THAÍS CARVALHO MAESTER

PROSPECÇÃO DE SEQUÊNCIAS GENÔMICAS CODIFICADORAS DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora:
Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

São Paulo
2011

RESUMO

MAESTER, Thaís Carvalho. **Prospecção de sequências genômicas codificadoras de enzimas lipolíticas degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As enzimas lipolíticas possuem enorme potencial biotecnológico, seja para formulação de detergentes, na indústria de couro, na produção de cosméticos, fármacos, aromas, biodiesel, dentre outros. A maior parte das lipases é de origem microbiana, apresenta baixa toxicidade e é facilmente biodegradável. O objetivo deste trabalho foi o de prospectar genes para a codificação de enzimas lipolíticas em uma biblioteca metagenômica fosmidial de um consórcio microbiano degradador de hidrocarbonetos de petróleo, com 4224 clones. A seleção foi feita pela atividade lipolítica através do cultivo dos clones em meio de cultura Luria-Bertani (LB) suplementado com 1% de tributirina (v/v), 1% de goma arábica (p/v), 0,00125% de cloranfenicol (v/v) e 0,001% de arabinose (v/v). As células permaneceram a 37 ºC por 72 horas e depois foram transferidas a 4 ºC. A avaliação foi realizada pela observação da formação de halo ao redor das colônias, sendo positiva para 30 clones, dentre os quais dois foram selecionados e tiveram o DNA sub-clonado em vetor pUC19. Os DNAs das sub-bibliotecas foram sequenciados, gerando um *contig* completo para o clone PL28.F10, que foi comparado com as sequências do banco *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), através do programa ORF Finder. Uma ORF codificadora de esterase/lipase de 303 aminoácidos e 61% de identidade com micro-organismo não cultivável foi encontrada. Foram feitos alinhamentos com o programa Clustal W e construção de árvores filogenéticas pelo programa MEGA 4, para comparação entre a ORF encontrada, ORF15, e as sequências depositadas. As árvores indicam que o clone apresenta a ORF15 mais próxima da família IV das esterases/lipases, pois de localizou em um ramo único, diferenciando-se dos outros representantes desta família. Através dos alinhamentos foi possível identificar os sítios ativos representativos da família, confirmando o resultado das árvores filogenéticas, no entanto, foram verificadas algumas modificações nos resíduos de aminoácidos. Quando a mesma análise foi realizada com sequências já patenteadas, a ORF15 se localizou em um ramo único, sendo um grupo irmão das sequências de esterases/lipases da BASF (Patente WO0100842), relacionada à biossíntese de FK228 e seus análogos, utilizados no tratamento do câncer e de uma proteína não identificada da CAMBIA (Patente 6562958, número de acesso AAQ29806.1)., utilizada para diagnóstico e terapia, que possui o domínio conservado das esterases/lipases

Palavras-chave: Lipase. Esterase. Tributirina. Sítios catalíticos. Patentes.

ABSTRACT

MAESTER, Thaís Carvalho. **Screening for genomic sequences which codify lipolytic enzymes specialized in petroleum hydrocarbons degradation**. 2011. 81 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Lipolytic enzymes have show enormous biotechnological potential, such as in enzyme mixtures for the production of detergents, the processing of leather, the production of cosmetics and other pharmaceuticals, perfumes and biodiesel. Most lipolytic enzymes are derived from microbes, present low toxicity, are easily biodegraded and are notably selective of chemicals. The present work was done as an attempt to find genes which codify lipolytic enzymes in a fosmid metagenomic library composed of petroleum hydrocarbons degradation microbe consortia with 4224 clones. Clones were selected according to lipolytic activity and were assessed by cultivation in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with1% tributyrin (v/v), 1% gum arabic (w/v), 0.00125% chloramphenicol (v/v) and 0.001% arabinose (w/v). All cultures were maintained at 37ºC for 72 hours and then transferred at 4ºC. Assessment was done by observation of halos formed around the colonies, with 30 clones producing halo formations and identified as positives. Of these, two were selected and had their DNA sub cloned in pUC19 vectors. DNA from the sub libraries was sequenced, generating a complete *contig* for clone PL28.F10 that was compared to sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) bank by the ORF Finder program. An ORF coding for esterase/lipase of 303 amino acids with 61% of identity with uncunturable microorganism was found. Alignments were done using the Clustal W program and cladograms were constructed using MEGA 4, to compare the ORF found, ORF15, and the deposited sequences. Assessment of the cladograms showed that the clone presented the ORF15 similar to that of esterase/lipase family IV, because it was located in a unique branch, differing from the other representatives of this family. The alignments made possible the identification of active sites which represent the family, confirming the results obtained with the construction of the cladograms, although it was observed some changes in amino acid residues. When the same evaluation was done using patented sequences, the ORF15 showed similarities to patented BASF esterase/lipase (Patent WO0100842) related to biosynthesis of FK228 and its analogues used in cancer treatment and an unnamed protein of CAMBIA (Patent 6562958, accession number AAQ29806.1) used for diagnosis and therapy, which has conserved domain esterases/lipases.

Key words: Lipase. Esterase. Tributyrin. Catalytic sites. Patents

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que há de 10^6 a 10^8 espécies de micro-organismos na Terra (CURTIS et al., 2002) mas, a grande maioria, muito provavelmente, não pode ser cultivada por meio de técnicas convencionais (AMANN et al., 1995). Micro-organismos desempenham papéis importantes no equilíbrio ecológico e devido às alterações ambientais que ocorrem ao longo do tempo, mostram grande diversidade genética (LIAW et al., 2010).

A biotecnologia, na busca por novos biocatalisadores possibilita o desenvolvimento de novas abordagens experimentais para localizar e identificar novos genes codificadores de produtos de interesse biotecnológico. A fim de descobrir novas enzimas e estudar vias metabólicas secundárias, utilizando o genoma de comunidades microbianas complexas de habitats naturais, uma abordagem independente de cultura pode ser aplicada, tal como a construção de uma biblioteca metagenômica (LIAW et al., 2010).

O termo metagenoma foi introduzido para descrever os genomas de comunidades microbianas complexas encontradas em habitats naturais. A investigação de bibliotecas metagenômicas se tornou possível após o desenvolvimento de estratégias para o isolamento e clonagem de DNA de ecossistemas naturais. Uma vez construídas, as bibliotecas metagenômicas permitem a seleção de fenótipos interessantes com potencial ecológico e biotecnológico (HANDELSMAN et al., 1998).

Na busca de novos biocatalisadores, existem várias estratégias metagenômicas que são utilizadas para a seleção de características específicas, como um catalisador que abranja um intervalo significativo da concentração de substrato ou temperatura e pH ótimos. Uma alternativa é gerar a biblioteca metagenômica de solos ou sedimentos que frequentemente contêm alto grau de diversidade microbiana a qual pode expressar uma grande diversidade de biocatalisadores. Esta abordagem tem sido usada com sucesso para encontrar uma grande variedade de novos catalisadores e metabólitos secundários, como lipases (HENNE et al., 2000), esterases (JEON et al., 2009), celulases (KIM et al., 2008), xilanases (HU et al., 2008) e antibióticos (GILLESPIE et al., 2002).

Um aperfeiçoamento desta abordagem pode ser realizado obtendo-se uma biblioteca metagenômica de ambiente que tenha sido submetido a condições extremas, com a possibilidade de que as enzimas desse ambiente sejam capazes de atuar sob tais condições. Além disso, ambientes submetidos a condições extremas podem direcionar a busca por

produtos de interesse. Há exemplos de trabalhos em ambientes adversos, como a construção de biblioteca metagenômica de consórcio microbiano degradador de óleo diesel (PAIXÃO et al., 2009), utilizada neste trabalho. Outro exemplo é o isolamento de enzimas lipolíticas de solos da Antártica (CIELINSK et al., 2009) e de lodo ativado (LIAW et al., 2010).

Enzimas lipolíticas são importantes para o uso em muitas indústrias, como biocatalisadores, na indústria alimentícia, para alimentação humana e animal, detergente, síntese química, de cosméticos, indústria farmacêutica entre outros (JAEGER e EGGERT, 2002). Lipases (EC 3.1.1.3) e esterases (EC 3.1.1.1) são enzimas lipolíticas que hidrolisam e sintetizam glicerídeos de cadeia longa e de cadeia curta (ARPIGNY e JAEGER, 1999), respectivamente. Além de sua ampla utilização, enzimas lipolíticas possuem características que facilitam sua aplicação, tais como ampla especificidade ao substrato e estabilidade em solventes orgânicos (BORNSCHEUER, 2002).

Dessa forma, a utilização da abordagem metagenômica se mostra promissora na busca de gene e/ou produtos gênicos que possam ser utilizados ou incorporados em processos industriais, visando melhorias e redução do custo destes processos. As enzimas lipolíticas, por sua ampla utilização, são excelentes candidatas nessa busca.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enzimas

Avanços técnicos e científicos que ocorreram, principalmente, a partir do século XX favoreceram a utilização das enzimas, sendo que estas passaram a ocupar papéis importantes em produtos e processos industriais, permitindo que fossem empregadas em larga escala (SAID e PIETRO, 2004).

A versatilidade das enzimas possibilita seu uso em diversas aplicações, incluindo processos de catálise de polímeros naturais, tais como amido, celulose e proteínas, bem como para síntese seletiva de produtos químicos assimétricos (LORENZ E ECK, 2005). No futuro, novas aplicações biotecnológicas devem impulsionar o mercado de enzimas industriais. A substituição de catalisadores químicos, em processos industriais, pelas enzimas possibilita redução de tempo e energia, de rejeitos industriais que podem comprometer o meio ambiente revertendo assim, em benefícios econômicos (SAID e PIETRO, 2004).

As enzimas evoluíram durante anos como catalisadores quirais em células vivas tornando-as aptas ao ambiente. Existem diversas reações orgânicas realizadas por enzimas e a correta identificação destas é de importância primordial. Encontrar um biocatalisador adequado em um tempo razoável depende tanto de estratégias de triagem sensíveis e eficientes como da busca pelo maior número possível de genes codificadores nos diferentes organismos (LORENZ et al., 2002).

O comércio global da produção de enzimas foi estimado em 2,3 bilhões de dólares em 2003, cujo principal montante foi divido em detergentes (US$ 789 milhões), aplicações alimentícias (US$ 634 milhões), agricultura (US$ 237 milhões) e outras, incluindo enzimas para produção de tecidos e produtos químicos (US$ 222 milhões) (LORENZ et al., 2002).

As enzimas são produzidas por todos os seres vivos, em diferentes concentrações, podendo ser de origem vegetal, animal ou microbiana. Diferentemente das enzimas vegetais e animais, a produção de enzimas microbianas não depende diretamente de fatores climáticos, que muitas vezes são incontroláveis. Além disso, soma-se a estes fatores a enorme biodiversidade dos micro-organismos em variados habitats, até mesmo aqueles que vivem em condições extremas (SAID e PIETRO, 2004).

2.2 Enzimas microbianas

O uso de micro-organismos e enzimas microbianas pelo homem no processamento de materiais naturais tem uma longa tradição. Esta capacidade de exploração de biossintéticos microbianos ocorreu naturalmente e foi facilitada pela ubiquidade dos micro-organismos. Desse modo, atualmente, as enzimas são usadas como chaves de ativação de componentes em detergentes, em vários alimentos industrializados, na manufatura de papel, entre outros (LORENZ et al., 2002).

De acordo com Lorenz e Eck (2005), as indústrias buscam genomas inteiros identificados de micro-organismos não cultivados, pois estes podem ser fonte de novos biocatalisadores, possuírem diversidade suficiente e acessível avançando na competição com a química sintética tradicional, além de ser fonte de metabólitos únicos.

A preferência pela química orgânica sintética baseada em enzimas de micro-organismos e não pela clássica catálise química é devida à especificidade (químio, régio e enantiosseletividade) que as enzimas possuem. Adicionalmente, os produtos do metabolismo secundário microbiano são compatíveis tanto em relação à eficiência quanto com a sua interferência ambiental (LORENZ et al., 2002).

Atualmente, as enzimas microbianas são as mais utilizadas industrialmente (UCHYIAMA e MIYAZAKI, 2009), pois, entre outros fatores, os micro-organismos que vivem em condições extremas, seja de pH ou temperatura, sintetizam enzimas que permitem sua sobrevivências nestes habitats. Existem também as técnicas de engenharia genética que simplificam o cultivo de micro-organismos e modificam as propriedades de enzimas já existentes para que estas sejam aprimoradas (SAID e PIETRO, 2004).

2.3 Diversidade microbiana do solo

O solo tem sido um dos ambientes mais estudados, devido à elevada biodiversidade que alguns tipos podem conter (HANDELSMAN et al., 1998; LORENZ et al., 2002). A mais complexa das comunidades reside no solo, que é composto por materiais orgânicos e minerais. Dentre os papéis dos micro-organismos, estão a fixação do nitrogênio atmosférico,

reciclagem de nutrientes provenientes da decomposição de plantas e animais, conversão de elementos, como ferro e manganês, em formas que possam ser utilizadas para a nutrição de plantas, além de interferirem na infecção das plantas por certos patógenos (WHITMAN et al., 1998).

De acordo com Torsvik e Ovreas (2002), 1 grama de solo pode conter até 4000 espécies diferentes, dentre as quais, a maior parte não é cultivável. O número de micro-organismos varia dentre os diferentes tipos e condições do solo, sendo que os mais numerosos são as bactérias (WHITMAN et al., 1988). Metodologias moleculares contribuem para o desenvolvimento do estudo da diversidade microbiana dos solos, evidenciando o cenário de distribuição dos micro-organismos em diferentes habitats (PEDRINHO et al., 2009). Ritz e Griffths (1994) demonstraram diferentes padrões de diversidade genética entre diferentes solos através da hibridização do DNA total extraído dos mesmos.

Por meio do isolamento, clonagem e análise do DNA microbiano do solo podem ser avaliadas mais detalhadamente a fisiologia e a função dos micro-organismos na natureza. Os genomas da microbiota total encontrada em uma comunidade são denominados de metagenoma. Estudos envolvendo sequências do gene *16S rRNA*, com abordagem metagenômica, se constituíram nos passos iniciais para a ligação entre a fisiologia e função da microbiota total (RONDON et al., 2000).

2.4 Biotecnologia e Metagenoma

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 e 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 (VOGET et al., 2003).

As técnicas tradicionais de cultivo selecionam os micro-organismos capazes de se desenvolver em meios de cultura pré-definidos. Estimativas feitas a partir de estudos em

ecologia por meio da biologia molecular apontam que a diversidade microbiana obtida através de técnicas tradicionais de cultivo abrange somente uma fração, geralmente menos de 1% da diversidade presente em amostras ambientais complexas, tais como o solo (AMANN et al, 1995; LORENZ et al., 2002). Apesar disso, por meio do desenvolvimento de culturas puras em meios com substratos específicos, muitos biocatalisadores foram obtidos e comercializados, como a nitrilase (ENGELS et al., 2000), que converte nitrilas em ácidos carboxilícos e aminas e é utilizada na degradação de herbicidas, e a lactamase (TAYLOR et al., 1999), responsável pela resistência de bactérias a antibióticos beta-lactâmicos.

O metagenoma, isolamento direto do DNA total provindo de uma amostra ambiental, foi proposto devido à discrepância existente ao comparar o número de micro-organismos encontrados *in situ*, através do isolamento de culturas puras e o número de colônias observadas *in vitro* (LORENZ et al., 2002). Como prova da existência de um número de micro-organismos ainda não estudados está a descoberta de sequências do gene *16S rRNA* obtidas de amostras ambientais não relatadas anteriormente (HANDELSMAN et al., 1998; RONDON et al., 2000). O pioneiro a utilizar a clonagem direta do genoma de todos os micro-organismos de um determinado habitat foi Schmidt em conjunto com colaboradores (1991), o que mais tarde viria a ser denominado metagenoma (LORENZ et al., 2002).

Esta potente tecnologia pode acelerar o processo de descoberta de genes que codificam novas enzimas e metabólitos secundários de comunidades microbianas sem cultivo prévio dos micro-organismos (VOGET et al., 2003). Desde então, numerosos estudos têm lidado com os métodos de extração de DNA metagenômico a partir de uma variedade de ambientes. De fato, várias enzimas novas foram identificadas que têm atividade e/ou sequências exclusivas dos mais diversos ambientes, como mar, solo, rios, entre outros. Voget et al. (2003) isolaram mais de 15 genes diferentes codificadores de enzimas como agarase, amilase, celulase e lipase. Adicionalmente, o metagenoma também tem por objetivo compreender melhor a ecologia microbiana global. As estapas para a exploração de DNAs metagenômicos são: isolamento do DNA total de determinado habitat, clonagem do DNA em micro-organismos cultiváveis, triagem de micro-organismos com atividade biológica (HANDELSMAN et al., 1998). A seleção destes micro-organismos pode se dar por identificação da atividade enzimática em substratos específicos ou por identificação de sequências, seja por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) ou hibridização por sondas (UCHYIAMA e MIYAZAKI., 2009).

É comum o estudo de ambientes contaminados devido à seletividade de micro-organismos de interesse nesses locais. Bibliotecas metagenômicas de ambientes que tenham

sido submetidos a condições extremas têm maior probabilidade de que as enzimas encontradas também sejam capazes de agir em tais condições (ELEND et al., 2006).

Silveira et al. (2006) estimaram e compararam a diversidade bacteriana de comunidades em solos de floresta nativa e outra adjacente com arboreto de eucalipto. Utilizando o DNA metagenômico correspondente ao gene *16SrRNA* determinaram a diversidade bacteriana em tais locais. Análises filogenéticas revelaram diferenças entre os tipos de solos e alta diversidade em ambas as comunidades. No solo de arboreto foi encontrada maior diversidade bacteriana em comparação com o solo da área de floresta nativa.

Segundo Paixão et al. (2010), atingir maior conhecimento e compreensão da diversidade de micro-organismos pertencentes à comunidades bacterianas em ambientes adversos é importante para alcançar benefícios econômicos estratégicos, como aqueles que podem ser obtidos com a descoberta de micro-organismos que apresentam potencial para serem utilizados em processos biotecnológicos para biorremediação de áreas contaminadas.

2.5 Enzimas lipolíticas

Enzimas lipolíticas como lipases (EC 3.1.1.3) e esterases (3.1.1.1) são hidrolases que catalisam tanto a hidrólise como a síntese de acilgliceróis e outros ácidos graxos (LEE et al., 2004), conforme demonstrado na figura 1.

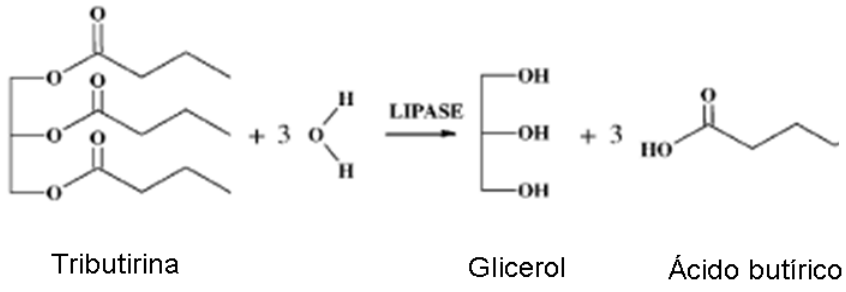

Figura 1- Hidrólise da tributirina pela lipase e formação dos produtos glicerol e ácido butírico. Fonte: Wu e Tsai (2004).

Esterases e lipases possuem determinadas características que as tornam o grupo de biocatalisadores com maior aplicação 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 e na indústria alimentícia (JAEGER e EGGERT, 2002). Destaca-se seu potencial na biorremediação de rejeitos industriais de origem lipídica e sua utilização em etapas de produção de biodiesel a partir de óleos vegetais (JEON et al., 2009).

As lipases já foram descritas em vegetais, animais e micro-organismos, sendo que as microbianas são as mais utilizadas industrialmente, devido às diferentes atividades que apresentam e suas propriedades cinéticas. Lee et al. (2004) construíram uma biblioteca metagenômica de micro-organismos de solo de floresta e encontraram oito clones ativos em tributirina como substrato, um triacilglicerol com três moléculas de ácido butírico esterificadas com o glicerol, de um total de 33.700 clones.

São representantes da família α/β hidrolases, assim como as proteases, desalogenases, peroxidases e epóxido hidrolases, o que faz desta família uma das mais versáteis e com dobramentos protéicos mais conhecidos (NARDINI e DIJKSTRA, 1999).

2.5.1 Dobramento das enzimas lipolíticas

As enzimas que constituem a família das α/β hidrolases não compartilham similaridade de sequências e substratos. No entanto, apresentam uma preservação na disposição dos sítios catalíticos, homologia estrutural, sugerindo um possível ancestral comum (OLLIS, et al., 1992). O dobramento das α/β hidrolase é caracterizado por um núcleo de oito folhas β conectadas por α-hélices, para dar a disposição α/β/α (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, grandes inserções foram toleradas, como alguns resíduos de aminoácidos ou até mesmo um domínio extra completo, dando aos membros desta família uma habilidade impressionante para adaptação e evolução (NARDINI e DIJKSTRA, 1999).

O dobramento das α/β hidrolases pode fornecer um arcabouço estável para os sítios ativos de uma grande variedade de enzimas. Os resíduos catalíticos são sempre constituídos de uma tríade altamente conservada: o membro nucleofílico (serina, cisteína ou ácido

aspártico) posicionado após a folha β5; um resíduo ácido, posicionado quase sempre após a folha β7; e uma histidina, que é um resíduo absolutamente conservado e está situado após a última folha β (NARDINI e DIJKSTRA, 1999). O membro nucleofílico está sempre localizado em uma curva acentuada, chamada "cotovelo nucleofílico", onde facilita 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). O membro ácido da tríade catalítica está localizado em uma curva reversa, na folha β7. Já a histidina é o único resíduo da tríade que é absolutamente conservado, entretanto, a forma e o comprimento do local que a contém pode diferir consideravelmente entre os vários membros da família.

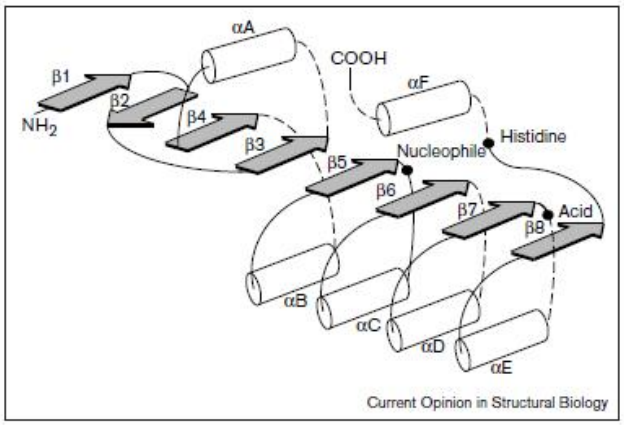

Figura 2- Estrutura secundária do dobramento das α/β hidrolases. α-hélices e folhas-β estão representadas por meio de cilindros brancos e setas cinzas, respectivamente. A localização da tríade catalítica está indicada pelos círculos pretos.
Fonte: Nardini e Dijkstra (1999).

2.5.2 Classificação das enzimas lipolíticas

As enzimas lipolíticas são classificadas em diferentes classes por Arpigny e Jaeger (1999). São 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 de triglicerídeos insolúveis. Considerando a dificuldade de classificação baseada no mecanismo de reação, estes mesmos autores as classificaram de acordo com suas sequências, seus motivos conservados, suas estruturas tridimensionais e 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.

A sub-família I.1 é representada por lipases que apresentam elevada similaridade de sequências com a lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, que inicialmente deu origem à classificação da família I. Esta sub-família inclui enzimas de *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *P. wisconsinensis* e *Proteus vulgaris* e possuem massa molecular em torno de 30 a 32 kDa.

A subfamília I.2 é representada por proteínas com massa molecular um pouco maior, de 33 kDa, e 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 nestas enzimas e localizados próximos à tríade catalítica. Outra característica comum é a presença, adjacentes ao sítio ativo, de dois resíduos de cisteína 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 massa 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 massa 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 massa 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*, com 50% de similaridade entre elas, 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., 2009).

A família III contém lipases extracelulares de *Streptomyces sp*. e *Moxarella sp*. e possuem o dobramento das α/β hidrolases com a tríade catalítica comum (Ser-Asp-His), enquanto a família IV engloba lipases que apresentam similaridade com lipases hormônio-sensíveis de mamíferos e são adaptadas a temperaturas extremas. Membros da família V mostram semelhanças com várias enzimas bacterianas não lipolíticas e, assim como membros da família IV, são adaptadas a temperaturas extremas, além de possuírem os comuns dobramento e tríade catalítica. A família VI reúne as menores lipases, pois possuem de 23 a 26 kDa. A forma ativa dessas enzimas é um dímero com a clássica tríade catalítica e o dobramento das α/β hidrolases. São representadas por carboxilesterases e não exibem atividade em longas cadeias de triglicerídeos.

Os representantes da família VII, de 55 kDa, incluem esterases e enzimas com atividade hidrolítica sobre herbicidas com carbamato e ésteres de p-nitrobenzyl. Já na família VIII, ao contrário das outras famílias de esterases microbianas, a ordem dos resíduos catalíticos da sequência Ser-Asp-His, que é conservada na superfamília das lipases e esterases, não é a mesma nesta subfamília.

Apesar deste sistema de classificação ser muito utilizado, novas enzimas lipolíticas têm sido isoladas e identificadas de diversos ambientes pela abordagem metagenômica e novas famílias têm sido propostas (HENNE et al., 2000; KIM et al., 2009; LEE et al., 2006). Couto et al. (2010) isolaram um gene codificador de lipase, com 283 aminoácidos e massa molecular de 283 kDa, de biblioteca metagenômica de manguezal da costa brasileira. Análises filogenéticas mostraram que este gene forma um ramo único, constituindo uma nova família de lipase.

Sendo assim, com novos genes codificadores de enzimas lipolíticas sendo descobertos, existe a necessidade de acessar o recurso genético das espécies microbianas, e a metagenômica tornou-se uma abordagem que oferece uma combinação quase ilimitada para encontrar novos genes codificadores de produtos relevantes como lipases e esterases.

6 CONCLUSÕES

- A análise da expressão funcional da atividade lipolítica, juntamente com as ferramentas de bioinformática, permitiram a caracterização de uma nova possível sequência gênica (ORF15) responsável pela expressão de enzimas lipolíticas da família IV das esterases/lipases;
- Embora com alguma modificações nos resíduos de aminoácidos, a tríade catalítica, essencial para a compreensão da atividade das lipases e esterases, esteve presente na caracterização da nova sequência gênica encontrada;;
- A técnica de sub-clonagem mostrou-se eficiente para obtenção do *contig* completo de clones produtores de enzimas lipolíticas;
- A biblioteca metagenômica do consórcio microbiano degradador de hidrocarbonetos de petróleo mostrou-se fonte de micro-organismos produtores de enzimas lipolíticas, bem como útil para expansão dos conhecimentos de tais enzimas, especialmente lipases e esterases;
- A caracterização da enzima lipolítica encontrada predizerão suas potenciais aplicações biotecnológicas futuras.

REFERÊNCIAS*

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, v. 59, p. 143–169, 1995.

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

ASTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.; Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BASF AG GERMAN PATENT. D. Engels, R. F. Mattes, B. Hauer, T. Friedrich, M. Ress-Loeschke. **New nucleic acid sequence encoding *Alcaligenes faecalis* nitrilase polypeptide useful for converting racemic nitriles to chiral carboxylic acids.** DE 19848129, 2000.

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

CAMBIA PATENT LENS. Gary Breton e David Bush. **Nucleic acid and amino acid sequences relating to Acinetobacter baumannii for diagnostics and therapeutics**. US 6562959, 17 de agosto de 2003.

CANTÃO, M. E.; FERREIRA, J. E.; LEMOS, E. G. M. Optimal clone identifier for genomic shotgun libraries: OC Identifier tool. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 743-755, 2007.

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

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

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

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T.; SCANNELL, J. W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 10494–10499, 2002.

ELEND, C.; SCHMISSER, C.; LEGGEWIE, C.; BABIAK, P.; CARBALLEIRA, J. D.; STEELE, H. L.; REYMOND, J. –L.; JAEGER, K. –E.; STREIT, W. R. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3637-3645, 2006.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, 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.

FURUMAI, R.; MATSUYAMA, A.; KOBASHI, N.; LEE, K.-H.; NISHIYAMA, M.; NAKAJIMA, H.; TANAKA, A.; KOMATSU, Y.; NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; HORINOUCHI, S. FK228 (Depsipeptide) as a Natural Prodrug That Inhibits Class I Histone Deacetylases. **Cancer Research**, v. 62, p. 4916–4921, 2002

GAO, B.; SU, E.; LIN, J.; JIANG, Z.; MA, Y.; WEI, D. Development of recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from *Proteus sp*. for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v. 139, p. 169-175, 2009.

GILLESPIE, D. E.; BRADY, S. F.; BETTERMANN, A. D.; CIANCIOTTO, N. P.; LILES, M. R.; RONDON, M. R.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Isolation of antibiotics Turbomycin A and B from a Metagenomic Library of Soil Microbial DNA. **Applied and Environmental Microbiology** v. 68, n. 9, p. 4301–4306, 2002.

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

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

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

HENNE, A.; SCHMITZ, R. A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli.* **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3113-3116, 2000.

HIGASHIOKA, Y.; KOJIMA, H.; SATO, S.; FUKUI, M. Microbial community analysis at crude oil-contaminated soils targeting the 16S ribosomal RNA, xylM, C23O, and bcr genes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1364-5072, 2009.

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

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

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipase. **Annual Review Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for Botechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390–397, 2002;

JEON, J. H.; KIM, J. T.; KANG, S. G.; LEE, J. H.; KIM, S. J. Characterization and its potential application of two esterases derived from the arctic sediment metagenome. **Journal of Biotechnology,** v. 11, p. 307–316, 2009.

JONES, B. V.; SUN, F.; MARCHESI, J. R. Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 418-420, 2007.

KIM, S.-J.; LEE, C.-M.; HAN, B.-R., KIM, M.-Y.; YEO, Y.-S.; YOON, S.-H.; KOO, B.-S.; JUN, H.-K. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. **FEMS Microbiology Letters.** v. 282, n. 1, p. 44-51, 2008.

KIM, E. Y.; OH, K. H.; LEE, M. H.; KANG, C. H.; OH, T. K.; YOON, J. H. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 257-260, 2009.

LEE, S. W.; WON, K.; LIM, H. K.; KIM, J. C.; CHOI, G. J.; CHO, K. Y. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms**. Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 720-726, 2004.

LEE, M. H.; LEE, C. H.; OH, T. K.; SONG, J. K.; YOON, J. H. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: Evidence for a new family of bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7406-7409, 2006.

LIAW, R. B.; CHENG, M. P.; WU, M. C. LEE, C. Y. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8323-8329, 2010.

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

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

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

OBUEKWE, C. O.; AL-JADI, Z. K.; AL-SALEH, E. S. Comparative hydrocarbon utilization by hydrophobic and hydrophilic variants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 1876–1887, 2008.

OKAMURA, Y.; KIMURA, T.; YOKOUCHI, H.; MENESES-OSORIO, M.; KATOH, M.; MATSUNAGA, T.; TAKEYAMA, H. Isolation and Characterization of a GDSL Esterase from the Metagenome of a Marine Sponge-associated Bacteria. **Marine Biotechnology**, v. 12, p. 395-402, 2010.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

PAIXÃO, D. A.; DIMITROV, M. R.; PEREIRA, R. M.; ACCORSINI, F. R.; VIDOTTI, M. B.; LEMOS, E. G. M. Análise molecular da diversidade bacteriana de um consórcio degradador de óleo diesel. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 773-781, 2009.

PARALES, R. E.; DITTY, J. L.; HARWOOD, C. S. Toluene-Degrading Bacteria Are Chemotactic towards the Environmental Pollutants Benzene, Toluene, and Trichloroethylene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4098-4104, 2000.

PEDRINHO, E. A. N.; LEMOS, E. G. M.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; SILVEIRA, É. L.; VAL-MORAES, S. P.; CARARETO-ALVES, L. M.; WICKERT, E.; VALARINI, M. J. Avaliação do impacto do lodo de esgoto na microbiota do solo utilizando o gene 16S rRNA. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 443-448, 2009.

RANJAN R.; GROVER, A.; KAPARDAR, R. K.; SHARMA, R. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bactéria of pond water. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 335, p. 57-65, 2005.

RITZ, K.; GRIFFTHS, B. S. Potential application of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 963-971, 1994.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied Environmental Microbiology,** v. 66, n. 6, p. 2541–2547, 2000.

SAID, S.; PIETRO, C. L. R. Generalidades sobre aplicação industrial de enzimas. In:_____. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 1-7.

SAITO, N.; NEI, M. The neighbor-joining metod: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

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

SCHMIDT, T.; DELONG, E.; PACE, N. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing**. Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 4371-4378, 1991.

SILVEIRA, E. L.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAYLOR, S.J.; BROWN, R. C.; KEENE, P. A.; TAYLOR, I. N. Novel screening methods – the key to cloning commercially successful biocatalysts**. Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 2163-2168, 1999.

TISS, A.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R. Effects of Gum Arabic on Lipase Interfacial Binding and Activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, p**.** 36–43, 2001.

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

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

UWM RESEARCH FOUNDATION, INC. Yi-Giang Cheng. **Sequences for fk228 biosynthesis and methods of synthesizing fk228 and fk228 analogs**. WO 2008098199-A2, 14 de Agosto 2008.

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

WEI, Y.; CONTRERAS, J. A.; OSTERLUND, T.; DEREWENDA, U.; KNEUSEL, R. E.; MATERN, U.; DEREWENDA, Z. S. 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.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majoritary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WHYTE, L. G.; SMITS, T. H. M.; LABBE, D.; WITHOLT, B.; GREER, C. W.; VAN BEILEN, J. B. Gene Cloning and Characterization of Multiple Alkane Hydroxylase Systems in *Rhodococcus* Strains Q15 and NRRL B-16531. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5933-5942, 2002.

WHYTE, L. G.; BOURBONNIERE, L.; GREER, C. W. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Both Alkane (*alk*) and Naphthalene (*nah*) Catabolic Pathways. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3719-3723, 1997.

WILD, J.; HRADECNA, Z.; SZYBALSKI, W. Conditionally amplifiable BACs: Switching from single-copy to high-copy vectors and genomic clones. **Genome Research**, v. 12, p. 1434-1444, 2002.

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.

WU, H. S.; TSAI, M. J. Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 488-493, 2004.

WUNSCHE, L.; BRÜGGEMANN, L.; BABEL, W. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. **FEMS Microbiolgy Ecoloy**, v. 17, p. 295-305, 1995.