester, Thaís Carvalho.

Expressão e caracterização estrutural e funcional de sequências genômicas codificadoras de enzimas lipolíticas / Thaís Carvalho Maester. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioquímica de micro-organismos.

Versão do título para o inglês: Expression and functional and structural characterization of genomic sequences encoding lipolytic enzymes.

1. Consórcio Microbiano 2. Esterase 3. Lipase 4. Atividade enzimática I. Lemos, Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB084/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Thaís Carvalho Maester.

Título da Tese: Expressão e caracterização estrutural e funcional de
sequências genômicas codificadoras de enzimas lipolíticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos.

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:

CEUA- COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 022048/14 do trabalho de pesquisa intitulado “Expressão e caracterização estrutural e funcional de sequências genômicas codificadoras de enzimas lipolíticas”, sob a responsabilidade da Profª Drª Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, foi analisado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião no dia 07 de novembro de 2014. O projeto não se enquadra nas responsabilidades da CEUA, visto que não utiliza animais no seu escopo.

Jaboticabal, 07 de novembro de 2014

Profª Dra Paola Castro Moraes
Coordenadora CEUA

Aos meus pais, Maria Helena e Felipe, pelo apoio que foi essencial para a realização deste trabalho, e ao meu noivo, Diogo, pelo carinho e incentivo durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especial e eternamente à minha orientadora Profa. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos, pela confiança depositada e por tantos ensinamentos valiosos que levarei por toda a vida.

À Profa Dra. Andrea Balan, pela colaboração no desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. João Carlos Campanharo pela paciência, amizade e auxílio no laboratório.

Ao Departamento de Tecnologia, da UNESP de Jaboticabal, pela infra-estrutura cedida na execução do trabalho e ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas, pelas *facilities* disponibilizadas.

Às amigas que construí no LBMP, que tornaram os momentos de trabalho muito mais divertidos: Elisângela, Elwi, Erica, Rô e Mariana, companheiros do aquário;

À tia Odete e minha família de São Caetano do Sul, que me hospedaram para que eu pudesse realizar cada etapa deste trabalho;

A todos os meus familiares, principalmente meus irmãos e sobrinhos, que sempre trazem calma na correria da pós-graduação, por todo o amor, carinho e confiança.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com os processos 2011/09064-6 e 2013/03568-8, e realizado no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas (LBMP), no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal.

"Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria."

Santo Agostinho

RESUMO

MAESTER, T. C. **Expressão e caracterização estrutural e funcional de sequências genômicas codificadoras de enzimas lipolíticas**. 2015. 97 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Esterases e lipases possuem características interessantes ao panorama industrial, pois normalmente não requerem cofatores, são estáveis em solventes orgânicos e possuem ampla especificidade de substratos. São utilizadas na produção de biodiesel, fármacos, agroquímicos, na indústria alimentícia, biorremediação, entre outros, sendo constante o interesse em enzimas lipolíticas com propriedades adequadas para fins industriais. Nesse trabalho, a sequência de DNA do clone PL14.H10 de biblioteca metagenômica de consórcio microbiano degradador de óleo diesel foi analisada e quatro genes codificadores de enzimas lipolíticas identificados. Estes genes foram clonados em vetor pET28a e expressos em *Escherichia coli* BL21(DE3), e duas enzimas correspondentes, EST3 e EST5, foram selecionadas para caracterização. Pela análise da sequência, estas enzimas pertencem à família IV e V das enzimas lipolíticas, respectivamente. Apresentaram modelos estruturais da família das α/β hidrolases, com cap-domínio e cavidade interna maior que as dos modelos utilizados, sugerindo capacidade de hidrolisar diferentes triacilgliceróis. A caracterização da atividade foi realizada empregando ésteres de *p*-nitrofenol. A EST3 foi capaz de hidrolisar pNP-ésteres com cadeia acil de até 12 carbonos, embora tenha exibido preferência por substratos de cadeia curta. O valor da relação K_{cat}/K_m para pNP-acetato foi $1533,27 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$. Já a EST5 hidrolisou pNP-ésteres de 2 a 14 átomos de carbono, com maior atividade em pNP-valerato, com K_{cat}/K_m de $1732,3 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$. Ambas as esterases apresentaram o fenômeno da ativação térmica, em que a atividade foi totalmente recuperada após incubação, apesar da queda inicial na atividade. A atividade máxima da EST5 se deu a 45°C , com uma T_m de 47°C , e em pH 7,5. Em pH 9,0 alterações em sua estrutura demonstradas pelos resultados de dicroísmo circular e fluorescência intrínseca dos triptofanos causaram inibição na atividade. A EST3 exibiu atividade máxima em pH 6,0, a 41°C e ainda demonstrou 40% de atividade a 75°C , com uma T_m de $56,5^\circ\text{C}$. Em geral, a atividade das enzimas aumentou na presença de quase todos os íons testados, e a EST5 quase não foi influenciada por Tween 20 e DMSO. Curiosamente, CTAB elevou significativamente a atividade das enzimas e, este perfil não é comum entre as esterases. Foram estáveis em solventes orgânicos principalmente na concentração de 10%. Um dos cristais da proteína EST5 difratou a $2,311 \text{ \AA}$ e futuramente espera-se resolver a estrutura desta proteína. Juntos, os resultados deste trabalho revelaram interessantes características de duas esterases para possíveis aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Consórcio microbiano. Esterase. Lipase. Atividade enzimática

ABSTRACT

MAESTER, T. C. **Expression and functional and structural characterization of genomic sequences encoding lipolytic enzymes.** 2015. 97 p. Thesis Ph.D. (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Esterases and lipases have interesting characteristics at the industrial field, since they do not require cofactors, are stable in organic solvents and have broad substrate specificity. These enzymes are used in the production of biodiesel, pharmaceuticals, agrochemicals, in the food industry and bioremediation. There is a constant interest in lipolytic enzymes showing suitable properties for industrial purposes. Thereby, in this work, the DNA sequence of clone PL14.H10 from a metagenomic fosmid library from a microbial consortium specialized for diesel oil degradation was analyzed and four genes encoding putative esterases/lipases were identified. These genes were cloned into pET28a vector and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), and their corresponding recombinant proteins, designated as EST3 and EST5, were selected for characterization. Through sequence analysis, these enzymes were classified into families IV and V of lipolytic enzymes, respectively. Their structural models showed the α/β hydrolases folding, with a cap-domain and greater internal cavity compared to the models used, suggesting ability to hydrolyze different triacylglycerol. The activity characterization was carried out using *p*-nitrophenol esters. EST3 exhibited activity against *p*NP-esters of different chain lengths and preferential activity against *p*NP-acetate with a k_{cat}/K_m rate of $1533.3 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$. EST5 hydrolyzed *p*NP-esters of acyl chain length from 2 to 14 carbon atoms, with greater activity on *p*NP-valerate, with K_{cat}/K_m rate of $1732.3 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$. Both esterases exhibited the phenomenon called thermal activation, wherein the activity after incubation was fully recovered, despite the initial drop in activity. EST5 activity was optimal at 45°C with a T_m of 47°C, at pH 7.5. At pH 9.0, changes in its structure demonstrated by circular dichroism and intrinsic fluorescence of tryptophan results caused inhibition in the activity. EST3 exhibited maximum activity at 41°C and pH 6.0 and still showed 40% of its activity at 75°C with a T_m of 56.5°C. In general, the activity of these esterases increased in the presence of almost all ions tested. Moreover, EST5 showed no difference in activity in the presence of Tween 20 and DMSO. Interestingly, CTAB significantly increased the activity of EST3 and EST5, and this profile is not common among esterases. They were particularly stable in organic solvents especially at a concentration of 10%. One of EST5 crystals diffracted at maximum of 2.311 Å resolution and is expected to solve the structure of this protein. Taken together, the results presented in this work revealed interesting characteristics that support the EST3 and EST5 further use in biotechnological applications.

Keywords: Microbe consortium. Esterase. Lipase. Enzyme activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol	22
Figura 2 - Representação do enovelamento das α/β hidrolases	24
Figura 3 - Esquema da produção de biodiesel pela catálise química e enzimática.	28
Figura 4 - Esquema da reação de hidrólise do <i>p</i> -nitrofenil éster por enzimas lipolíticas.....	39
Figura 5 - Mapa físico do <i>contig</i> do clone PL14.H10	44
Figura 6 - Dendrograma das relações filogenéticas entre sequências das enzimas identificadas neste trabalho e membros representativos das famílias de enzimas lipolíticas previamente identificados.....	46
Figura 7 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das ORFs deste trabalho com representantes das famílias de enzimas lipolíticas.....	47
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose da amplificação dos genes com oligonucleotídeos iniciadores específicos	49
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a presença do inserto referente às ORFs 4, 5 e 13	50
Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% do extrato celular das proteínas	51
Figura 11 - Análise da expressão e solubilidade das proteínas recombinantes.	52
Figura 12 - Modelo tridimensional da proteína EST3	55
Figura 13 - Expressão e purificação da enzima recombinante EST3	56
Figura 14 - Purificação por filtração em gel e atividade <i>in vitro</i> da EST3	57
Figura 15 - Efeito do pH e temperatura na atividade da EST3	60
Figura 16 - Especificidade da EST3 por diferentes substratos	61
Figura 17 - Efeito de aditivos na atividade da EST3.....	64
Figura 18 - Expressão e purificação da enzima recombinante EST5	66
Figura 19 - Influência do pH na atividade da EST5	68
Figura 20 - Influência da temperatura na atividade da EST5.....	70

Figura 21 - Especificidade da EST5 por diferentes substratos	71
Figura 22 - Efeito de aditivos na atividade da EST5.....	73
Figura 23 - Modelo estrutural da proteína EST5.....	76
Figura 24 - Cristais da proteína EST5, antes e após o refinamento da condição de cristalização e padrão de difração da proteína obtido após a irradiação do cristal.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores de síntese utilizados para amplificação dos genes codificadores de enzimas lipolíticas.....	32
Tabela 2 - Predição das ORFs codificadoras de enzimas lipolíticas identificadas no <i>contig</i> do clone PL14.H10 com o ORF Finder	45
Tabela 3 - Características das proteínas de interesse obtidas a partir do ProtParam	51
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos da enzima EST3 em diferentes substratos pNP-ésteres.	62
Tabela 5 - Efeito de detergentes sobre a atividade enzimática da esterase EST3 ...	65
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos da esterase EST5 em diferentes substratos pNP-ésteres	72
Tabela 7 - Resultados da coleta e processamento dos dados da proteína EST5.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST: *Basic Local Alignment Sequence Tool*

BSA: albumina de soro bovino

CAPS: ácido N-cicloexil-3- aminopropanossulfônico

CAPSO: ácido 3-[ciclohexilamino]-2-hidroxi-1-propanossulfônico

CHES: ácido 2-[N-ciclohexilamino] etanossulfônico

CTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DO₆₀₀: densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados

E.C.: *Enzyme Commission*

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

LB: meio líquido Luria-Bertani

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ORF: Open Reading Frame

PDB: *Protein Data Bank*

PCR: reação em cadeia da polimerase

pI: ponto isoelétrico

p-NP: *p*-nitrofenol

p/v: peso por volume

r.s.m.d: root-mean-square deviation

SDS: dodecil sulfato de sódio

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

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

v/v – volume por volume

LISTA DE UNIDADES

Å: angstrom

°C: graus Celsius

g- aceleração da gravidade

g – grama

kb – kilobase

kDa: kilodalton

L – litro

m– molar

mA: miliampère

mg – miligrama

mL – mililitro

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

ng – nanograma

pb – pares de bases

rpm: rotações por minuto

U – unidades

V - volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Micro-organismos e Biocatalisadores.....	20
2.2 Biocatalisadores e a Metagenômica	21
2.3 Enzimas lipolíticas	22
2.4 Classificação das enzimas lipolíticas.....	24
2.5 Aplicação das enzimas lipolíticas.....	27
3 OBJETIVOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Análise do clone PL14.H10 e identificação de sequências codificadoras de enzimas lipolíticas	31
4.2 Clonagem dos genes em vetor de expressão.....	32
4.2.1 Amplificação dos genes de interesse e digestão das extremidades.....	32
4.2.2 Ligação dos fragmentos ao vetor de expressão	33
4.2.3 Transformação de células de <i>Escherichia coli</i> e sequenciamento.....	34
4.3 Expressão e Extração das proteínas recombinantes.....	34
4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
4.5 Purificação das enzimas lipolíticas	36
4.5.1 Purificação por cromatografia de afinidade a metal	36
4.5.2 Purificação por exclusão molecular (Filtração em gel).....	36
4.6 Zimograma	36
4.7 Ensaios espectroscópicos	37
4.7.1 Dicroísmo Circular	37
4.7.2 Fluorimetria.....	37
4.8 Modelagem estrutural por homologia	38
4.9 Determinação da atividade enzimática.....	38
4.9.1 Efeito do pH sobre a atividade da enzima.....	39
4.9.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	40
4.9.3 Determinação da especificidade da enzima pelo substrato	40
4.9.4 Influência de aditivos sobre a atividade enzimática.....	40
4.9.5 Determinação dos parâmetros cinéticos	41
4.10 Ensaios de Cristalização	41

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Capítulo 1 - Análise da sequência do clone PL14 H10	43
5.1.1 Relações Filogenéticas das sequências obtidas	45
5.2 Capítulo 2 - Clonagem das sequências e expressão das enzimas lipolíticas.....	48
5.2.1 Amplificação e clonagem dos genes no vetor pET28a.....	48
5.2.3 Ensaios de expressão e extração das proteínas recombinantes	50
5.3 Capítulo 3 - Expressão, Purificação e Caracterização da ORF13	53
5.3.1 Características tridimensionais do modelo estrutural da EST3.....	53
5.3.3.1 Efeito de aditivos na atividade da EST3.....	62
5.3.2 Expressão e Purificação da enzima EST3.....	56
5.3.3 Propriedades enzimáticas da EST3.....	58
5.4 Capítulo 4 - Expressão, Purificação e Caracterização da ORF5	65
5.4.1 Expressão e Purificação da enzima EST5.....	65
5.4.2 Determinação da atividade enzimática.....	67
5.4.2.1 Efeito do pH sobre a atividade e estrutura da EST5.....	67
5.4.2.2 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima	69
5.4.2.3 Determinação da especificidade e parâmetros cinéticos da EST5.....	70
5.4.2.4 Efeito de aditivos na atividade da EST5.....	72
5.4.3 Modelo estrutural da EST5	75
5.4.4 Obtenção de cristais e Difração da proteína EST5.....	77
5.4.4.1 Processamento dos dados cristalográficos	78
6 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXOS	
A - Análise do sequenciamento do clone PL14.H10	93
B - Modelo estrutural da esterase EST3	96
C - Resultado da purificação da esterase EST5 por filtração em gel	97

1 INTRODUÇÃO

A versatilidade demonstrada pelas enzimas possibilita seu uso em diversas aplicações (LORENZ; ECK, 2005). A catálise enzimática, quando comparada aos catalisadores químicos, permite economia de energia, resultando em benefícios econômicos, e menor emissão de resíduos industriais que possam vir a comprometer o meio ambiente (LORENZ et al., 2002).

Em 2003, o valor total das vendas de enzimas foi dividido, principalmente, em: detergentes (US\$ 789 milhões), indústria de alimentos (US\$ 634 milhões), agricultura (US\$ 237 milhões), indústria têxtil e produtos químicos (US\$ 222 milhões) (LORENZ; ECK, 2005). De 2012 a 2013 houve crescimento no comércio de enzimas industriais, com um valor estimado em 3,3 bilhões de dólares, sendo o mercado impulsionado principalmente por enzimas de uso doméstico e na área de bioenergia (NOVOZYMES, A. S., 2013). Dentro deste comércio, as enzimas lipolíticas estão atraindo enorme atenção devido ao potencial biotecnológico que possuem (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; LI et al., 2012).

Lipases (EC 3.1.1.3) e esterases (EC 3.1.1.1) são enzimas que atuam em acil ésteres de cadeia longa e de cadeia curta, respectivamente (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Possuem determinadas características que as tornam um grupo de biocatalisadores com vasta aplicação industrial: normalmente não requerem cofatores, são estáveis em solventes orgânicos e possuem ampla especificidade de substratos. Tais características permitem que sejam utilizadas na síntese de biopolímeros, na produção de fármacos, agroquímicos, na indústria alimentícia (JAEGER; EGGERT, 2002) e, recentemente, tem-se destacado seu potencial na biorremediação de rejeitos industriais de origem lipídica e na produção de biodiesel (JEON et al., 2009).

As enzimas lipolíticas são representantes da família das α/β hidrolases, assim como as proteases, desalogenases, peroxidases e epóxido hidrolases, o que faz desta família uma das mais versáteis e com enovelamentos proteicos mais conhecidos (NARDINI; DIJKSTRA, 1999; OLLIS et al., 1990).

Considerando a dificuldade de classificação baseada no mecanismo de reação, Arpigny e Jaeger (1999) propuseram um sistema de classificação para as enzimas lipolíticas bacterianas baseado na similaridade de sequências. Assim, foram classificadas inicialmente em oito famílias, com a família I subdividida em seis

subfamílias. Desde então, novas enzimas lipolíticas tem sido isoladas e novas famílias e subfamílias têm sido propostas, sendo que a abordagem metagenômica teve impacto substancial na busca por novas enzimas. Por meio desta ferramenta, várias enzimas lipolíticas já foram identificadas advindas de diferentes ambientes (CHENG et al., 2014; FU et al., 2013a; HENNE et al., 2000; PRIVÉ et al., 2015).

Apesar de várias esterases e lipases terem sido isoladas nos últimos anos, grande parte permanece descaracterizada (STEELE et al., 2009). Adicionalmente, ainda não estão disponíveis no mercado enzimas que sejam extremamente estáveis em meios não aquosos e com atividade elevada (GLOGAUER et al., 2011). Assim, a utilização da abordagem metagenômica se mostra promissora na busca por enzimas lipolíticas que possam ser utilizadas ou incorporadas em processos industriais, visando melhorias e redução do custo destes processos.

Nesse sentido, a fim de prospectar enzimas de interesse biotecnológico, incluindo enzimas lipolíticas, foi construída no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas (LBMP), na UNESP – Campus de Jaboticabal, uma biblioteca metagenômica de DNA de um consórcio microbiano degradador de óleo diesel. O solo contaminado foi coletado de uma antiga fábrica de lubrificantes localizada na cidade de Ribeirão Preto – SP (ACCORSINI et al., 2012) e foi utilizado para o desenvolvimento de um consórcio microbiano, em meio enriquecido com óleo diesel, (PAIXÃO et al., 2010) e posterior construção da biblioteca. Em trabalho realizado anteriormente (PEREIRA et al., 2015) foram prospectadas enzimas lipolíticas nos 4224 clones da biblioteca, sendo identificados 30 clones positivos.

Assim, devido ao constante interesse em lipases e esterases com propriedades adequadas para fins industriais, nesse trabalho, um clone positivo da biblioteca metagenômica de consórcio microbiano degradador de óleo diesel-PL14.H10 – foi analisado, sendo possível identificar quatro genes codificadores de enzimas lipolíticas. Duas enzimas foram selecionadas e caracterizadas, visando avaliar o potencial biotecnológico das mesmas para futuras aplicações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micro-organismos e Biocatalisadores

A catálise enzimática, quando comparada com a catálise química, é vantajosa em termos da especificidade - químico, região e enantiosseletividade - que as enzimas possuem. Assim, produtos indesejáveis provenientes de reações paralelas, os quais são geralmente produzidos nas reações não enzimáticas, são reduzidos ou totalmente eliminados, elevando o rendimento da reação e facilitando a purificação do produto desejado (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Adicionalmente, são compatíveis com relação à eficiência e superiores quanto à interferência ambiental (FERRER; MARTÍNEZ-ABARCA; GOLYSHIN, 2005; LORENZ et al., 2002; SHELDON; VAN PELT, 2013).

A utilização de micro-organismos e enzimas microbianas pelo homem no processamento de materiais naturais tem uma longa tradição. Esta exploração de produtos microbianos ocorreu naturalmente e foi facilitada pela ubiquidade dos micro-organismos. Atualmente, as enzimas microbianas são as mais utilizadas industrialmente (UCHIYAMA; MIYAZAKI, 2009), pois, entre outros fatores, como facilidade de manipulação genética, independência de fatores sazonais, e facilidade de produção, os micro-organismos que vivem em condições extremas, seja de pH ou temperatura, podem sintetizar enzimas que permitem sua sobrevivências nestes habitats. Desse modo, as enzimas microbianas são utilizadas nos mais diversos processos, como na formulação de detergentes, na indústria alimentícia, manufatura de papel, produção de fármacos, entre outros (LORENZ et al., 2002).

Nesse contexto, os micro-organismos são fundamentais para a Biotecnologia, seja fornecendo produtos naturais ou atuando em bioprocessos e, mais recentemente, surgiu grande interesse em seu material genético. Durante muito tempo, os micro-organismos foram explorados com base no cultivo e isolamento, objetivando as culturas puras. Muitos antibióticos e outras drogas foram produzidos por micro-organismos isolados (KNIGHT et al., 2003) e, ainda hoje culturas puras são utilizadas para biorremediação (LOPES et al., 2014), produção de biocombustíveis (CHOI et al., 2014), de alimentos (ESTEBAN-TORRES et al., 2014), entre outros processos.

De acordo com Torsvik e Ovreas (2002), um grama de solo pode conter até 4000 espécies diferentes. Assim, devido à elevada biodiversidade, (HANDELSMAN et al., 1998; LORENZ et al., 2002), o solo tem sido um dos ambientes mais estudados atualmente. Porém, apenas uma pequena porcentagem das espécies existentes pode ser acessada por técnicas tradicionais dependentes de cultivo. Estima-se que a maioria, aproximadamente 99%, dos micro-organismos existentes não seja cultivável (HANDELSMAN et al., 1998; TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990) e, conseqüentemente, pouco conhecida (HÅRDEMAN; SJÖLING, 2007).

2.2 Biocatalisadores e a Metagenômica

O termo metagenômica foi primeiramente usado por Jo Handelsman e é definido como a aplicação de técnicas moleculares para o estudo de comunidades de micro-organismos diretamente em seus ambientes naturais, sem a necessidade de isolamento e cultivo, em laboratório, das espécies individuais (HANDELSMAN et al., 1998).

Dessa forma, a metagenômica é uma abordagem útil, que permite o acesso aos genomas coletivos de amostras ambientais, sem a necessidade de isolamento e cultivo prévio dos micro-organismos (ROH; VILLATTE, 2008). Bibliotecas de DNA metagenômico tem sido fonte de investigação da diversidade de micro-organismos, além de representar um método com elevado potencial na busca por novas moléculas. Diversos setores industriais estão interessados em explorar micro-organismos não cultiváveis (LIAW et al., 2010) com a intenção de identificar novas enzimas para a catálise industrial.

Diante da crescente consciência com relação aos problemas ambientais, como a alta dos custos de energia, escassez de recursos fósseis, a poluição ambiental e uma economia globalizada, as indústrias têm buscado na biotecnologia ferramentas para a sustentabilidade (LORENZ et al., 2002). Para isso, são necessárias novas enzimas, produtos e processos que podem estar presentes em micro-organismos ainda não cultivados (LORENZ; ECK, 2005). Por meio das técnicas atuais da biotecnologia, diversos biocatalisadores têm sido desenvolvidos, sendo cada vez maior a demanda pela descoberta de novos genes codificadores de produtos de interesse biotecnológico (DAVIDS et al., 2013; VOGET et al., 2003).

A prospecção de enzimas pela abordagem metagenômica resultou na identificação de diversos biocatalisadores, como agarases (VOGET et al., 2003), celulases (REES et al., 2003), proteases (PUSHPAM; RAJESH; GUNASEKARAN, 2011), antibióticos (GILLESPIE et al., 2002), xilanases (VERMA et al., 2014), lipases (LEE et al., 2006) e esterases (GARCIA et al., 2015).

2.3 Enzimas lipolíticas

Triacilglicerol lipases ou simplesmente lipases (E.C. 3.1.1.3) e carboxilesterases ou simplesmente esterases (E.C. 3.1.1.1) pertencem à classe das hidrolases que atuam sobre as ligações éster de ácidos carboxílicos, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol. Em meio aquoso, as lipases são capazes de hidrolisar ésteres, gerando ácido carboxílico e álcool como produto de reação. Na ausência de água, catalisam a reação inversa, sintetizando ésteres de ácido graxo a partir de alcoóis e ácidos carboxílicos.

Esterases e lipases possuem determinadas características interessantes ao panorama industrial, pois normalmente não requerem cofatores, são estáveis em solventes orgânicos e possuem ampla especificidade de substratos. Tais características permitem que sejam utilizadas na síntese de biopolímeros e biodiesel, na produção de fármacos, agroquímicos, indústria alimentícia, biorremediação, entre outros (JAEGER; EGGERT, 2002).

Com o crescente interesse em enzimas lipolíticas, nos últimos anos, diversos genes que codificam esterases e lipases foram identificados a partir de bibliotecas metagenômicas de amostras ambientais, incluindo solo de floresta (FAORO et al.,

2012), sedimento marinho (FU et al., 2011), compostagem (KANG et al., 2011), manguezais (COUTO et al., 2010), rios (WU; SUN, 2009), lagos (RANJAN et al., 2005), lodo ativado (ROH; VILLATTE, 2008), entre outras.

As lipases diferenciam-se das esterases com relação à chamada ativação interfacial, em que uma cadeia polipeptídica hidrofóbica, denominada “lid”, situada na superfície da enzima, recobre o sítio catalítico das lipases. Na presença de substâncias hidrofóbicas, a *lid* é deslocada (conformação aberta), tornando o substrato acessível ao sítio catalítico. Porém, nem todas as lipases possuem *lid* ou apresentam o fenômeno da ativação interfacial (FOJAN et al., 2000). Assim, tem sido classificadas mais com relação à preferência pelo substrato, em que lipases catalisam a hidrólise (e síntese) de acilésteres de cadeia longa (geralmente grupamento acila maior que 10 átomos de carbono), enquanto as esterases hidrolisam ésteres de cadeia mais curta (geralmente com cadeia menor que 10 átomos de carbono) e seguem a cinética de Michaelis-Menten (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Apesar da preferência das lipases por substratos maiores, elas também podem atuar em substratos com cadeias menores, sendo que o mesmo não acontece com as esterases, que atuam apenas em ligações ésteres de ácidos graxos de cadeia curta solúveis em água (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Com relação à estrutura das enzimas lipolíticas, são representantes da família das α/β hidrolases. Este enovelamento é caracterizado por um núcleo de oito folhas β conectadas por α -hélices, para dar a disposição $\alpha/\beta/\alpha$ (Figura 2). Na maioria dos membros da família, as folhas β são paralelas, mas alguns mostram uma inversão nessa ordem, tendo por resultado a orientação antiparalela. Para manter a maquinaria catalítica conservada, ocorreram inserções como alguns resíduos de aminoácidos ou até mesmo domínios completos, dando aos membros desta família uma habilidade impressionante para adaptação e evolução (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

Os resíduos catalíticos são sempre constituídos de uma tríade altamente conservada: o membro nucleofílico (serina, cisteína ou ácido aspártico) é posicionado após a folha β_5 ; um resíduo ácido, é posicionado quase sempre após a folha β_7 ; e uma histidina, situada após a última folha β . O membro nucleofílico está sempre localizado em uma curva acentuada, chamada “cotovelo nucleofílico”, facilitando a aproximação com o substrato. Esta geometria do “cotovelo nucleofílico” contribui na formação do sítio de ligação oxiânion, que é necessário para estabilizar

o estado transitório durante a hidrólise. Este sítio é identificado por uma sequência Sm-X-Nu-X-Sm (SM=pequeno resíduo, X=qualquer resíduo, e Nu=nucleofílico). A histidina é o único resíduo da tríade absolutamente conservado, entretanto, o motivo em que está localizado pode diferir consideravelmente entre os vários membros da família (BORNSCHEUER, 2002; NARDINI; DIJKSTRA, 1999)

Figura 2 - Representação do enovelamento das α/β hidrolases. As α -hélices estão representadas por meio de cilindros brancos e as folhas- β por setas cinzas. A localização da tríade catalítica está indicada pelos círculos pretos.
Fonte: NARDINI; DIJKSTRA, 1999.

Lipases e esterases não diferem com relação ao mecanismo de ação. Quando o substrato é ligado ao resíduo da serina, um intermediário tetraédrico é produzido e estabilizado pelos resíduos His e Asp. Uma molécula de álcool é liberada, formando um complexo acil-enzima. Em um segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila da água, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada (BORNSCHEUER, 2002).

2.4 Classificação das enzimas lipolíticas

As enzimas lipolíticas foram classificadas em fosfolipases, que possuem especificidade de ligação com fosfoglicerídeos, hidrolisando um grupo acila dos mesmos; carboxilesterases, que hidrolisam pequenas cadeias de ésteres com

moléculas ao menos parte solúvel em água e em verdadeiras lipases, que possuem máxima atividade em longas cadeias de triglicerídeos insolúveis (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Considerando a dificuldade de classificação baseada no mecanismo de reação, estes mesmos autores as classificaram de acordo com suas sequências, motivos conservados e algumas propriedades biológicas. Sendo assim, de acordo com este sistema de classificação, as lipases e esterases de origem bacteriana foram classificadas em oito famílias distintas.

A família I é representada pelas lipases verdadeiras e é subdividida em seis sub-famílias. Os membros da sub-família I.1 apresentam elevada similaridade de sequências com a lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta sub-família inclui enzimas de *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *P. wisconsinensis* e *Proteus vulgaris* e possuem tamanho molecular em torno de 30 a 32 kDa.

A subfamília I.2 é representada por proteínas com tamanho molecular um pouco maior, de 33 kDa, inclui enzimas de micro-organismos dos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas* e possuem, além da tríade catalítica, ligação a íons Ca^{+2} intermediada por dois resíduos de aspartato conservados, localizados próximos à tríade catalítica. Outra característica comum é a presença de dois resíduos de cisteína, adjacentes ao sítio ativo, que formam uma ponte dissulfeto e provavelmente, em conjunto com o sítio de ligação a íons cálcio, têm papel na estabilização do sítio ativo. A expressão de lipases ativas destas duas subfamílias depende da presença de uma proteína chaperona denominada foldase lipase-específica ("Lif").

A sub-família I.3 contém enzimas das espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia marcescens*. Estas lipases possuem tamanho molecular entre 50 a 65 kDa, e a ausência dos resíduos de cisteína e de um peptídeo sinal N-terminal. A sub-família I.4 agrupa lipases das espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* e é representada por enzimas com tamanho molecular de 20 kDa e baixo percentual de similaridade, em torno de 15%, com as enzimas da sub-família I.5, que é representada por lipases do gênero *Staphylococcus* e de outras espécies de *Bacillus*, com tamanho molecular de 45 a 75 kDa e apresentam como característica comum a substituição da primeira glicina do pentapeptídeo conservado por alanina. Por último estão as lipases que possuem similaridade com as enzimas de *Propionibacterium acnes* e *Streptomyces cinnamoneus*, representando a sub-família I.6.

As enzimas agrupadas na família II (GDSL) não apresentam o pentapeptídeo G-X-S-X-G convencional, mas sim, um resíduo de aspartato e outro de leucina na adjacência do resíduo ativo de serina, que está muito mais próxima da extremidade N-terminal do que em outras enzimas lipolíticas. As hidrolases desta família apresentam propriedades multifuncionais e ampla especificidade de substrato, devido à flexibilidade do sítio ativo que sofre uma mudança conformacional sobre a ligação do substrato (OKAMURA et al., 2010). A família III contém lipases extracelulares de *Streptomyces sp.* e *Moxarella sp.* e possuem o enovelamento das α/β hidrolases com a tríade catalítica comum (Ser-Asp-His), e a capacidade de hidrolisar poliésteres.

A família IV engloba lipases que apresentam similaridade com lipases hormônio-sensíveis de mamíferos (HSL, do inglês *Hormone Sensitive Lipase*). Esta família é constituída por várias esterases de micro-organismos distantemente relacionados, incluindo psicrófilos, mesófilos e termófilos (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Porém, enquanto HSL humanas possuem ampla especificidade de substratos, as enzimas bacterianas desta família têm preferência por substratos de cadeia curta, como a tributirina. Além disso, com a resolução da estrutura de esterases dessa família, foi constatada a presença de um “cap-domínio”, envolvido com o controle da entrada de substratos até o sítio catalítico (HAUSMANN; JAEGER, 2010).

Membros da família V mostram semelhanças com várias enzimas bacterianas não lipolíticas como epóxido hidrolases, dehalogenases e haloperoxidases. Poucas enzimas dessa família foram caracterizadas. A família VI reúne as menores lipases, com 23 a 26 kDa. A forma ativa dessas enzimas é um dímero com a clássica tríade catalítica e o enovelamento das α/β hidrolases. As enzimas da família VII possuem tamanho molecular em torno de 55 kDa, e atuam em substratos com diferentes propriedades, como poliuretano (KANG et al., 2011). Já os membros da família VIII possuem semelhanças estruturais com as β -lactamases, possuem em torno de 40 kDa e podem diferir nos resíduos do sítio ativo.

Apesar deste sistema de classificação ser muito utilizado, novas enzimas lipolíticas tem sido isoladas e identificadas de diversos ambientes e novas famílias têm sido propostas. É o caso da família LipEH166, em que uma lipase alcalina, que atua em baixas temperaturas, não demonstrou similaridade de sequência com nenhuma enzima conhecida, exceto na região de consenso, sendo então proposto

pelos autores a criação de uma nova família (KIM et al., 2009). Outro exemplo foi a criação da família X das enzimas lipolíticas, já que a análise da sequência da enzima LipR revelou que ela possui quatro motivos conservados únicos que a distinguem de outras famílias já descritas (BASSEGODA; PASTOR; DIAZ, 2012).

2.5 Aplicação das enzimas lipolíticas

Historicamente, a aplicação mais conhecida das lipases é na formulação de detergentes. Empresas como Novozymes e DuPont desenvolveram detergentes utilizando lipases bacterianas em sua formulação, como o Lumafast™, a partir de *Pseudomonas mendocina* e Lipomax™, a partir de *Pseudomonas alcaligenes* (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Uma aplicação de destaque das enzimas lipolíticas é para obtenção de fármacos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois as lipases são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica em que apenas um deles (R ou S) apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico (LONG et al., 2007). Uma esterase de *Bacillus subtilis*, RRL BB1, exibiu elevada enantiosseletividade (aproximadamente 99%) em uma mistura racêmica com derivados acil de precursores de drogas (MAQBOOL et al., 2002, 2006).

Enzimas lipolíticas ganharam notoriedade recentemente por sua aplicação na produção de biodiesel. Este biocombustível, em comparação com os combustíveis derivados do petróleo, é menos tóxico e mais facilmente biodegradado devido a sua composição menos complexa, sendo então considerado uma fonte energética sustentável (RÖTTIG et al., 2010). Para sua produção, é utilizada uma fonte de óleos/gorduras de origem animal ou vegetal e um álcool de cadeia curta, gerando o biodiesel e glicerol como subproduto (PEREIRA et al., 2012), conforme ilustrado na Figura 3.

Na indústria de alimentos, as lipases podem ser utilizadas como aditivos na produção de queijos, acelerando o processo de maturação, esterificação de gorduras e óleos, na hidrólise da gordura do leite e no desenvolvimento de aromas e sabores (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). A lipase Est_p6 de metagenoma marinho, ao hidrolisar a gordura do leite, produziu eficientemente os ácidos mirístico e palmítico, responsáveis por dar sabor a alimentos lácteos (PENG et al., 2014).

Figura 3 - Esquema da produção de biodiesel pela catálise química e enzimática.

Já na biorremediação, a esterase termoestável Sys410 foi capaz de degradar o inseticida piretróide aplicado em plantações, evidenciando seu potencial na biorremediação de ambientes contaminados (FAN et al., 2012). A esterase CN1E1, ativa em baixas temperaturas, mostrou grande atividade na hidrólise de

hidrocarbonetos poliaromáticos (fenantreno, antraceno, naftaleno, etc). Os resultados sugerem que esta esterase de largo espectro pode ser utilizada na biorremediação de poluentes recalcitrantes, contaminação por petróleo, e de pesticidas (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2014).

As propriedades bioquímicas demonstradas por lipases e esterases tornam possível sua utilização para diversas finalidades. Novas enzimas lipolíticas têm sido isoladas com o objetivo de se obter um biocatalisador robusto e versátil dentro da finalidade proposta. Contudo, poucas enzimas lipolíticas estão disponíveis no mercado exibindo extrema estabilidade em meios não aquosos e com elevada atividade (GLOGAUER et al., 2011). Sem dúvida, a pesquisa sobre enzimas lipolíticas continua a ser um campo fascinante com muitas enzimas novas para serem descobertas.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a caracterização de enzimas lipolíticas provenientes de biblioteca metagenômica de consórcio microbiano degradador de óleo diesel. Neste sentido, os seguintes objetivos específicos são definidos para atingir o objetivo geral:

- Identificar e selecionar as sequências codificadoras de enzimas lipolíticas do clone da biblioteca metagenômica de consórcio microbiano degradador de óleo diesel;
- Classificar as sequências encontradas entre as famílias de enzimas lipolíticas;
- Clonar os genes codificadores de enzimas lipolíticas em vetor de expressão;
- Expressar as proteínas de interesse na fração solúvel e purificá-las;
- Caracterizar a atividade das enzimas, como efeitos da variação de pH, temperatura, influência de íons, solventes orgânicos, detergentes e substratos, assim como parâmetros cinéticos;
- Realizar a análise espectroscópica das proteínas utilizando dicroísmo circular e fluorescência intrínseca do triptofano;
- Construir modelos das estruturas tridimensionais das proteínas através das análises de bioinformática;
- Realizar ensaios de cristalização das enzimas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análise do clone PL14.H10 e identificação de sequências codificadoras de enzimas lipolíticas

Em experimentos anteriores, foi construída uma sub-biblioteca *shotgun* com 464 subclones, em vetor pUC19, do clone PL14.H10, que havia demonstrado atividade pela formação de halo de hidrólise em meio Luria-Bertani (LB) contendo 1% de tributirina como substrato (Sigma-Aldrich, San Louis, Missouri, Estados Unidos da América) (PEREIRA et al., 2015).

A fim de identificar os genes responsáveis pela atividade lipolítica constatada *in vitro*, os fragmentos de DNA plasmidial extraídos do clone da sub-biblioteca foram sequenciados em microplacas nas seguintes condições: 1 µL de DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), 10 pmoles do oligonucleotídeo iniciador M13, sendo que as reações foram feitas separadamente para *Forward* e *Reverse*, 3 µL de tampão 2,5X (400 mM de Tris-HCl, pH 9, e 10 mM de MgCl₂), 100 a 120 ng de DNA e água deionizada esterilizada para completar um volume de 10 µL. As placas foram levadas ao termociclador e submetidas ao ciclo: desnaturação a 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 55 °C por 2 minutos, 72 °C por 3 minutos; ciclo final de extensão de 72 °C por 10 minutos; onde permaneceram a 4 °C até serem retiradas.

O sequenciamento foi realizado no equipamento ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América) e os eletroferogramas gerados analisados com o auxílio de programas do pacote Phred/Phrap/Consed (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) para a limpeza e remoção dos vetores e agrupamento das sequências *Forward* e *Reverse* (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) gerando sequências consenso conhecidas como *contigs*. Com o auxílio de outro programa, ContGEN, foram selecionadas somente aquelas sequências que apresentaram mais de 350 bases com qualidade Phred ≥ 20 .

Para a anotação gênica foi utilizado o programa *Open Reading Frame Finder* (ORF Finder) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>) e as ORFs (*Open Reading Frames*) encontradas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do próprio NCBI. A predição da função foi realizada através do Blastx, no banco de

dados nr (proteínas não redundantes), no qual sequências de aminoácidos no formato FASTA são comparadas com sequências homólogas de proteínas depositadas no banco de dados.

Para análise das relações filogenéticas, as sequências distintas de aminoácidos foram alinhadas usando o ClustalW, através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7 (HALL, 1999). Os dendrogramas foram construídos com o auxílio do programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2011) usando o algoritmo do vizinho mais próximo *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), com *bootstrap* de 1000.

4.2 Clonagem dos genes em vetor de expressão

4.2.1 Amplificação dos genes de interesse e digestão das extremidades

Uma vez identificadas as ORFs codificadoras de enzimas lipolíticas do clone PL14.H10, procedeu-se com a clonagem das sequências selecionadas em vetor de expressão pET28a. Para isso, foram desenhados pares de oligonucleotídeos iniciadores de síntese (*primers*) com sítios de restrição adequados nas regiões inicial e final do gene para a clonagem direcional, além da inserção de uma cauda com poli-histidinas na região N-terminal que permite a purificação do produto por meio da cromatografia de afinidade a metal (tabela 1).

Tabela 1 - Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores de síntese utilizados para amplificação dos genes codificadores de enzimas lipolíticas.

Proteína	Enzima de restrição	Oligonucleotídeos* (Sequência 5' - 3')	TM	Tamanho do fragmento
ORF1	F_EcoRI	TCGGAATTCCGTATGCCCAAGGTCAA	66,2	1251 pb
	R_XhoI	GCAACTCGAGTTTCAACGGCGGAAGC	69,3	
ORF2	F_EcoRI	GATGAATTCCTCATGACCGTCAACAT	64,6	912 pb
	R_XhoI	AGGTCTCGAGCCTTATTCCGCGG	68,1	
ORF3	F_EcoRI	GAAAAGAATTCCAGATGGCACTCGATCC	66,1	939 pb
	R_HindIII	ACCGGAAGCTTCCTCATGCCAGCG	69,7	
ORF4	F_EcoRI	TTTGAATTCTCCATGCCGCAGGTCAA	64,6	909 pb
	R_XhoI	ATGGCTCGAGGATCACTCCGC	66,5	

TM = Temperatura de pareamento

* Sítios de restrição estão sublinhados

A fim de amplificar os genes de interesse foram realizadas reações de PCR com os oligonucleotídeos específicos, nas seguintes condições: 2 µL de Tampão 10X [Tris-HCl 200 mM, pH 8,8; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 100 mM KCl; 1% (v/v) Triton X-100, 1 mg/mL de BSA (Fermentas, Burlington, Ontário, Canadá)]; 16 mM de MgCl₂; 4 mM de dNTP; 50 ng de DNA fosmidial do clone PL14.H10; 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*); 1 U da enzima *Pfu* DNA Polimerase (Fermentas) e água ultra pura para totalizar o volume final de reação de 20 µL. As reações foram submetidas ao seguinte programa no termociclador: passo inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de 95 °C por 45 s, 55 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e 30 s; extensão final a 72 °C por 5 min e estocadas a 4 °C.

Os produtos resultantes da PCR foram purificados para eliminar bandas inespecíficas. Para isso, todo o produto obtido foi submetido à eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 1%, isento de brometo de etídio, sendo a região correspondente às bandas de interesse cortadas e retiradas do restante do gel. A eluição da banda selecionada foi feita seguindo com o kit Wizard Plus SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos Da América) de acordo com instruções do fabricante.

Depois da purificação, os fragmentos obtidos na PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* ou *EcoRI* e *XhoI*, de acordo com a construção presente em cada proteína, conforme apresentado anteriormente na tabela 1. Todas as reações de digestão foram realizadas segundo as instruções do fabricante e a quantificação feita em aparelho NanoDropTM 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, Estados Unidos da América).

4.2.2 Ligação dos fragmentos ao vetor de expressão

O vetor pET28a (Novagen, Gibbstown, New Jersey, Estados Unidos da América) foi digerido com enzimas de restrição de modo a apresentar extremidades compatíveis com os genes amplificados por PCR, de acordo com o descrito na tabela 1. Assim, vetor e insertos foram submetidos a uma reação de ligação para produção do DNA recombinante, realizadas seguindo o protocolo de Sambrook e Russel (2001), utilizando T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos da América) na proporção de 3:1 (inserto:vetor).

4.2.3 Transformação de células de *Escherichia coli* e sequenciamento

O volume resultante da reação de ligação foi utilizado para transformação da linhagem celular *Escherichia coli* DH5- α , sendo que as colônias obtidas foram inoculadas em meio LB contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina para extração plasmidial pelo kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Os genes clonados foram sequenciados. Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram os mesmos da reação de amplificação nas seguintes condições: 1 μL de BigDye Terminator (Applied Biosystems); 3 μL de Tampão 5X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl_2); 5 pmoles do oligonucleotídeo (*forward* ou *reverse*); 50 a 100 ng de DNA e água deionizada esterilizada para completar o volume de 10 μL . Após o sequenciamento, os eletroferogramas dos clones foram analisados conforme descrito no item 4.1.

Os DNAs dos clones obtidos foram transformados por choque térmico em linhagens de *E. coli* BL21(DE3) para a expressão das proteínas de interesse individualmente. A confirmação da clonagem foi feita através da reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos do vetor pET28 e a visualização do resultado foi feita eletroforese em gel de agarose 1%.

4.3 Expressão e Extração das proteínas recombinantes

Inicialmente foi realizado o teste de expressão das proteínas de interesse. Para isso, uma colônia isolada da *E. coli* BL21(DE3) transformada foi inoculada em 50 mL de meio de cultura LB com canamicina a 50 $\mu\text{g/mL}$, que permaneceu sob agitação durante 16 horas, 37 °C, 200 rpm. Alíquotas de 2 mL foram inoculadas em frascos contendo 200 mL de meio LB com o antibiótico, que permaneceram sob agitação de 200 rpm, 37 °C, até atingir a fase logarítmica de crescimento, com D.O_{600} entre 0,4 e 0,6. Após, a indução foi feita adicionando 0,1 mM de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo) à cultura, que permaneceu nas mesmas condições descritas por 2 horas.

Foram coletadas alíquotas de 1 mL da cultura no tempo zero (T_0 - antes da indução) e no tempo 2 (T_2 - 2 h após a indução) e centrifugadas por 10 min a 1699 x g, para que fosse possível analisar a expressão da proteína de interesse em

comparação às proteínas totais. Após confirmar a expressão, diferentes condições foram testadas, com variações na temperatura, tempo de incubação, aeração (volume de meio de cultura por frasco tipo erlenmeyer) e concentração de IPTG. Uma vez determinada a melhor condição de expressão de cada proteína, ensaios de expressão em volumes maiores foram realizados, seguindo o procedimento descrito anteriormente.

Para a extração das proteínas, as células foram coletadas por centrifugação a 11953 x *g* por 20 min. A extração iniciou-se pela homogeneização do precipitado no tampão de extração (Tris-HCl 10 mM, pH 8; NaCl 100 mM; 10% de glicerol), acrescido de 10 mg/mL de Lisozima, sendo 10 mL do tampão por litro de cultura. Após 30 minutos no gelo, as células foram rompidas por ultrassom em aparelho Branson Sonifier 250 (Branson, Connecticut, Estados Unidos da América), com 30% da razão cíclica por até 3 min com intervalos de 20 s. As amostras foram submetidas à centrifugação por 20 min, a 4 °C, 38724 x *g*, para separação de extratos solúveis e insolúveis. O *pellet* celular foi diluído novamente no tampão de extração, 5 mL por litro de cultura, seguido de um novo ciclo em aparelho ultrassônico e centrifugação nas mesmas condições anteriores.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise da expressão das proteínas foi realizada através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 10% - SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), com o sistema mini-protean (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos da América). A corrida foi realizada a 20 mA, com o tampão de corrida Tris-Glicina [50 mM de Tris-HCl; 150 mM de Glicina e 0,1% de SDS (p/v)]. O preparo das amostras ocorreu com a adição do tampão de amostra 2X e fervura por 10 min a 95 °C e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue [40% de metanol (v/v); 10% de ácido acético glacial (v/v) e Coomassie R-250 a 0,1% (p/v)] e descorado em solução contendo 10% de ácido acético (v/v) e 10% de etanol (v/v). Cada etapa da obtenção da proteína foi analisada individualmente por meio de SDS-PAGE.

4.5 Purificação das enzimas lipolíticas

4.5.1 Purificação por cromatografia de afinidade a metal

Os extratos celulares obtidos na fração solúvel foram submetidos a purificação por cromatografia de afinidade a metal. A resina utilizada, Ni-NTA Agarose (Qiagen, Venlo, Limburgo, Holanda), é carregada com níquel, o que permite a purificação de proteínas com cauda de histidina (6xHis tag). Assim, foram acrescentados ao Tampão de extração, descrito no item 4.3, para lavagem da coluna de polipropileno (Bio-Rad) e eluição da proteína, um gradiente de imidazol (de 20 mM a 1 M), que também possui afinidade pelo níquel, compete com os aminoácidos da histidina pela ligação à resina e possibilita a eluição da proteína.

4.5.2 Purificação por exclusão molecular (Filtração em gel)

As frações de interesse coletadas da purificação por afinidade foram concentradas em concentrador para centrifugação Amicon Ultra, MWCO 30 kDa (Merck MilliPore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos da América). O material eluído e concentrado foi submetido à purificação por filtração em gel em aparelho Akta FPLC Purifier UPC 100, filtro de 280 nm e célula de fluxo de 0,5 mm, com a coluna HiLoad Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) em geladeira a 4 °C. O equilíbrio da coluna foi feito com dois volumes do tampão (20 mM de Tris-HCl, pH8,0; 50 mM de NaCl), com as amostras coletadas em uma fração de 0,7 mL/min.

O resultado foi analisado pela formação do pico baseado em um padrão de proteínas: Conalbumina, Anidrase Carbônica, Ribonuclease, Aprotinina e Ovoalbumina.

4.6 Zimograma

A detecção da atividade da proteína purificada no gel de SDS-PAGE foi realizada por meio de um zimograma, utilizando tributirina como substrato (OH et al., 1999). Para isso, a amostra aplicada no gel não foi fervida e o SDS removido após a eletroforese com agitação suave do gel, inicialmente por 10 minutos em tampão Tris-

HCl, 50 mM, pH 8,0, contendo 1% de Triton X-100, e então mais duas vezes em tampão isento de detergente.

Posteriormente, o gel foi posicionado sob uma emulsão de ágar com tributirina para detecção da atividade lipolítica da banda da proteína, e incubada a 30 °C até o aparecimento dos halos de hidrólise. A emulsão de ágar com o substrato foi preparada com 1,3% (p/v) de ágar, 1% (v/v) de tributirina e 25 mM de Tris-HCl, pH 8,0. Uma metade do gel de eletroforese foi utilizada para o zimograma enquanto a outra metade foi corada com Coomassie Brilliant Blue (GLOGAUER et al., 2011).

4.7 Ensaios espectroscópicos

4.7.1 Dicroísmo Circular

A análise da estrutura secundária foi realizada pela técnica de Dicroísmo Circular (CD) no Espectropolarímetro JASCO-810 (Jasco Corporation, Tóquio, Japão) com o controlador de temperatura Peltier Type Control System PFD425S. Para avaliar a influência do pH sobre a estrutura das enzimas, os ensaios foram realizados em tampões com diferentes pH. O experimento prosseguiu na temperatura constante de 10 °C, com 30 *scans* consecutivos, em cubeta de quartzo de 0,1 mm de caminho óptico, no comprimento de onda de 260 a 195 nm, e os espectros da média entre as medidas armazenados. Os dados foram corrigidos, descontando-se a interferência do tampão.

Para avaliação da termoestabilidade das proteínas foram usados ensaios de desenovelamento térmico, monitorado no comprimento de onda de 222 nm, entre as temperaturas de 20 °C a 110 °C; com intervalo entre as coletas de 0,5 °C. A temperatura de transição do desenovelamento (T_m) foi assumida como a temperatura do ponto de inflexão da curva de desnaturação e, os dados foram plotados e tratados pelo programa Origin 8.0 (Origin Lab Corporation, Copyright 1991-2007) segundo ajuste não linear para T_m .

4.7.2 Fluorimetria

Para avaliar a conformação da proteína ao variar seu ambiente pelos diferentes tampões empregados, empregou-se a técnica da fluorescência intrínseca

dos triptofanos, utilizando o aparelho ISS K2 Multifrequency Phase Fluorometer (ISS Inc., Champaign, Illinois, Estados Unidos da América). As medidas foram realizadas com o comprimento de onda de emissão entre 300 a 400 nm e cubeta de quartzo com caminho óptico de 1x1 cm. As medidas foram feitas a 25 °C, com 1 µM de proteína, calculado de acordo com o coeficiente de extinção.

4.8 Modelagem estrutural por homologia

A busca e escolha de proteínas molde com similaridade estrutural às proteínas de interesse foi realizada utilizando-se os programas BLAST *versus* PDB (Protein Data Bank). As coordenadas atômicas das estruturas com maior identidade de sequências de aminoácidos foram usadas para a modelagem comparativa, com o programa Modeller 9.10 com parâmetros *default* (SALI; BLUNDELL, 1993). Alinhamentos múltiplos das sequências foram realizados com o programa ClustalW. Sobreposições estruturais foram realizadas com o programa COOT (EMSLEY et al., 2010). O software PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC) foi utilizado na visualização dos modelos tridimensionais das proteínas e para montagem das figuras.

4.9 Determinação da atividade enzimática

A atividade das enzimas foi determinada pela medida da quantidade de *p*-nitrofenol liberado a partir da reação da enzima com o éster de *p*-nitrofenila (Figura 4). A hidrólise da ligação éster entre a cadeia acila e o *p*-nitrofenol libera o íon fenolato que, em pH neutro a básico, possui cor amarela, e pode ser medida pelo aumento da absorbância a 405 nm (BÜLOW; MOSBACH, 1987) ou 348 nm quando em pH ácido - ponto isobéptico, em que espécies químicas diferentes possuem a mesma absorvidade molar, nesse caso, as formas ácida e básica do *p*-nitrofenol (RHEE et al., 2005).

Figura 4 - Esquema da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil éster por enzimas lipolíticas.

*R: radical acil de diferentes tamanhos de cadeias de carbono.

Os substratos foram diluídos em acetonitrila:isopropanol (1:4 v/v) a 100 mM e estocados a -20 °C. O ensaio padrão, a menos que especificado de outra forma, constitui-se de: 1 mM de *p*NP-éster, em um tampão de reação a 50 mM contendo 0,3% (v/v) de Triton X-100; a enzima foi preparada em uma solução trabalho composta de 20 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0 e 10 mM de NaCl; o volume final da reação foi de 100 µL e o ensaio medido por pelo menos 15 min a 30 °C em um espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax® M2e Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Califórnia, Estados Unidos da América) (FAORO et al., 2012).

Regressões lineares para determinação das velocidades iniciais de reação assim como o cálculo do desvio padrão foi feito no programa Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Estados Unidos da América), considerando-se o coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol para cada reação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e como controles foram utilizados sistemas de reação nas mesmas condições sem a presença de enzima.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 µmol de *p*-nitrofenol produzido por minuto.

4.9.1 Efeito do pH sobre a atividade da enzima

O efeito do pH foi investigado medindo-se a atividade enzimática em tampões com diferentes valores de pH. Foram testados: citrato (pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0); fosfato (pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0); Tris-HCl (pH 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0); TAPS (pH 8,0, 8,5 e 9,0); CAPS (pH 9,5, 9,7, 10, 10,5 e 11), CAPSO (9,5 e 10) e glicina-

NaOH (pH 9,0, 9,5, 10,0 e 10,5), conforme ensaio padrão descrito anteriormente. O aumento da absorbância foi monitorado a 348 nm, para que a absorbância não fosse refletida com a variação do pH do meio

4.9.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

A atividade das enzimas em diferentes temperaturas foi determinada medindo-se a atividade de 18 a 75 °C, no ensaio padrão. A reação foi realizada em placa de PCR de 96 poços em termociclador (Biometra, Göttingen, Niedersachsen, Alemanha) configurado no modo gradiente de temperatura. Após o término do tempo determinado de incubação, 25 µL da reação foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, contendo 75 µL dos respectivos tampões a 20 mM em cada poço.

A termoestabilidade foi determinada pela medição da atividade enzimática residual após incubação da solução da enzima em diferentes temperaturas, na faixa de 0 °C a 80 °C, por até 4 h, no termociclador em modo gradiente. Após o término do tempo de incubação, os tubos foram resfriados em gelo e a atividade residual foi determinada após leitura ao adicionar a enzima no meio de reação.

4.9.3 Determinação da especificidade da enzima pelo substrato

A especificidade pelo substrato foi determinada utilizando os substratos *p*-nitrofenil acetato (C2); *p*-nitrofenil butirato (C4); *p*-nitrofenil valerato (C5); *p*-nitrofenil octanoato (C8); *p*-nitrofenil decanoato (C10); *p*-nitrofenil dodecanoato (C12); *p*-nitrofenil miristato (C14); e *p*-nitrofenil palmitato (C16) (Sigma-Aldrich), no ensaio padrão de determinação da atividade. Antes da utilização, os substratos foram incubados em banho a 60 °C por 1 hora, para a completa homogeneização da solução.

4.9.4 Influência de aditivos sobre a atividade enzimática

Os efeitos da presença de vários reagentes sobre a atividade enzimática foram investigados através da medição da atividade residual na condição padrão de reação de cada enzima, após 5 min de pré-incubação da solução enzimática com cada reagente. A atividade sem a presença de qualquer aditivo foi definida como

100%. Para analisar o efeito dos sais e íons metálicos, CaCl_2 , Li_2SO_4 , MnSO_4 , NiCl_2 , CuSO_4 , CoCl_2 , MgSO_4 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, FeSO_4 , NaCl ou KCl foi adicionado à solução de enzima. A ação de detergentes, tais como Tween 20, Tween 80 e Triton X-100 a 1%, e 5% (v/v) sobre a atividade enzimática, também foi investigada. Dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) foram testados nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM (p/v). A estabilidade das enzimas na presença de glicerol e solventes orgânicos foi avaliada através da medição da atividade residual após incubação da solução de enzima com o aditivo durante 5 min.

4.9.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para obter os parâmetros catalíticos K_m (Constante de Michaelis-Menten), V_{max} (Velocidade máxima da reação), K_{cat} (Constante catalítica) e $K_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}$ (Eficiência catalítica), os ensaios foram realizados variando-se as concentrações de pNP-éster de 0,01 a 4 mM, determinando-se a velocidade inicial (V_0) de cada reação. Os resultados foram obtidos pela regressão não linear dos dados, com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.00.

4.10 Ensaios de Cristalização

As amostras das proteínas foram submetidas aos experimentos de cristalização no laboratório automatizado de cristalização (Robolab) no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas. As soluções usadas nos ensaios de cristalização foram preparadas através do aparelho Matrix Maker (Emerald Biosystems).

Diferentes concentrações das proteínas foram testadas e distribuídas nas placas usando o aparelho HoneyBee 963 (Digilab Global). Foram testados seis kits iniciais baseados nos kits comerciais: Crystal Screen, SaltRx (Hampton Research), Precipitant Synergy, Wizard I e II (Emerald Biosystems), PACT Suite e JCSG+Suite (Nextal/Qiagen), preparadas com gotas contendo uma proporção de 1:1 (proteína:precipitante) pelo método da gota sentada. As placas foram incubadas a 18 °C e a visualização por meio de lupas a partir de fotos tiradas pelo robô Rock Imager (Formulatrix).

Os ensaios de cristalização envolveram etapas de refinamento para melhorar a qualidade dos cristais, no qual se variou a concentração de proteína a proporção entre proteína e precipitante, a concentração de sais e precipitantes e pH, manualmente.

Os dados cristalográficos foram coletados na linha MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas. O comprimento de onda utilizado foi de 1,421 Å e o detector *ADSC* foi utilizado para registrar os valores de oscilação com $\Delta\varphi = 0,5^\circ$. Os dados foram processados usando o programa XDS (KABSCH, 2010) e o pacote de programas do CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados em quatro capítulos. Primeiramente, serão apresentadas análises da sequência do clone PL14.H10, para identificação dos genes responsáveis pela atividade lipolítica. Após, serão mostrados os resultados envolvendo a clonagem dos genes codificadores de enzimas lipolíticas e posterior expressão e purificação das proteínas. Nos capítulos seguintes serão apresentados, separadamente, os resultados da caracterização das enzimas selecionadas.

5.1 Capítulo 1 - Análise da sequência do clone PL14 H10

O clone PL14.H10 demonstrou atividade em substrato para enzimas lipolíticas pela formação de halo de hidrólise, ao ser realizada a prospecção em biblioteca metagenômica de consórcio microbiano degradador de óleo diesel (PEREIRA et al., 2015). Em experimentos anteriores (dissertação de mestrado, processo FAPESP número 2009/03772-9) foi construída uma sub-biblioteca *shotgun* de 464 subclones, em vetor pUC19, do clone PL14.H10. No presente trabalho, foi realizado o sequenciamento desta sub-biblioteca a fim de se obter a sequência completa do clone positivo. Assim, após o sequenciamento, os eletroferogramas foram analisados, sendo possível construir um *contig* de 32000 pb.

A sequência completa em formato fasta do *contig* foi comparada com as sequências do NCBI, utilizando a ferramenta Blastn, obtendo como resultado 77% de identidade com o micro-organismo *Parvibaculum lamentivorans* DS-1 (número de acesso CP000774.1), 49% de *Query-coverage* e *e-value* de 0.0, seguido de 82% de identidade com uma bactéria não cultivada (número de acesso GU331885.1), 5% de *Query-coverage* e *e-value* de 0.0. Tendo em vista o baixo *score* (Anexo A - Figura A1), apesar da elevada identidade, o resultado aponta a possibilidade de se tratar de uma sequência nova, o que aumenta as chances de conter genes pouco conhecidos.

Após análise do resultado do sequenciamento do *contig* completo, foi feita a predição das ORFs com o programa ORF Finder do NCBI. O programa gerou 205 ORFs e todas foram analisadas com relação à presença ou ausência de domínios conservados, similaridade com micro-organismos depositados no banco de dados,

Query-coverage e *e-value*. Por meio dessa análise, foi possível identificar a *frame* de leitura onde cada uma está localizada, determinar o início e término da ORF, aferir o tamanho em nucleotídeos e aminoácidos e predizer qual o papel biológico de cada uma (Anexo A – tabela A1). As 29 ORFs selecionadas foram representadas através de um mapa físico ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Mapa físico do contig do clone PL14.H10. O mapa, gerado pelo programa Pages 09, versão 4.04 (Apple Inc., Cupertino, Califórnia, Estados Unidos da América) representa as 29 ORFs encontradas, com as setas indicando o tamanho, localização e orientação dos genes. As ORFs codificadoras de enzimas lipolíticas são demonstradas pelos números 4, 5, 6 e 13 (em cinza).

O resultado da predição aponta quatro ORFs codificadoras de enzimas lipolíticas, representadas na figura 5 pelos números 4, 5, 6 e 13. As sequências dessas ORFs foram comparadas com sequências conhecidas depositadas na base de dados não redundante de proteínas, usando a ferramenta de alinhamento local Blastx, e o resultado está demonstrado na tabela 2.

As ORFs 4 e 13 apresentaram 71% e 74% de identidade, respectivamente, com uma α/β hidrolase do micro-organismo *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1, que não foi caracterizada até o momento. Já as ORFs 5 e 6 mostraram similaridade com uma lipase/esterase de micro-organismo não cultivado, e os dados sobre tal enzima não foram publicados. Apesar da identidade elevada, as enzimas com similaridade às ORFs encontradas nesse trabalho foram apenas identificadas, mas não caracterizadas, aumentando a expectativa de se trabalhar com as ORFs do clone PL14.H10. Somado a tais fatores, de acordo com Rao et al. (2013), a sequência de aminoácidos da esterase de *Bacillus pseudofirmus* em estudo apresentou identidade acima de 70% com outras esterases disponíveis no banco de dados, porém, a caracterização da enzima indicou diferenças na estabilidade térmica entre elas, evidenciando que a diferença na composição de aminoácidos, mesmo que pequena, pode representar modificações no modo de ação da enzima.

Tabela 2 - Predição das ORFs codificadoras de enzimas lipolíticas identificadas no *contig* do clone PL14.H10 com o ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html).

ORF	Proteína/ Nº de acesso	Micro- organismo	Identidade (%)	Query- coverage (%)	e-value
4	alpha/beta hydrolase fold protein (WP_012110587.1)	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1	71	81	1e-145
5	lipase/esterase (ADM63077.1)	<i>Uncultured bacterium</i>	80	98	0.0
6	lipase/esterase (ADM63076.1)	<i>Uncultured bacterium</i>	87	94	0.0
13	alpha/beta hydrolase domain-containing protein (YP_001412941.1)	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1	74	95	8e-142

5.1.1 Relações Filogenéticas das sequências obtidas

A classificação das enzimas lipolíticas tem sido feita a fim de identificar as sequências de motivos conservados característicos de cada família e subfamília, e relacioná-los a elementos estruturais envolvidos no reconhecimento do substrato e catálise, auxiliando na compreensão da função das enzimas. Sendo assim, foram feitos alinhamentos e construções filogenéticas, baseando-se nas sequências utilizadas na classificação inicial proposta por Arpigny e Jaeger (1999).

Por meio da análise do dendrograma é possível observar que as ORFs estudadas se agruparam em duas famílias das esterases/lipases. A ORF13 está localizada entre os membros da Família IV. Já as ORFs 4, 5 e 6 se agruparam em um ramo único, logo após os membros da família V (Figura 6).

Figura 6 - Dendrograma das relações filogenéticas entre sequências das enzimas identificadas neste trabalho (●) e membros representativos das famílias de enzimas lipolíticas previamente identificados (números de acesso do NCBI indicados). O dendrograma foi construído com o programa MEGA 6, com o algoritmo do vizinho mais próximo. A análise foi realizada com *bootstrap* de 1000, sendo que valores menores que 50 não foram mostrados. A barra de escala indica o número de substituições de aminoácidos por sítio.

Os resultados sugerem que a ORF13 é um novo membro da Família IV, e apresentou identidade de baixa a moderada com as sequências representativas da

família (28% a 56%). Já a identidade entre as sequências das ORF4, ORF5 e ORF6, e membros da família V variou entre 64% e 24%, com as ORFs 4 e 6 separadas em um ramo único.

Foi então realizado o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das ORFs identificadas neste trabalho com os membros representativos das famílias IV e V, demonstradas no dendrograma da figura 6, na tentativa de identificar as sequências conservadas representativas das duas famílias (Figura 7).

A

ORF13	84	YY	HGGG	WVI	92	157	A	GDSAGG	163	352	DPLRDE	359	281	GMI	HGF	286	
L36817	128	YF	HGGG	FTV	136	201	G	GDSAGG	207	302	DPLHDE	307	329	GMI	HDF	334	
AF034088	79	FF	HGGG	FVM	87	152	A	GDSAGG	158	250	DPLRDE	255	277	GMI	HGF	282	
MX53868	89	FF	HGGG	FCI	97	162	S	GDSAGG	168	262	DILRDE	267	289	GAP	HGF	294	
AE000153	163	YL	HGGG	FIL	171	236	A	GDSAGG	242	361	DPLLDD	366	388	GTL	HAF	393	
		:	****:	:			.	*****.			*	*	*	:	*	*	*

B

			▼					▼					▼	
ORF4	149	AHVV	GASMGG	MIAQ	162	272	VAP TV	VLHG	EDDPLVP	287	308	GMAH	311	
ORF6	114	AHIV	GASMGG	MIAQ	127	236	KAP AV	VLHG	ADDPLVP	251	272	GMGH	275	
ORF5	112	AHVM	GISMGG	MIVQ	125	235	HV PFL	VIHG	KADPLVR	250	271	GMGH	274	
X53869	138	THVG	GNSMGG	GAISV	151	255	NI PTL	VVWG	DKDQVIK	270	292	DVGH	295	
X67712	136	IHVG	GNSMGG	GAISV	149	253	KI PTL	VVWG	DKDQIIK	268	289	DVGH	292	
AF071233	136	LNVL	GWSMGG	FEVAQ	149	253	TA PTL	VIGG	SDLLLLP	268	289	DAGH	292	
		:	:	*	*	*	*	*	:	:			*	

Figura 7 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das ORFs deste trabalho com representantes das famílias de enzimas lipolíticas. (A) alinhamento da ORF13 com representantes da família IV. (B) Alinhamento das ORF4, ORF5 e ORF6 com representantes da família V. Áreas sombreadas (cinza) representam o pentapeptídeo conservado das enzimas lipolíticas e os resíduos da tríade catalítica estão marcados com um triângulo invertido (▼). Resíduos idênticos (.) ou similares [(.) e (:)] estão simbolizados abaixo do alinhamento. Os números próximos à sequência indicam as posições dos aminoácidos.

Com o alinhamento múltiplo foram identificados os resíduos da tríade catalítica, Ser-His-Asp em todas as sequências, como esperado. Os resultados obtidos corroboram com a identificação das famílias por meio do dendrograma, pois foi possível identificar os motivos conservados típicos de cada família das enzimas lipolíticas. No alinhamento realizado com a proteína ORF13 e os membros

representativos da família IV podem ser observados o sítio ativo nucleofílico da Serina, no pentapeptídeo GDSAG e o motivo conservado HGCG (Figura 7A), cuja função está relacionada com a formação das pontes de hidrogênio para estabilização da estrutura durante a catálise (WEI et al., 1999). Os membros desta família possuem semelhança significativa com as lipases hormônio-sensíveis de mamíferos (ARPIGNY; JAEGER, 1999; HAUSMANN; JAEGER, 2010).

Com relação às ORF4, ORF5 e ORF6, o alinhamento múltiplo de sequências revelou que todas continham os resíduos correspondentes à tríade catalítica, porém com modificações nos motivos conservados. O motivo GXGXG, comum entre as enzimas lipolíticas esteve presente em todas as sequências das proteínas. O motivo PTL, comum entre esterases da família V, variou entre as sequências das três ORFs. Com relação ao sítio catalítico do aspartato, apresentaram o motivo conservado DPLV, diferenciando-as dos outros membros da família (Figura 7B). Estas características provavelmente são as responsáveis pela localização das ORFs 4, 5 e 6 em um ramo único no dendrograma da figura 7.

Novas famílias e subfamílias têm sido propostas, baseadas em trocas de aminoácidos nos sítios catalíticos ou por sequências conservadas (JEON et al., 2012; NACKE et al., 2011; ZHANG et al., 2013) e os autores afirmam que as modificações são responsáveis pela reclassificação das enzimas lipolíticas. Jeon et al. (2012) propuseram a criação de uma nova subfamília da família IV das enzimas lipolíticas pelo fato da sequência do sítio ativo da Serina ser constituído por um pentapeptídeo original, GT(S)SA(L)L, ligeiramente diferente do motivo conservado GDSAG, comum entre os membros dessa família.

5.2 Capítulo 2 - Clonagem das sequências e expressão das enzimas lipolíticas.

5.2.1 Amplificação e clonagem dos genes no vetor pET28a

As sequências codificadoras de enzimas lipolíticas identificadas nas etapas anteriores, ORFs 4, 5, 6 e 13, foram utilizadas como moldes para a construção de oligonucleotídeos iniciadores visando a amplificação dos genes para clonagem e expressão das proteínas correspondentes. Mesmo após diversos testes de reações de PCR, não foi possível obter amplicons da ORF6, possivelmente por problemas

relacionados ao desenho dos oligonucleotídeos iniciadores. Já a amplificação dos genes codificados pelas ORFs 4, 5 e 13 a partir do DNA fosmidial do clone PL14.H10 resultou em fragmentos do tamanho esperado (indicado anteriormente na tabela 1 do material e métodos), conforme evidenciado pelo gel de agarose da reação de PCR realizada em gradiente de temperatura (Figura 8).

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose da amplificação dos genes com oligonucleotídeos iniciadores específicos. **(A)** Perfil eletroforético da extração do DNA fosmidial do clone PL14.H10. **(B)** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da reação de amplificação com oligonucleotídeos específicos para as ORFs 4 (I), 5 (II) e 13 (III). Canaletas: 1- 1Kb – Padrão de Tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Fermentas), evidenciado à direita da figura; 2 a 13- variação da temperatura de 45 °C a 65 °C. A temperatura escolhida está sinalizada pela seta vermelha.

Uma vez obtidos os fragmentos de interesse, estes foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição correspondentes para clonagem no vetor de expressão pET28a. Os produtos das digestões foram utilizados nas reações de

ligação com o vetor para a posterior transformação de células de *E. coli* BL21(DE3). As colônias coletadas foram analisadas por meio da reação de PCR com oligonucleotídeos específicos do vetor em grupos de quatro por vez, para checar a presença do plasmídeo contendo as construções pET28-ORF.

A análise do perfil eletroforético em gel de agarose possibilitou verificar que os quatro clones coletados de cada construção pET28-ORF4 e pET28-ORF5 tiveram amplificação da região de interesse (Figura 9A). Para a construção pET28-ORF13, a reação de PCR (em duplicata no gel) possibilitou confirmar a clonagem de dois clones dos quatro testados (Figura 9B). Um clone de cada construção foi selecionado para dar continuidade aos ensaios de expressão e a identidade do gene clonado foi confirmada por sequenciamento.

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a presença do inserto referente às ORFs 4, 5 e 13. Gel (A): Linha 1: Marcador de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder (Fermentas); linhas 2, 3, 4 e 5: produto de PCR (pET28a-ORF4); linhas 6, 7, 8 e 9: produto de PCR (pET28-ORF5). Gel (B): Linha 1: Marcador de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder (Fermentas); linhas 2 a 5: produto de PCR (pET28-ORF13), em duplicata.

5.2.3 Ensaios de expressão e extração das proteínas recombinantes

Análises iniciais das propriedades de cada proteína, como massa mlecular e pl teóricos, foram feitas por meio da ferramenta ProtParam (tabela 3). Os dados obtidos com essa análise foram utilizados em ensaios futuros, assim como para a identificação das bandas de interesse no gel de poliacrilamida.

Tabela 3 - Características das proteínas de interesse obtidas a partir do ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

	pET28-ORF4	pET28-ORF5	pET28-ORF13
Aminoácidos	416	340	350
Massa molecular (kDa)	45,3	37	36,8
pI	8,96	7,3	5,78
Nº de Triptofano(s)	3	1	2

Após identificação de parâmetros teóricos foram então realizados testes de expressão e posterior extração das proteínas. Para os testes, alíquotas de 1 mL de extrato celular induzido (T2) e antes da indução por IPTG (T0) foram centrifugadas a $15294 \times g$ e o *pellet* celular resultante foi desnaturado e aplicado em gel de poliacrilamida 10%. Na figura 10 é possível observar a expressão ao comparar as bandas do extrato celular antes da indução com aquelas do extrato celular após a indução.

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% do extrato celular das proteínas. Canaletas: (M) Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad) utilizado nos géis **A** e **B**. Gel (**A**): 1 e 3- Extrato total de células não induzidas (T0); 2- Extrato total de células induzidas expressando a proteína ORF4 (T2); 4- Extrato total de células induzidas expressando a proteína ORF5 (T2); Gel **B**: 1- Extrato total de células não induzidas (T0); 2- Extrato total de células induzidas expressando a proteína ORF13 (T2).

A partir da confirmação da expressão das proteínas, estas foram extraídas a fim de se obtê-las na fração solúvel. Os ensaios iniciais foram realizados na seguinte condição: 2 horas de indução a 37 °C, com concentração final de IPTG a 0,1 mM. A extração foi realizada repetindo-se a metodologia por três vezes (terceiro extrato), visando obter quantidades suficientes de proteína. Ainda assim, grande parte das proteínas obtidas ficou na fração insolúvel, principalmente para a ORF4, como pode ser visualizado na figura 11. Dessa forma, se fez necessário modificar as condições iniciais de indução visando o aumento do rendimento final obtido em menor tempo. Assim, foram feitos testes com variações na temperatura, concentração de IPTG e tempo de indução (resultados não mostrados). Detalhes das condições de expressão de cada proteína serão mostrados nos capítulos seguintes.

Figura 11 - Análise da expressão e solubilidade das proteínas recombinantes. (A) ORF4, **(B)** ORF5 e **(C)** ORF13 em cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) evidenciada em SDS-PAGE 12%. Canaletas: M: Marcador de tamanho molecular (BioRad); 1, 2 e 3: Extratos celulares solúveis; 4: Extratos celulares insolúveis (*pellet*).

Após definir as condições ideais de expressão de cada proteína foi possível obter maior quantidade de proteínas solúveis, visto que a proteína contida no *pellet* (fração insolúvel) foi significativamente reduzida. Para a ORF4, apesar dos vários testes de expressão, não foi possível obter quantidade suficiente da proteína em sua forma solúvel a partir dos testes realizados. Estes resultados levaram à escolha das proteínas ORF5 e ORF13, sendo a primeira da família V e a segunda da família IV das enzimas lipolíticas, para purificação e caracterização enzimática.

Uma vez definidas as condições em que as proteínas ORF5 e ORF13 são expressas na maior parte em sua forma solúvel, volumes maiores de cultivo foram utilizados para a indução, visando extrair grandes quantidades das proteínas para prosseguir com a purificação. Os capítulos seguintes tratarão das duas ORFs selecionadas, visando a expressão, purificação e caracterização das enzimas correspondentes.

5.3 Capítulo 3 - Expressão, Purificação e Caracterização da ORF13

Neste capítulo serão discutidos os resultados obtidos de experimentos realizados com a proteína ORF13, desde sua expressão e purificação até a caracterização de suas propriedades bioquímicas e tridimensionais. A sequência da ORF13 foi depositada no banco de dados do NCBI, sendo o gene denominado *est3* (número de acesso KP692205), com 939 pb, não sendo identificada a presença de peptídeo sinal. A proteína codificada por este gene passou a ser então denominada de EST3.

A sequência do gene *est3* foi comparada com sequências depositadas no NCBI, e como resultado foram obtidas identidades variando de 65 a 74%, com uma alfa/beta hidrolase de *Parvibaculum lavamentivorans* (número de acesso: WP012110575.1); uma proteína hipotética de micro-organismo não cultivado (número de acesso: AEM45144.1) e a carboidrato esterase CE10 da bactéria não cultivada Ec32 (número de acesso: CDO59205.1), sendo o maior *query coverage* 94%. Até o momento, somente a proteína hipotética AEM45144.1 de micro-organismo não cultivado foi parcialmente caracterizada (NACKE et al., 2011), em que os autores determinaram que esta enzima é uma esterase, porém suas propriedades bioquímicas não foram definidas. Dessa forma, a caracterização da proteína EST3 se torna interessante, visto que seu potencial biotecnológico não foi explorado.

5.3.1 Características tridimensionais do modelo estrutural da EST3

A sequência de aminoácidos da EST3 foi submetida ao Blastp no banco de dados do PDB e exibiu 45% e 42% de identidade com uma carboxilesterase de

Alicyclobacillus acidocaldarius (PDB 1EVQ) e uma carboxilesterase de *Sulfolobus tokodaii* (PDB 3AIK), respectivamente. O modelo estrutural da EST3 demonstrou duas regiões distintas, o domínio alfa-beta e o domínio helicoidal, onde está localizado o sítio ativo. A tríade catalítica é formada pelos resíduos Ser198, His322 e Asp292, como mostrado em detalhe na figura 12 A, em *sticks* amarelos. O resíduo Ser198 está localizado na sequência conservada GDSAG, situada no cotovelo nucleofílico. Por ser um membro da família IV, a formação da cavidade do oxianion para EST3 provavelmente é mediada por Gly127, Gly126 e Gly125, localizados no motivo 124HG^{GG}127.

A primeira estrutura tridimensional de uma esterase da família IV foi resolvida em 1999, especificamente a esterase Brefeldin A de *Bacillus subtilis*. Desde então, outras estruturas de esterase dessa família foram resolvidas (DE SIMONE et al., 2000; PEREIRA et al., 2015; WEI et al., 1999) e mostraram uma característica estrutural em particular: um cap-domínio, diferente da *lid* encontrada nas lipases verdadeiras (WANG et al., 2005). Este domínio está provavelmente relacionado ao reconhecimento e controle da entrada de substratos, proporcionando o acesso ao bolsão de ligação (HAUSMANN; JAEGER, 2010; WANG et al., 2005), que para a EST3 é composto principalmente por resíduos neutros e positivos que proporcionam um ambiente favorável para os substratos hidrofóbicos (Anexo B – Figura B1).

Como esperado, o modelo estrutural da EST3 sobrepôs-se satisfatoriamente com as estruturas das carboxilesterases de *A. acidocaldarius* e *S. tokodaii*, exibindo r.m.s.d. de 0,2 Å e 0,4 Å, respectivamente (Figura 12B). Interessantemente, somente foi identificado o cap-domínio no modelo da EST3 e na carboxilesterase de *A. acidocaldarius* (Figura 12B, *cartoon* azul e rosa).

Os resíduos que formam a tríade catalítica nas três estruturas foram bem sobrepostos (Figura 12B, detalhes em *sticks*). Apesar destas semelhanças, as proteínas exibiram diferenças bastante significativas no canal de entrada do substrato (Figura 12C), que provavelmente afetam o tipo de substrato que pode ser clivado por cada uma das esterases.

Figura 12 - Modelo tridimensional da proteína EST3. O modelo foi construído baseado na estrutura cristalográfica das carboxilesterases de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (PDB 1EVQ) e de *Sulfolobus tokodaii* (PDB 3AIK), com o programa MODELLER 9.10. **(A)** Representação em *cartoon* da estrutura terciária com os domínios helicoidal (verde) e alfa/beta (rosa e azul). Resíduos da tríade catalítica são evidenciados em *sticks* amarelos. **(B)** Sobreposição estrutural da EST3 (preto) com as carboxilesterases de *A. fulgidus* (cinza) e de *S. tokodaii* (amarelo). A presença do cap-domínio nas estruturas da EST3 e da carboxilesterase de *A. fulgidus* é demonstrada em *cartoons* azul e pink, respectivamente. A sobreposição dos resíduos do sítio ativo é detalhada, com números representando: EST3, carboxilesterases de *A. fulgidus* e *S. tokodaii*, respectivamente. **(C)** Superfície das três estruturas. Os domínios das proteínas são delimitados e os resíduos da tríade catalítica são mostrados como esferas amarelas.

5.3.2 Expressão e Purificação da enzima EST3

Para seguir com a caracterização da proteína EST3, ela foi expressa em células de *E. coli* BL21(DE3) na fração solúvel após testes de otimização em diferentes temperaturas (dados não mostrados). A melhor condição para obtenção da proteína ativa se deu ao induzir as células com 0,1 mM de IPTG, a 30 °C, durante 4 h. A proteína foi purificada por afinidade ao níquel, eluída principalmente na fração do tampão com 80 mM de imidazol. A análise de SDS-PAGE da proteína purificada revelou que, sob condições de desnaturação, sua massa molecular correspondia ao tamanho esperado de 36,8 kDa, previsto anteriormente pela ferramenta ProtParam (Figura 13).

Figura 13 - Expressão e purificação da enzima recombinante EST3. SDS-PAGE 10% da expressão e purificação por cromatografia de afinidade da enzima, a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) com o vetor pET28a-est3. M: padrão de tamanho molecular (Thermo Scientific); Linha 1: extrato bruto de células não induzidas; Linha 2: extrato bruto das células induzidas; Linha 3: extrato solúvel; Linha 4: proteínas não ligadas à resina da cromatografia de afinidade ao níquel. Linhas 5 e 6: frações de eluição de 20 mM e 80 mM de imidazol, respectivamente.

As frações da proteína purificadas por cromatografia de afinidade foram unidas e concentradas para serem submetidas à purificação por cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna Hiload 16/60 Superdex 75. Foi verificado um perfil de dois picos inicialmente estimados como correspondentes a diferentes

estados oligoméricos da proteína, sendo o primeiro eluído com ± 51 mL e o segundo com ± 76 mL (resultados não mostrados). Tendo em vista a grade de calibração usada nesta coluna, estes picos corresponderiam a massas moleculares de ~ 158 e ~ 37 kDa, respectivamente, sugerindo a presença de uma população de tetrâmeros no primeiro pico, enquanto no segundo estaria a forma monomérica da enzima.

Para investigar qual estado oligomérico da proteína corresponde a sua forma ativa, foram realizados ensaios de atividade *in vitro* das frações correspondentes a cada pico obtido na filtração em gel. Para isso, uniu-se as frações de cada pico para serem concentradas, e 1 μ g de proteína foi aplicado em placas de Petri contendo 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0, 1,2% de Ágar (p/v); e 1% de Tributirina (v/v). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e o resultado acompanhado por 24 horas, podendo-se observar a formação de halo apenas pela proteína recuperada da eluição correspondente ao maior pico (Figura 14).

Figura 14 - Purificação por filtração em gel e atividade *in vitro* da EST3. (A) Cromatograma da purificação por filtração em gel da proteína EST3 e ensaio da atividade enzimática *in vitro* em placas de Petri com tributirina. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da proteína purificada e zimograma. M: marcador de tamanho molecular (Bio-Rad). PP: proteína purificada; AL: atividade lipolítica da banda da EST3 em tributirina.

Com os resultados obtidos, é possível inferir que a proteína se encontra ativa na forma monomérica. Foram feitas modificações no tampão utilizado para a filtração em gel, acrescentando-se 50 mM de NaCl e glicerol, além de maior cuidado ao concentrar a proteína, evitando a formação de aglomerados proteicos. Com o novo procedimento adotado, pode-se reduzir a formação do primeiro pico, evitando a perda da proteína (Figura 14 A). Adicionalmente, o zimograma indicou que a enzima EST3 estava ativa, pois a região da banda da EST3 no gel de poliacrilamida exibiu um halo na região da enzima ao ser colocada em contato com a tributirina (Figura 14B).

5.3.3 Propriedades enzimáticas da EST3

Para caracterizar a atividade da EST3 foram realizados ensaios em pNP-ésteres variando-se as condições do meio. Inicialmente, analisou-se a influência da variação do pH sobre a atividade da enzima. A EST3 apresentou dois picos de atividade máxima quando testada no intervalo de 4,5 a 11: o primeiro aproximadamente em pH 6,0 (próximo do ponto isoelétrico calculado de 5,78, com base nos resultados fornecidos pela ferramenta ProtParam) e representou 100% da atividade; o segundo em torno do pH 8,0 e exibiu aproximadamente 95% da atividade enzimática. Tal característica pode estar relacionada com a força iônica do tampão usado na reação. Um perfil semelhante foi observado para a Beta-glucosidase Bgxa1 e para uma fitase de *Aspergillus niger*, quando alterações na força iônica do meio de reação resultaram em uma curva de perfil monomodal (GRUNINGER et al., 2014; ULLAH; SETHUMADHAVAN; MULLANEY, 2008). A enzima também apresentou mais de 80 % de atividade entre os pHs 5,5 e 8,5 (Figura 15 A).

Os resultados descritos adiante são de experimentos realizados em tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH de 6,0. A proteína EST3 exibiu atividade relativa acima de 50% entre 28 °C e 57 °C, com atividade máxima a aproximadamente 41 °C (Figura 15 B). Curiosamente, EST3 ainda exibiu mais de 40% da sua atividade a 75 °C. Muitas vezes, elevados níveis de atividade ou termoestabilidade em condições amenas é uma característica desejável a enzimas lipolíticas destinadas a algumas finalidades, pois podem resultar em economia no consumo de energia (LUO et al., 2006).

Os ensaios de termoestabilidade revelaram que, embora tenha perdido aproximadamente 30% de sua atividade após 15 min de incubação a 30 °C e 40 °C, a atividade foi restaurada totalmente depois de 1 h, assim como a 50 °C, apesar de ter perdido 58% de atividade nos primeiros minutos de incubação (Figura 15 C). Estes resultados podem ser devido a um fenômeno chamado de ativação térmica (FAORO et al., 2012), em que as mudanças na conformação da enzima, no caso, devido à elevação da temperatura, favorecem uma melhor interação com o substrato (KLUMP et al., 1992). A ativação térmica não é uma característica comum às esterases. Um dos primeiros relatos foi reportado para uma esterase da archaea *Sulfolobus shibatea*, a qual apresentou uma ativação térmica de 60% após 10 a 25 minutos a 90 °C (HUDDLESTON; YALLOP; CHARALAMBOUS, 1995).

De acordo com os dados de dicroísmo circular, a EST3 exibiu uma T_m de 56,5 °C em pH 7,0 (Figura 15 D). A ativação térmica não é mais observada com temperaturas superiores a 60 °C, justificável por ser uma temperatura superior à T_m da enzima. Apesar de uma temperatura ótima amena, a enzima foi completamente desnaturada apenas a aproximadamente 108 °C. Já a T_m nos pHs 5,6, 8,0 e 9,0 foi de $54,5 \pm 0,6$ °C. Uma T_m inferior nestes valores de pH são, provavelmente, devido à alterações nos resíduos de aminoácidos da estrutura secundária que resultam em alterações nas ligações covalentes, reduzindo a estabilidade térmica (MYERS; PACE; SCHOLTZ, 1995).

Figura 15 - Efeito do pH e temperatura na atividade da EST3. A liberação de *p*-nitrofenol a partir de *p*NP-butirato foi monitorada a 348nm. A atividade da enzima sem incubação prévia foi definida como 100%. **(A)** Efeito do pH. Os ensaios enzimáticos foram realizados do pH 4,5 a 11 e os tampões utilizados foram: citrato de sódio (pH 4,5 a 6,0) (●), fosfato de sódio (pH 6,0 a 8,0) (■), Tris-HCl (pH 7,5 a 9,0) (▲) e CAPS (pH 9,5 a 11) (◆). **(B)** Efeito da temperatura. A atividade da enzima foi analisada de 18 a 75 °C. **(C)** Gráfico de superfície 3D da atividade da EST3 após incubação por diferentes períodos de 30 °C a 80 °C. **(D)** Perfil de desnaturação térmica da EST3. Os dados foram tratados com o parâmetro 5 da função sigmoide do programa SIGMA PLOT. Os pHs testados foram: 5,6 (◆); 7,0; (■) 8,0; (x) e 9,0 (●).

A especificidade da enzima pelo substrato também foi investigada. A enzima foi capaz de hidrolisar *p*NP-ésteres com cadeia acil de 2 a 12 átomos de carbono (C2-C12), embora tenha exibido preferência por substratos de cadeia curta. A atividade demonstrada pela EST3 em C2 foi em torno de 9 vezes maior em comparação com C4 e C5. Na figura 16 está ilustrada a atividade da enzima nos

substratos C4 ao C12, sendo excluída do gráfico a atividade em C2, para melhor ilustrar sua ação frente aos demais substratos.

Figura 16 - Especificidade da EST3 por diferentes substratos. A análise foi realizada em pNP-ésteres com cadeia acil de 2 a 12 átomos de carbono, no ensaio padrão de determinação da atividade.

Para determinação dos parâmetros cinéticos, na reação com C2 foram utilizados 0,00542 μM de enzima, enquanto que para os outros substratos, 0,0542 μM . Os valores K_m e V_{max} para pNP-acetato foram $0,19 \pm 0,03 \text{ mM}$ e $107,6 \pm 3,6 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente. Um aumento na cadeia para C4 resultou em diminuição acentuada no K_{cat} (Tabela 4).

A eficiência catalítica para pNP-butirato e pNP-valerato foram semelhantes e aproximadamente duas vezes mais baixas do que aquela para a pNP-octanoato. Este perfil de hidrólise dos substratos é típico das esterases, enzimas mais ativas em substratos de cadeia curta, parcialmente solúveis em água (ARPIGNY; JAEGER, 1999), e semelhante a outras esterases família IV (BUNTERNGSOOK et al., 2010; NAM et al., 2009; RHEE et al., 2005). Em comparação com a enzima lipolítica CN1E1 da família IV de uma comunidade microbiana enriquecida com naftaleno (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2014), os parâmetros catalíticos exibidos pela EST3 em pNP-acetato foram aproximadamente 40 vezes maiores. Para todos os substratos avaliados, EST3 exibiu maiores valores de parâmetros cinéticos em

comparação com EstOF4, uma esterase de *Bacillus pseudofirmus* OF4 (RAO et al., 2013).

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos da enzima EST3 em diferentes substratos pNP-ésteres.

p-Nitrofenil éster ^b	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)
C2	$0,19 \pm 0,03$	$107,6 \pm 3,6$	$19852,4 \pm 66,4$	1732,3
C4	$0,45 \pm 0,05$	$119,5 \pm 5,6$	$2204 \pm 103,5$	81,63
C5	$0,64 \pm 0,06$	$171 \pm 7,2$	$3155 \pm 133,5$	82,69
C8	$0,15 \pm 0,02$	$76,2 \pm 3,6$	$1406 \pm 66,7$	157
C10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. = não determinada

^a Os ensaios enzimáticos foram realizados em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, a 41°C.

^b p-nitrofenil ésteres com cadeia acil expressa em número de átomos de carbono (C).

Assim, a caracterização enzimática da EST3 indicou que esta é uma enzima mesófila, com uma temperatura de máxima atividade entre 40 e 45 °C e com elevados níveis de atividade em uma vasta gama de pHs (5,0-11,0). Características similares foram encontradas para EstB, uma esterase obtida de uma biblioteca metagenômica de ambiente marinho que apresentou atividade máxima a 45 °C e mais de 50 % de sua atividade entre os pHs 6,5 e 8,0 (CHU et al., 2008). Porém, em contraste com a maioria das esterases na literatura, as quais exibem pHs ótimos na região alcalina (HU et al., 2010; JEON et al., 2012; TAO et al., 2011; WANG et al., 2011; WU; SUN, 2009), EST3 exibiu um pH ótimo ligeiramente ácido.

5.3.3.1 Efeito de aditivos na atividade da EST3

A atividade da enzima aumentou na presença de quase todos os íons testados, particularmente Mn^{+2} , Li^{+} e Mg^{+2} , com 134, 129 e 127% de atividades relativas, respectivamente. A atividade também aumentou entre 15 e 20% na presença de K^{+} , Na^{+} , Cu^{+2} e Fe^{+2} , foi praticamente inalterada na presença de Ca^{+2} e inibida por Ni^{+2} , Co^{+2} e Al^{+3} com atividades remanescentes de 48, 68 e 47%, respectivamente (Figura 17 A). Os efeitos de alguns íons metálicos podem ser

atribuídos a alterações na solubilidade e ao comportamento de ácidos graxos ionizados na interface da enzima (SARANYA et al., 2014). O agente quelante EDTA exerceu um efeito inibidor a 1 mM (84%), mas em menor concentração (0,5 mM) foi capaz de aumentar a atividade para 132%, indicando que a enzima não é dependente de cofatores. Resultados semelhantes foram relatados para uma esterase metagenômica marinha, ESTA, que é fracamente estimulada na presença de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} e EDTA (CHU et al., 2008).

Pelo fato da resistência a solventes orgânicos ser desejável para muitas aplicações biotecnológicas (HÅRDEMAN; SJÖLING, 2007; LÓPEZ-LÓPEZ; CERDÁN; GONZALEZ-SISO, 2014; MEI et al., 2012), a enzima foi testada na presença de 10% destes compostos. A atividade permaneceu relativamente estável em DMSO, etanol, metanol e foi inibida por isopropanol, exibindo 69,8%, 48%, 48,4% e 39,3% de atividade residual, respectivamente.

Com relação ao glicerol, os resultados apontaram que, na concentração de 10%, foi responsável por aumentar a atividade da EST3 em cerca de 20%, em comparação com o controle (Figura 17 B), contrastando com a esterase EstOF4, que não foi influenciada quando na presença também de 10% de glicerol (RAO et al., 2013). Cinco esterases metagenômicas de ambiente marinho responderam diferentemente à presença de 2 a 50% de glicerol (TCHIGVINTSEV et al., 2015).

Figura 17 - Efeito de aditivos na atividade da EST3. (A) Efeito de íons e sais. A atividade enzimática foi determinada na concentração de 0,5 mM de íons metálicos e 0,5 mM (cinza escuro) e 1 mM de EDTA (cinza claro). **(B)** Efeito da ação de solventes orgânicos. A atividade da enzima foi determinada em 10% (v/v) de solventes orgânicos. As atividades relativas foram calculadas em comparação com a atividade controle, no qual o elemento analisado foi substituído por água, no ensaio padrão.

A atividade da enzima também foi avaliada na presença de detergentes e os efeitos estão resumidos na tabela 5. Detergentes não iônicos, tais como Triton X-100 e Tween 20, diminuíram a atividade da enzima. Agentes tensoativos reduzem a tensão interfacial da fase aquosa, o que leva a proteína se desenovelar, diminuindo a interação da enzima com o substrato (SALAMEH; WIEGEL, 2010). Por outro lado, o detergente iônico CTAB aumentou significativamente a atividade da EST3 para 175,4%, provavelmente por estabilizar a superfície interfacial, facilitando assim, o acesso do substrato ao sítio ativo (SARANYA et al., 2014). Esta característica é desejável para enzimas que atuam na biorremediação (LI; CHEN, 2009) e, curiosamente, este perfil não é comum entre as esterases (FU et al., 2013b; STEEN et al., 2010; WEMHEUER et al., 2013).

Tabela 5 - Efeito de detergentes sobre a atividade enzimática da esterase EST3.

Aditivo	Atividade Relativa (%)	
	1 %	5 %
Controle	100	100
Triton X-100	75,5 ± 3,6	30,3 ± 2
Tween 20	68,3 ± 4,8	24,4 ± 2,7
Tween 80	0	0
	0.5 mM	1 mM
CTAB	175,4 ± 7,7	0
SDS	0	0

5.4 Capítulo 4 - Expressão, Purificação e Caracterização da ORF5

Neste capítulo serão abordados os resultados e discussão dos dados obtidos com a expressão, purificação e caracterização da ORF5. Essa ORF, de 912 pb, codifica uma enzima de 340 aminoácidos, que foi denominada de EST5. Nenhum peptídeo sinal foi identificado em sua sequência.

O alinhamento da sequência da proteína codificada pelo gene *est5* com sequências depositadas no banco de dados do NCBI revelou uma identidade de 79% com uma lipase/esterase de micro-organismo não cultivado (número de acesso: ADM63077.1), sem publicações relativas a essa enzima; 75% de identidade com uma alfa/beta hidrolase de *Parvibaculum lavamentivorans* (número de acesso: WP012110575.1); e 63% de identidade com uma proteína hipotética da α -Proteobacteria Mf 1.05b.01 (número de acesso: WP029641682.1), os dois últimos resultados estão no banco secundário de sequências não redundantes do NCBI, o RefSeq (*Reference Sequence*).

5.4.1 Expressão e Purificação da enzima EST5

Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a-*est5* foram induzidas a 30 °C durante 4 h, após testes para determinar a melhor condição para se obter a proteína majoritariamente na forma solúvel. A proteína EST5 com a

cauda de histidina foi devidamente expressa, confirmado pela altura da banda no gel - tamanho molecular de 37 KDa, conforme estimado pela ferramenta ProtParam - e se encontra em maior parte na fração solúvel (Figura 18 A).

Para purificação da enzima, os extratos solúveis obtidos foram reunidos e incubados com a resina para purificação por afinidade ao níquel. A proteína EST5 foi eluída principalmente na fração 50 mM de imidazol (Figura 18 B).

Figura 18 - Expressão e purificação da enzima recombinante EST5. (A) SDS-PAGE 10% da extração da proteína EST5. M: marcador de tamanho molecular (Thermo Scientific); Linha 1: extrato bruto de células não induzidas.; Linha 2: extrato bruto das células induzidas; Linhas 3 e 4: extrato solúvel; Linha 5: extrato insolúvel. **(B)** SDS-PAGE 10% das frações eluídas da coluna de cromatografia de afinidade. M: marcador de tamanho molecular; Linha 1: proteínas não ligadas à resina da cromatografia de afinidade ao níquel. Linhas 2 e 3: frações de eluição de 20 mM e 50 mM de imidazol, respectivamente.

Antes de realizar os experimentos de dicroísmo circular e fluorescência intrínseca dos triptofanos, a proteína purificada por cromatografia de afinidade foi concentrada para ser submetida à purificação por filtração em gel, utilizando a coluna HiloLoad 16/60 Superdex 75. A proteína foi eluída em um pico único, conforme o tamanho estimado de 37 kDa (Anexo B- Figura B2).

5.4.2 Determinação da atividade enzimática

5.4.2.1 Efeito do pH sobre a atividade e estrutura da EST5

A variação do pH sobre a atividade enzimática foi analisada. A enzima EST5 exibiu atividade no intervalo do pH 6,0 a 9,5, com atividade máxima em pH 7,5. Foi capaz de manter a atividade acima de $\pm 50\%$ entre a faixa de pH de 6,5 a 8,5 (Figura 19 A).

Para relacionar a estrutura secundária e enovelamento proteico com a alteração do pH, foram realizados ensaios de dicroísmo circular. Os espectros obtidos em todos os pHs testados mostram o enovelamento típico de uma proteína alfa/beta, apresentando dois picos negativos distintos, em 208 nm e 222 nm (NARDINI; DIJKSTRA, 1999), conforme esperado para enzimas lipolíticas (Figura 19 B). Os resultados também revelaram que a alteração do pH não ocasionou diferenças significativas na estrutura da proteína, apenas um sinal discretamente maior nos pHs 7,0 e 8,0, possivelmente relacionado a uma maior quantidade de alfa hélices (GREENFIELD, 1999). Este resultado coincide com a maior atividade da proteína, exibida nestes dois pHs, em comparação com os pHs 5,6 e 9,0.

Ainda monitorando a estrutura da enzima frente à variação do pH, a fluorescência intrínseca dos triptofanos foi medida nos pHs 7,0, 8,0 e 9,0. A proteína EST5 possui um triptofano (W41) e constatou-se o *quenching*, ou apagamento do sinal de fluorescência no pH 9,0, (Figura 19 C) evidenciando alterações conformacionais da proteína. Unindo estes dados aos resultados da análise de dicroísmo circular e atividade em pNP-ésteres, sugere-se que em pH 9,0 ocorram pequenas alterações na estrutura da proteína, demonstrado pela diminuição do sinal de CD a 222 nm, capazes de afetar sua atividade.

Até o momento, não foram encontrados estudos relatando a influência do pH na estrutura de esterases utilizando dicroísmo circular e fluorescência intrínseca dos triptofanos como ferramenta. Uma lipase de metagenoma de solo de fonte termal revelou distorção na estrutura secundária em temperaturas acima de 35 °C, avaliada por dicroísmo circular. No entanto, o estudo de espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano revelou que mesmo com a perda da estrutura secundária, sua estrutura terciária foi mantida (SHARMA et al., 2012).

Figura 19 - Influência do pH na atividade da EST5. (A) Efeito do pH sobre a atividade enzimática. A liberação de *p*-nitrofenol a partir de pNP-butirato foi monitorada a 348 nm. A atividade da enzima sem incubação prévia foi definida como 100%. Os ensaios enzimáticos foram realizados do pH 3,5 a 11 com os tampões: fosfato de sódio (♦); HEPES (■); Tris-HCl (▲) e CAPSO (•). **(B)** Ensaio de Dicroísmo Circular nos pHs: 5,6 (■), 7,0 (•), 8,0 (▲) e 9,0 (x). As medidas foram feitas com 2,90 μmol de proteína. **(C)** Análise da fluorescência intrínseca dos triptofanos nos pHs 7,0 (•), 8,0 (▲) e 9,0 (■).

Os resultados da atividade enzimática utilizando pNP-ésteres descritos a seguir foram realizados em tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,5 e a leitura realizada a 405 nm.

5.4.2.2 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima

A enzima EST5 apresentou máxima atividade a 45 °C, exibindo mais de 50% de atividade relativa nas temperaturas de 15 °C a 50 °C (Figura 20 A). Os experimentos de desnaturação térmica por dicroísmo circular mostraram que a enzima exibiu uma T_m de 47 °C nos pHs 7,0 e 8,0, com uma T_m menor em pH 9, de aproximadamente 42 °C (Figura 20 B). Mais uma vez, os dados evidenciam menor atividade da proteína em pH mais básico, visto que em pH 9,0 foram observadas alterações conformacionais na proteína pelos ensaios de fluorescência intrínseca dos triptofanos.

Com relação à termoestabilidade, a atividade da enzima foi medida a 30 °C, após um período de incubação nas temperaturas de 10, 30, 37 e 45 °C. Nas três menores temperaturas analisadas, a atividade não foi afetada nos primeiros minutos de incubação, e a 45 °C ainda restavam 74% de atividade. Após 1 h, a atividade foi restaurada à 37 °C, e nas temperaturas de 10 °C e 30 °C ficou maior em comparação com o controle (sem incubação) até o período máximo de incubação (4 h). A 45 °C, a enzima reteve cerca de 60% da sua atividade original após uma hora de incubação (Figura 20 C). Com base nesses resultados, podemos sugerir que ocorra o fenômeno da ativação térmica para a EST5, assim como para a EST3. A ativação térmica pode estar relacionada ao conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos da proteína (KLUMP et al., 1992; RATHI et al., 2000) uma vez que estes ficaram torno de 50% do total de aminoácidos para a EST5 .

Figura 20 - Influência da temperatura na atividade da EST5. (A) Atividade enzimática em tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,5, com pNP-butirato como substrato. **(B)** Perfil de desnaturação térmica. As alterações na elipticidade molar a 222 nm foram verificadas a uma taxa de 1 °C/min nos pHs: 7,0 (●), 8,0 (▲) e 9,0 (■). **(C)** Termoestabilidade. A atividade enzimática foi determinada a 30 °C após diferentes períodos de incubação a 10°C (■), 30°C (●), 37°C (▲) e 45°C (◆) utilizando-se pNP-butirato como substrato. A atividade da enzima sem incubação prévia foi definida como 100%.

5.4.2.3 Determinação da especificidade e parâmetros cinéticos da EST5

A atuação da enzima em diferentes substratos pNP-ésteres foi analisada na condição de ensaio padrão, em pH 7,5, a 43°C, utilizando 0,027 µM de enzima. A enzima foi capaz de hidrolisar pNP-ésteres com cadeia acil de 2 a 14 átomos de carbono (C2-C14), como mostrado na figura 21. EST5 exibiu maior atividade para pNP-valerato (C5) e 78% da atividade máxima em pNP-octanoato (C8). A atividade

em pNP-acetato (C2) e pNP-decanoato (C10) foram similares, um pouco maior que 30% da atividade máxima. No entanto, a partir de C10, a atividade decaiu consideravelmente.

Figura 21 - Especificidade da EST5 por diferentes substratos. A análise foi realizada em pNP-ésteres de diferentes comprimentos (C2 a C14), no ensaio padrão de determinação da atividade.

A enzima purificada mostrou maior valor da relação K_{cat}/K_m para C5 ($1533,27 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$), indicando a preferência da enzima por este substrato. EST5 apresentou, respectivamente, valores de V_{max} e K_{cat}/K_m aproximadamente 1,8 e 2,3 vezes maior para C8 em comparação com C4. Para os substratos C2 e C10, a eficiência catalítica da enzima foi semelhante, $18,1$ e $17,5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$, respectivamente (Tabela 6).

Apesar da atuação da enzima em substratos com diferentes tamanhos de cadeia de carbono, para pNP-ésteres cuja cadeia acila é maior que 10 átomos de carbono, as atividades relativas foram menores que 10%, justificando a classificação da EST5 como esterase (ARPIGNY; JAEGER, 1999).

Poucas esterases da família V têm sido caracterizadas bioquimicamente. Entre elas, a esterase Est1, de biblioteca metagenômica de fonte termal, que foi capaz de atuar em pNP-ésteres com cadeia acila de 2 a 16 átomos de carbono e, assim como a EST5, também apresentou maior atividade em pNP-valerato, porém com um valor de K_{cat}/K_m aproximadamente 1,6 vezes menor (TIRAWONGSAROJ et al., 2008). A esterase LC-Est1 exibiu maior atividade em pNP-butirato e pNP-

hexanoato, sendo o valor de K_{cat} e K_m determinados somente para C4. A relação de K_{cat}/K_m para esta enzima de metagenoma de compostagem de folhas e galhos foi de $19,33 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (OKANO et al., 2015). Das 37 enzimas lipolíticas de bibliotecas metagenômicas de solo de floresta e pradaria identificadas por NACKE et al. (2011), oito pertenciam à família V, classificadas como esterases, com preferência por pNP-butirato.

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos da esterase EST5 em diferentes substratos pNP-ésteres.

Substrato	$V_{max} (\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1})$	$K_m (\text{mM})$	$K_{cat} (\text{s}^{-1})$	$K_{cat}/K_m (\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1})$
pNP-acetato (C2)	$0,51 \pm 0,03$	$1,05 \pm 0,13$	$18,97 \pm 1,18$	18,1
pNP-butirato (C4)	$0,78 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,05$	$29,04 \pm 1,46$	67,7
pNP-valerato (C5)	$2,4 \pm 0,04$	$0,058 \pm 0,01$	$88,93 \pm 1,02$	1533,27
pNP-octanoato (C8)	$1,41 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,04$	$52,22 \pm 1,28$	158,24
pNP-decanoato (C10)	$0,34 \pm 0,02$	$0,728 \pm 0,1$	$12,79 \pm 0,74$	17,5

5.4.2.4 Efeito de aditivos na atividade da EST5

Muitos processos biotecnológicos ocorrem na presença de sais e alguns íons no meio de reação e estes podem alterar a atividade da enzima (BOFILL et al., 2010). Dessa forma, a atividade da EST5 foi avaliada na presença de íons e sais nas concentrações de 0,5 e 1 mM.

A atividade da EST5 aumentou na presença de quase todos os íons e sais testados a 0,5 mM, particularmente Mn^{2+} e K^+ , responsáveis por um aumento de aproximadamente 70%, e Ca^{2+} , com um aumento de mais de 60%. Nesta concentração, Fe^{+3} e Na^+ praticamente não alteraram a atividade da enzima, enquanto os outros sais e íons testados aumentaram entre 27 a 45%. Ao aumentar a concentração de Na^+ para 1 mM, a atividade relativa elevou-se para 141%. Alguns íons metálicos podem aumentar a solubilidade dos substratos, aumentando sua disponibilidade para a enzima (KUMAR et al., 2012). A atividade foi a mesma com 0,5 mM e 1 mM de Mg^{2+} , em torno de 114% e quase não foi alterada com 1 mM de Ni^{2+} e Mn^{2+} . Os outros sais e íons testados, a 1 mM, inibiram a atividade da enzima, que exibiu entre 68 a 89% de sua atividade relativa (Figura 22 A). Sabe-se que

esterases respondem de maneira diferente à presença de determinados íons metálicos (JEON et al., 2011; MAQBOOL et al., 2006; WU; SUN, 2009).

Figura 22 - Efeito de aditivos na atividade da EST5. (A) Efeito de íons e sais. A atividade enzimática foi determinada na presença de 0,5 mM (cinza claro) e 1 mM (cinza escuro) de íons metálicos, sais e EDTA. **(B)** Efeito dos detergentes a 1 mM e 5 mM sobre a atividade enzimática. **(C)** Efeito da ação de solventes orgânicos. A atividade da enzima foi determinada em 1% (■), 10% (▒), e 20% (▨) de solventes orgânicos. As atividades relativas foram calculadas em comparação com a atividade controle (■), no qual o elemento analisado foi substituído por água, no ensaio padrão com pNP-valerato.

O agente quelante EDTA elevou a atividade da enzima nas duas concentrações testadas. A enzima apresentou aproximadamente 170% e 113% de

atividade relativa na presença de 0,5 mM e 1 mM, respectivamente. A atividade da enzima lipolítica Lp_3562 de *Lactobacillus plantarum* foi estimulada na presença de 1 mM de EDTA, apresentando atividade relativa de 121%, e também dos íons metálicos Mg^{+2} , Ni^{+2} e Mn^{+2} (ESTEBAN-TORRES et al., 2014), assim como para a EST5.

Detergentes são normalmente adicionados ao meio de reação de enzimas lipolíticas para melhorar a qualidade da emulsão, no entanto, elevadas concentrações podem desnaturar a enzima (FU et al., 2011). Os detergentes não iônicos inibiram a atividade da EST5: não foi constatada atividade na presença de Tween 80; a atividade se manteve estável, com 83 e 85% de atividade relativa na presença de 1 mM e 5 mM de Tween 20, respectivamente; Triton X-100 inibiu 20% da atividade em 1 mM, restando apenas 10% de atividade com 5 mM. Com relação aos detergentes iônicos, SDS inibiu totalmente a atividade da enzima, 1 mM de CTAB aumentou em quase 70% a atividade da EST5 e em 5 mM, a atividade decaiu para 24% (Figura 22 B).

A resistência a solventes orgânicos é desejável para muitas aplicações biotecnológicas. O efeito dos solventes orgânicos e glicerol nas concentrações de 1, 10 e 20% sobre a atividade da enzima estão demonstrados na figura 22 C. A atividade da EST5 quase não foi alterada na presença de DMSO, nas três concentrações testadas, nem na presença de 10% de metanol. Metanol, etanol, 2-Butanol e 2-Propanol estimularam a atividade da enzima na menor concentração avaliada, porém, com exceção do metanol, 10% dessas substâncias inibiram a atividade da EST5, resultando em 70, 83 e 41% de atividade relativa, respectivamente. Na concentração de 20% de solventes orgânicos só foi constatada atividade em DMSO (86%) e 2-Propanol (40%). Na presença de 1% e 10% de glicerol, a atividade da EST5 aumentou em 32% e 47%, respectivamente, sendo inibida na presença de 20% dessa substância. Sabe-se que, apesar do efeito crioprotetor, concentrações elevadas de glicerol têm efeitos negativos sobre a atividade enzimática devido à redução da difusão do substrato no sítio ativo hidrofóbico da enzima (XU et al., 2011). O mesmo perfil foi observado para a esterase EstOF4, que se manteve estável em 10% de DMSO, foi inibida por 2-propanol e 2-butanol e teve sua atividade fracamente estimulada em 10% de glicerol (RAO et al., 2013).

5.4.3 Modelo estrutural da EST5

Com o propósito de obter informações quanto à posição do sítio catalítico, resíduos envolvidos no bolsão de ligação com o substrato e cavidade interna da proteína, o modelo estrutural da proteína EST5 foi gerado utilizando como molde as coordenadas estruturais da metilesterase de *Streptomyces sp.* (PDB 1Q0R) e da esterase de *Escherichia coli* (PDB 3BF7), que possuem 31% e 29% de identidade com a EST5, respectivamente.

O modelo estrutural da EST5 apresenta enovelamento alfa-beta, típico da família das α/β -hidrolases (NARDINI; DIJKSTRA, 1999), composto por oito folhas beta (apenas a $\beta 2$ é antiparalela) e 11 alfa hélices (Met38-Asn40, Ser43-Arg52, Leu95-Leu109, Met121-Arg136, Leu152-Ala161, Arg172-Gln187, Asp195-Met209, Gln218-Ala220, Gly226-Lys234, Gly255-Ser261, Val279-Glu297). Dentre as 11 hélices, quatro compõem o cap-domínio (αE , αF , αG , αH , em *deepblue* na Figura 22 A), o qual está situado acima da tríade catalítica composta por Ser120, Asp247 e His275 (*stick* amarelo). No modelo da EST5, o sítio nucleofílico está situado entre $\beta 5$ e αD , enquanto que, os outros dois sítios estão próximos (3,4 Å) e dispostos entre $\beta 7$ e αJ e entre $\beta 8$ e αK , respectivamente (Figura 23 A).

A fim de comparar o modelo da EST5 com as estruturas tridimensionais moldes usadas para a obtenção do modelo, alinhamentos estruturais foram feitos e permitiram verificar a boa sobreposição da EST5 com a estrutura de metilesterase de *Streptomyces sp* (Figura 23 B, em cinza escuro) e com a estrutura da esterase de *Escherichia coli* (Figura 23B, em cinza claro), conforme o esperado, mostrando valores de r.m.s.d de 0,18 Å e 2,86 Å, respectivamente (Figura 23 B). Conforme verificado por Pereira et al. (2015) no estudo da proteína Est16, as estruturas da família alfa/beta hidrolase conservam um grande domínio alfa-beta que sustenta um pequeno domínio helical, fato que também foi verificado no modelo da EST5 e nas estruturas moldes usadas (Figura 23 B).

A região helical é provavelmente responsável por formar cavidades internas com volume variado, o que consequentemente reflete no comprimento da cadeia de carbono que terá acesso à tríade catalítica. Assim, ao comparar a cavidade interna da proteína EST5 com as cavidades das estruturas moldes usadas (Figura 23 C, D e E), verifica-se que a EST5 apresenta uma cavidade interna maior que as demais. Estes dados corroboram com os dados obtidos na caracterização funcional desta

proteína, que mostrou atividade de hidrolase em substratos com até 14 carbonos, mostrando que na cavidade interna da EST5 longas cadeias de carbono podem ser alocadas e ainda aponta o potencial desta proteína em reações com outros substratos, diferente dos testados, como diversos triacilgliceróis.

Figura 23 - Modelo estrutural da proteína EST5. **(A)** Representação em *cartoon* do modelo estrutural da EST5, com hélices em *limegreen*, folhas beta em *vermelho* e *loops* em *cinza*. As hélices que compõem o *cap domain* estão em *deepblue* e os resíduos da tríade catalítica em *amarelo*. **(B)** Alinhamento estrutural da EST5 com a metilesterase de *Streptomyces* sp. (PDB 1Q0R, em cinza escuro) e com a esterase de *Escherichia coli* (PDB 3BF7, em cinza claro). **(C)** Cavidade interna da EST5 representada em *mesh* *vermelho* e os resíduos da tríade catalítica em *amarelo*; **(D)** Cavidade interna da metilesterase de *Streptomyces* sp. (PDB 1Q0R) representada em *mesh* *cinza escuro* e os resíduos da tríade catalítica em *cinza*. **(E)** Cavidade interna da esterase de *Escherichia coli* (PDB 3BF7) representada em *mesh* *cinza claro* e os resíduos da tríade catalítica em *cinza*.

5.4.4 Obtenção de cristais e Difração da proteína EST5

Na tentativa da resolução da estrutura da proteína EST5, inicialmente ela foi submetida a ensaios de cristalização. A formação de cristais ocorreu em duas condições do kit Crystal Screen: I) sulfato de amônia 2 M; HEPES 0,1 M, pH 7,5; e 2% de PEG 4000; II) sulfato de amônia 2 M; HEPES 0,1 M, pH 8,0; e 1% de 2-metil-2,4-pentanediol) na concentração de 5,5 mg/mL; e em uma condição do kit Precipitant Synergy: formato de amônia 0,2 M, e 20% de PEG 3350, na concentração de 6,8 mg/mL.

Os cristais obtidos, no entanto, se apresentaram na forma de *twinning* (cristais sobrepostos), como pode ser observado na figura 24 A, sendo necessário refinar as condições de cristalização. O refinamento foi realizado variando-se a concentração do precipitante, concentração do sal, pH do tampão e a relação proteína:precipitante. A melhor condição encontrada para a formação dos cristais foi na proporção de 1:1 (proteína:precipitante), com HEPES como agente tamponante, em pH 7,5; e polietilenoglicol e sulfato de amônia como agentes precipitantes. Além disso, aumentar o tamanho da gota de também resultou em melhora na formação dos cristais (Figura 24 B).

Os cristais obtidos do refinamento tinham em média um tamanho de 400 μm x 200 μm , com a forma retangular ou triangular, e foram submetidos ao feixe de raios-X. Foi possível coletar os dados da difração de um cristal, a 2,311 Å, dando continuidade ao processamento.

Figura 24 - Cristais da proteína EST5, antes **(A)** e após o refinamento da condição de cristalização **(B)**. O cristal submetido ao feixe de raios-X está marcado em preto. **(C)** Padrão de difração da proteína obtido após a irradiação do cristal. Os dados foram coletados na linha de cristalografia MX1 do LNLS e difrataram a 2,311 Å.

5.4.4.1 Processamento dos dados cristalográficos

A tabela 7 mostra os resultados obtidos na coleta e no processamento dos dados, onde foram definidos o grupo espacial e os parâmetros da célula unitária para a proteína. Os cristais da EST5 demonstraram simetria e ausências sistemáticas do grupo espacial $P2_12_12_1$ com dimensões da célula unitária de $a = 97,465$, $b = 123,587$, $c = 124,651$ e α , β e γ iguais a 90.

Tabela 7 - Resultados da coleta e processamento dos dados da proteína EST5.

Grupo espacial	$P 2_1 2_1 2_1$
Parâmetros da célula unitária (Å)	$a = 97,465$, $b = 123,587$, $c = 124,651$ $\alpha = 90$, $\beta = 90$, $\gamma = 90$
Mosaicidade (°)	1
Temperatura (K)	100
Comprimento de onda (Å)	1,459
Oscilação (°)	0,5
Distância do detector (mm)	181,24
Número de imagens	625
Resolução (Å)	48,72 – 2,311
$I/\sigma(I)$	34,64 (9,8)
Completeza (%)	100
Multiplicidade	21,2
R_{meas}	0,39 (0,065)
Número de reflexões	662493
Número de reflexões únicas	59758

Os dados obtidos na coleta dos dados serão utilizados na tentativa de resolver a estrutura da EST5. Para isso, as coordenadas atômicas da metilesterase Rdmc (PDB 1Q0R) serão utilizadas como modelo para a resolução da estrutura por substituição molecular e os dados obtidos serão utilizados no processo de

refinamento da estrutura cristalográfica. Uma vez que sua estrutura seja elucidada será possível determinar os elementos estruturais relacionados ao modo de ação da enzima e, dessa forma, propor alterações que permitam superar as possíveis limitações de aplicação da EST5.

As ferramentas da engenharia de proteínas têm permitido abrir novos caminhos para o desenvolvimento de biocatalisadores por meio da criação de variantes de enzimas quando a forma selvagem não se encaixe às necessidades industriais (DAVIDS et al., 2013), tais como a necessidade de cumprir a termodinâmica da reação, atividade específica nas condições exigidas, cinética em concentrações necessárias e estabilidade e tolerância a solventes orgânicos (WOODLEY, 2013). No trabalho de Pereira et al. (2015), após ser resolvida a estrutura da esterase Est8, foi proposto o desenvolvimento do mutante Est8MF, visando aumentar o canal que dá acesso à tríade catalítica da proteína. Ensaio funcionais do mutante Est8MF mostraram que a sua velocidade de reação foi quatro vezes maior quando comparada com a proteína selvagem (Est8) usando pNP-butirato como substrato.

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi possível identificar quatro ORFs codificadoras de enzimas lipolíticas de biblioteca metagenômica de consórcio microbiano degradador de óleo diesel e desenvolver a caracterização funcional de duas novas esterases:

- Ambas as proteínas apresentaram o fenômeno da ativação térmica, em que a atividade da EST3 foi totalmente recuperada após 1h de incubação a 30 °C e 40 °C e a atividade da EST5 foi elevada a 140% após 4 h de incubação a 30 °C;
- A atividade máxima da EST5 se deu a 45 °C, com uma T_m de 47 °C. Já a EST3 exibiu atividade máxima a 41 °C e ainda demonstrou 40% de atividade a 75 °C, com uma T_m de 56,5 °C, o que pode resultar em economia no consumo de energia;
- A EST3 apresentou atividade máxima em pH 6,0, contrastando com a maioria das esterases, as quais exibem pH ótimo na região alcalina, enquanto a EST5 mostrou maior atividade em pH 7,5;
- Ambas as enzimas exibiram atividade de esterase devido à preferência por substratos de cadeia curta. A EST3 foi capaz de hidrolisar pNP-ésteres com cadeia acil de até 12 carbonos. Os parâmetros catalíticos exibidos por essa esterase em pNP-acetato foram elevados em comparação com esterases da literatura. Já a EST5 foi capaz de hidrolisar pNP-ésteres com cadeia acil de 2 a 14 átomos de carbono e exibiu maior atividade em pNP-valerato (C5);
- Em geral, a atividade da EST3 e da EST5 aumentou na presença de quase todos os íons testados. Já os detergentes não iônicos inibiram a atividade das enzimas, mas a EST5 quase não foi influenciada por até 5 mM de Tween 20. Curiosamente, CTAB, um surfactante sintético, elevou significativamente a atividade das enzimas e, este perfil não é comum entre as esterases.
- Sugere-se que em pH 9,0 ocorram pequenas alterações na estrutura da EST5 que inibem sua atividade, demonstrado pelos resultados de dicroísmo circular e fluorescência intrínseca dos triptofanos;
- A atividade da EST5 quase não foi alterada na presença de DMSO. 10% de 2-Propanol, metanol e etanol resultaram em 70, 83 e 97% de atividade relativa, respectivamente, sugerindo uma aplicação compatível com solventes orgânicos.

- EST3 e EST5 apresentaram modelos estruturais da família das alfa/beta hidrolases, com um cap-domínio, provavelmente relacionado ao reconhecimento e controle da entrada de substratos. Apresentaram uma cavidade interna maior que as dos modelos, sugerindo que possam hidrolisar diferentes triacilgliceróis, tornando-as potenciais candidatas para aplicações industriais;
- Um dos cristais da proteína EST5 difratou a 2,311 Å e futuramente espera-se resolver a estrutura desta proteína.

REFERÊNCIAS *

ACCORSINI, F. R. et al. Biosurfactantes production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 116–125, 2012.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical journal**, v. 343, p. 177–183, 1999.

BASSEGODA, A.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P. *Rhodococcus* sp. strain CR-53 LipR, the first member of a new bacterial lipase family (family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the *Candida antarctica* lipase clan. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1724–1732, 2012.

BOFILL, C. et al. Differential behaviour of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipC, a lipase showing greater versatility than its counterpart LipA. **Biochimie**, v. 92, n. 3, p. 307–316, 2010.

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

BÜLOW, L.; MOSBACH, K. The expression in *E. coli* of a polymeric gene coding for an esterase mimic catalyzing the hydrolysis of p-nitrophenyl esters. **FEBS letters**, v. 210, n. 2, p. 147–152, 1987.

BUNTERNGSOOK, B. et al. Identification and Characterization of Lipolytic Enzymes from a Peat-Swamp Forest Soil Metagenome. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 9, p. 1848–1854, 2010.

CHENG, X. et al. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Cold-Adapted Family VIII Esterase from a Biogas Slurry Metagenomic Library. **Journal of microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1484–1489, 2014.

CHOI, K.-Y. et al. Consolidated conversion of protein waste into biofuels and ammonia using *Bacillus subtilis*. **Metabolic engineering**, v. 23, p. 53–61, 2014.

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

CHU, X. et al. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 615–625, 2008.

COUTO, G. H. et al. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 9, n. 1, p. 514–523, 2010.

DAVIDS, T. et al. Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 2, p. 215–220, 2013.

DE SIMONE, G. et al. A snapshot of a transition state analogue of a novel thermophilic esterase belonging to the subfamily of mammalian hormone-sensitive lipase. **Journal of molecular biology**, v. 303, n. 5, p. 761–771, 2000.

EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 66, n. 4, p. 486–501, 2010.

ESTEBAN-TORRES, M. et al. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, p. 1–7, 2014.

EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred . II. Error Probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186–194, 1998.

FAN, X. et al. Identification and characterization of a novel thermostable pyrethroid-hydrolyzing enzyme isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, v. 33, n. 11, p. 1-11, 2012.

FAORO, H. et al. Characterization of a new Acidobacteria-derived moderately thermostable lipase from a Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **FEMS microbiology ecology**, v. 81, n. 2, p. 386–394, 2012.

FERRER, M.; MARTÍNEZ-ABARCA, F.; GOLYSHIN, P. N. Mining genomes and “metagenomes” for novel catalysts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 588–593, 2005.

FOJAN, P. et al. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1033–1041, 2000.

FU, C. et al. Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 961–970, 2011.

FU, J. et al. Functional and structural studies of a novel cold-adapted esterase from an Arctic intertidal metagenomic library. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 9, p. 3965–3978, 2013.

GARCIA, R. A. M. et al. Investigation, Expression, and Molecular Modeling of ORF2, a Metagenomic Lipolytic Enzyme. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 8, p. 3875–3887, 2015.

GILLESPIE, E. D. et al. Isolation of antibiotic Turbomycin A and Turbomycin B from a metagenomic library. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4301–4306, 2002.

GLOGAUER, A. et al. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial cell factories**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2011.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 195–202, 1998.

GREENFIELD, N. J. Biomacromolecular Applications of Circular Dichroism and ORD. In: LINDON, J. C.; TRANTER, G. E.; HOLMES, J. L.(Eds). **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 153-165.

GRUNINGER, R. J. et al. Biochemical and kinetic characterization of the multifunctional β -glucosidase/ β -xylosidase/ α -arabinosidase, Bgxa1. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 7, p. 3003–3012, 2014.

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

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 10, p. 245–249, 1998.

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

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

HAUSMANN, S.; JAEGER, K. E. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. p. 1099–1126.

HENNE, A et al. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3113–3116, 2000.

HU, Y. et al. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. **FEMS microbiology ecology**, v. 72, n. 2, p. 228–237, 2010.

HUDDLESTON, S.; YALLOP, C. A; CHARALAMBOUS, B. M. The identification and partial characterisation of a novel inducible extracellular thermostable esterase from the archaeon *Sulfolobus shibatae*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 216, n. 2, p. 495-500, 1995.

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

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

JEON, J. H. et al. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, n. 5, p. 865–874, 2009.

JEON, J. H. et al. Novel lipolytic enzymes identified from metagenomic library of deep-sea sediment. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2011, p.1-9, 2011.

JEON, J. H. et al. Identification of a new subfamily of salt-tolerant esterases from a metagenomic library of tidal flat sediment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 623–631, 2012.

KABSCH, W. Xds. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 2010.

KANG, C.-H. et al. A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. **Microbial cell factories**, v. 41, n. 10, p. 1-8, 2011.

KIM, E.-Y. et al. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 1, p. 257–60, 2009.

KLUMP, H. et al. Glutamate Dehydrogenase from the Hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. **Biochemistry**, v. 267, n. 31, p. 22681–22685, 1992.

KNIGHT, V. et al. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnol**, v. 62, p. 446–458, 2003.

KUMAR, S. et al. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 300–304, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEE, M.-H. et al. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7406–7409, 2006.

LI, J.-L.; CHEN, B.-H. Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Materials**, v. 2, n. 1, p. 76–94, 2009.

LI, S. et al. Technology Prospecting on Enzymes : Application , Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2012.

LIAW, R.-B. et al. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. **Bioresource technology**, v. 101, n. 21, p. 8323–8329, 2010.

LONG, Z. DE et al. Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, n. 3-4, p. 105–110, 2007.

LOPES, E. M. et al. Emulsification Properties of Bioemulsifiers Produced by Wild-Type and Mutant *Bradyrhizobium elkanii* Strains. **Bioremediation & Biodegradation**, v. 5, n. 6, p. 1–6, 2014.

LÓPEZ-LÓPEZ, O.; CERDÁN, M. E.; GONZALEZ-SISO, M. I. New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics. **Current protein & peptide science**, v. 15, p. 445–455, 2014.

LORENZ, P. et al. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 572–7, 2002.

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

LUO, Y. et al. Application of a silica gel prolonged-release system for methanol in the production of biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 11, p. 1846–1848, 2006.

MAQBOOL, Q. A et al. Purification and characterization of a novel enantioselective hydrolase from *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 227–234, 2002.

MAQBOOL, Q. U. A et al. Molecular cloning of carboxylesterase gene and biochemical characterization of encoded protein from *Bacillus subtilis* (RRL BB1). **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 1, p. 1–10, 2006.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M. et al. Biochemical studies on a versatile esterase that is most catalytically active with polyaromatic esters. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 184–191, 2014.

MEI, Y. et al. Exceptional thermal stability and organic solvent tolerance of an esterase expressed from a thermophilic host. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1965–1974, 2012.

MYERS, J. K.; PACE, C. N.; SCHOLTZ, J. M. Denaturant m values and heat capacity changes : Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. **Protein science**, p. 2138–2148, 1995.

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

NAM, K. H. et al. Structural and functional analysis of a novel EstE5 belonging to the subfamily of hormone-sensitive lipase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 379, n. 2, p. 553–556, 2009.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. α/β Hydrolase fold enzymes : the family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 732–737, 1999.

NOVOZYMES A/S. **The Novozymes Report 2013**. Bagsvaerd, 2013. Disponível em: <<http://report2013.novozymes.com/>>. Acesso em 18 de dezembro de 2014.

OH, B. et al. Staphylococcus haemolyticus lipase : biochemical properties , substrate specificity and gene cloning. **FEMS microbiology ecology**, v. 179, p. 385–392, 1999.

OKAMURA, Y. et al. Isolation and characterization of a GDSE esterase from the metagenome of a marine sponge-associated bacteria. **Marine biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 395–402, 2010.

OKANO, H. et al. Structural and biochemical characterization of a metagenome-derived esterase with a long N-terminal extension. **Protein Science**, v. 24, p. 93–104, 2015.

OLLIS, D. L. et al. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 1989, p. 197–211, 1990.

PAIXÃO, D. A. A. et al. Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 1, p. 773–781, 2010.

PENG, Q. et al. Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2014.

PEREIRA, M. R. et al. Utilização de enzimas lipolíticas na produção de biodiesel. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. (Eds.). **Bioenergia: Desenvolvimento, Pesquisa e Inovação**. 1. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2012. p. 319–339.

PEREIRA, M. R. et al. Est16, a New Esterase Isolated from a Metagenomic Library of a Microbial Consortium Specializing in Diesel Oil Degradation. **Plos One**, 2015, In press.

PRIVÉ, F. et al. Isolation and characterization of novel lipases/esterases from a bovine rumen metagenome. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5475-5485, 2015.

PUSHPAM, P. L.; RAJESH, T.; GUNASEKARAN, P. Identification and characterization of alkaline serine protease from goat skin surface metagenome. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2011.

RANJAN, R. et al. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 335, n. 1, p. 57–65, 2005.

RAO, L. et al. A novel alkaliphilic bacillus esterase belongs to the 13(th) bacterial lipolytic enzyme family. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. 1-10, 2013.

RATHI, P. et al. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas sp.* with the property of thermal activation. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 6, p. 495–498, 2000.

REES, H. C. et al. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles : life under extreme conditions**, v. 7, n. 5, p. 415–421, 2003.

RHEE, J. et al. New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to the Hormone-Sensitive Lipase Family , Cloned from a Metagenomic Library. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 2, p. 817–825, 2005.

ROH, C.; VILLATTE, F. Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. **Journal of applied microbiology**, v. 105, n. 1, p. 116–123, 2008.

RÖTTIG, A. et al. Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1713–1733, 2010.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method : A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution** v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SALAMEH, M. A; WIEGEL, J. Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. **The open biochemistry journal**, v. 4, p. 22–28, 2010.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Testraints. **Journal of molecular biology**, v. 234, p. 779–815, 1993.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. 3 ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v.

SARANYA, P. et al. Lipase production from a novel thermo-tolerant and extreme acidophile *Bacillus pumilus* using palm oil as the substrate and treatment of palm oil-containing wastewater. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, n. 5, p. 3907–3919, 2014.

SHARMA, P. K. et al. Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary structure at ambient temperature. **Molecular biology reports**, v. 39, p. 2795–2804, 2012.

SHELDON, R. A; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–35, 2013.

STEELE, H. L. et al. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 25–37, 2009.

STEEN, E. J. et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 559–562, 2010.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TAO, W. et al. Characterization of two metagenome-derived esterases that reactivate chloramphenicol by counteracting chloramphenicol acetyltransferase. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1203–10, 2011.

TCHIGVINTSEV, A. et al. The environment shapes microbial enzymes: five cold-active and salt-resistant carboxylesterases from marine metagenomes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2165–2178, 2015.

TIRAWONGSAROJ, P. et al. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. **Journal of biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 42–49, 2008.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782–787, 1990.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616–22, 2009.

ULLAH, A. H. J.; SETHUMADHAVAN, K.; MULLANEY, E. J. Salt Effect on the pH Profile and Kinetic Parameters of Microbial Phytases. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, p. 3398–3402, 2008.

VERMA, S. et al. Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of *E. coli* asparaginase II. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 7, p. 1219–1230, 2014.

VOGET, S. et al. Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6235–6242, 2003.

WANG, G. et al. Molecular cloning and characterization of a novel SGNH arylesterase from the goat rumen contents. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1561–1570, 2011.

WANG, J. et al. Mutational analysis of the “regulatory module” of hormone-sensitive lipase. **Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1953–1959, 2005.

WEI, Y. et al. Crystal structure of brefeldin A esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormone- sensitive lipase. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 4, p. 340–345, 1999.

WEMHEUER, B. et al. Microbial diversity and biochemical potential encoded by thermal spring metagenomes derived from the Kamchatka Peninsula. **Archaea**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

WOODLEY, J. M. Protein engineering of enzymes for process applications. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 2, p. 310–316, 2013.

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

XU, Y. et al. In situ visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 213–219, 2011.

ZHANG, A. et al. Discovery of a novel esterase subfamily sharing an identified arm sequence (ArmEst) by gene-specific metagenomic PCR. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 11, p. 1937-1944, 2013.

ANEXO A: Análise do sequenciamento do clone PL14.H10

Figura A1 - Comparação da sequência do *contig* do clone PL14.H10, de 32000 pb, com as sequências do NCBI, usando a ferramenta Blastn.

Tabela A1 - Identificação das ORFs da sequência do clone PL14.H10, em comparação com sequências do NCBI, pelo programa ORF Finder

ORF	Tamanho (aa)	Descrição	Organismo/número de acesso	Identidade (%)	E-value	(continua).
						Query-coverage (%)
1	355	acyl-CoA desidrogenase domain-containing protein	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1 (WP_012110589.1)	80	0	100
2	615	potassium transporter	<i>Kaistia adipata</i> (WP_029075797.1)	52	0	96
3	255	3-oxoacyl-ACP reductase	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1 (WP_012110588.1)	80	6e-149	100
4	416	alpha/beta hydrolase fold	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1 (ABS63296.1)	70	2e-145	74
5	303	lipase/esterase	uncultured bacterium (ADM63077.1)	80	0	98

Tabela A1 - Identificação das ORFs da sequência do clone PL14.H10, em comparação com sequências do NCBI, pelo programa ORF Finder.

(continuação).

ORF	Tamanho (aa)	Descrição	Organismo/número de acesso	Identidade (%)	E-value	Query-coverage (%)
6	302	lipase/esterase	uncultured bacterium (ADM63076.1)	87	0	94
7	251	DSBA oxidoreductase	alpha proteobacterium MA2 (WP_045446522.1)	78	1e-124	85
8	589	FAD dependent oxidoreductase	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1 (ABS63290.1)	76	0	95
9	317	diacylglycerol kinase catalytic region	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1 (ABS63289.1)	67	3e-148	99
10	593	alkylglycerone-phosphate synthase	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (WP_012110579.1)	80	0	93
11	567	sulfate permease	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (WP_012110578.1)	74	0	92
12	537	AMP-dependent synthetase and ligase	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (WP_012110577.1)	76	0	97
13	312	alpha/beta hydrolase	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (WP_012110575.1)	74	1e-141	95
14	89	Cytosolic phospholipase A2 epsilon	<i>Cariama cristata</i> (KFP62769.1)	33	0,70	65
15	522	acyl-CoA synthetase	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (WP_012110570.1)	77	0	100
16	183	Carboxymuconolactone decarboxylase	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (WP_012110569.1)	78	5e-101	100
17	324	MBL fold metallo-hydrolase	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (WP_012110562.1)	81	0	100
18	289	glutathione S-transferase	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (WP_012110561.1)	69	1e-133	90
19	314	hypothetical protein	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (WP_012110560.1)	72	1e-170	100

Tabela A1 - Identificação das ORFs da sequência do clone PL14.H10, em comparação com sequências do NCBI, pelo programa ORF Finder.

(continuação).

ORF	Tamanho (aa)	Descrição	Organismo/número de acesso	Identidade (%)	E- value	Query- coverage (%)
20	142	conserved exported protein of unknown function	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 (CCD00712.1)	34	2e-13	91
21	267	dehydrogenase	<i>Parvibaculum</i> <i>lavamentivorans</i> (WP_012110558.1)	80	6e-134	100
22	175	transcriptional regulator, TetR family	<i>Parvibaculum</i> <i>lavamentivorans</i> DS-1 (ABS63266.1)	59	1e-64	99
23	405	monooxygenase	<i>Parvibaculum</i> <i>lavamentivorans</i> (WP_012110556.1)	84	0	100
24	599	acyl-CoA synthetase	<i>Parvibaculum</i> <i>lavamentivorans</i> (WP_012110555.1)	71	0	100
25	153	SirA family protein	<i>Parvibaculum</i> <i>lavamentivorans</i> DS-1 (ABS63263.1)	84	8e-30	47
26	189	GCN5-related N- acetyltransferase	<i>Parvibaculum</i> <i>lavamentivorans</i> DS-1 (ABS63262.1)	65	8e-80	95
27	123	hypothetical protein	<i>Parvibaculum</i> <i>lavamentivorans</i> (WP_012110552.1)	67	8e-47	92
28	270	hypothetical protein	<i>Parvibaculum</i> <i>lavamentivorans</i> (WP_012110551.1)	69	2e-117	91
29	209	transcriptional regulator, TetR family	<i>Parvibaculum</i> <i>lavamentivorans</i> DS-1 ABS63259.1	70	2e-83	74

ANEXO B: Modelo estrutural da esterase EST3

Figura B1 - Modelo tridimensional da proteína EST3. O modelo foi construído baseado na estrutura cristalográfica das carboxilesterases de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (PDB 1EVQ) e de *Sulfolobus tokodaii* (PDB 3AIK), com o programa MODELLER 9.10. Representação em *cartoon* da estrutura terciária com os domínios helicoidal (verde) e alfa/beta (rosa e azul). Resíduos da tríade catalítica são evidenciados em *sticks*. Em evidência está demonstrado o bolsão de ligação ao substrato da proteína

ANEXO C: Resultado da purificação da esterase EST5 por filtração em gel

Figura C1 - Cromatograma da purificação por filtração em gel da proteína EST5.