MARIANA RANGEL PEREIRA

PROSPECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS EM BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE CONSÓRCIO MICROBIANO DEGRADADOR DE ÓLEO DIESEL

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:
Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

São Paulo
2011

RESUMO

PEREIRA, M. R. **Prospecção de genes codificadores de enzimas lipolíticas em biblioteca metagenômica de consórcio microbiano degradador de óleo diesel**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Há uma longa tradição no uso de micro-organismos e enzimas microbianas para o processamento de materiais naturais. Atualmente na manufatura, industrialização alimentícia e produção de detergentes, as enzimas servem como "chaves" de ativação de componentes presentes nos mesmos. Dentro deste contexto, as enzimas lipolíticas vêm atraindo atenção no mercado global devido ao enorme potencial biotecnológico, como por exemplo: nas misturas enzimáticas para formulação de detergentes; na indústria de couro, podendo ser aplicada juntamente com outras hidrolases na remoção de pêlos e gorduras subcutâneas; na produção de cosméticos, fármacos, aromas, biodiesel, dentre outros. A maior parte das lipases é de origem microbiana, elas apresentam baixa toxidade, são facilmente biodegradáveis e destacam-se pela quimioseletividade, o que reduz os efeitos colaterais dos fármacos. Tendo em vista os estudos em diversidade microbiana, pode-se afirmar que a maioria dos micro-organismos que compõe a biosfera ainda não foi estudada, fato confirmado pelas estimativas da complexidade do DNA e descoberta de várias sequências únicas dos genes *16S rRNA* e *18S rRNA* de origem ambiental. A fim de acessar o recurso genético das espécies microbianas, a metagenômica tornou-se uma abordagem que oferece uma combinação quase ilimitada para encontrar novos genes codificadores de produtos relevantes como lipases e esterases. 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 óleo diesel, de aproximadamente 4500 clones. A seleção foi feita pela atividade lipolítica através do cultivo dos clones em placa de petri contendo o meio Luria-Bertani (LB) suplementado de 1% de tributirina (v/v), 1% de goma arábica (p/v), 0,00125% de cloranfenicol (v/v) e 0,001% arabinose (v/v). As células ficaram em cultivo a 37 ºC por 48 horas e depois foram transferidas a 4 ºC. A avaliação foi realizada pela observação de um de halo ao redor da colônia, sendo positiva para 30 clones dentre os quais dois se destacaram. Estes dois clones que apresentaram halos maiores foram selecionados, e tiveram o seu DNA subclonado em vetor puC19. Os DNAs das sub-bibliotecas foram sequenciados no ABI 3100 (Applied Biosystems), gerando um *contig* completo para cada clone, que foram comparados com as sequências do banco Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), através do ORF Finder. Uma ORF de 322 aminoácidos com 76% identidade para uma possível esterase/lipase foi identificada em um dos *contigs* analisados. Por outro lado, quatro ORFs relacionadas a esterase/lipase puderam ser identificadas no segundo clone analisado, dentre as quais uma alcançou 58% de identidade com uma possível esterase/lipase de bactéria não cultivável. Foram feitos alinhamentos com o programa Clustal W e construção de árvores filogenéticas pelo MEGA, para comparação entre as ORFs encontradas e sequências depositadas. As árvores indicam que o primeiro clone apresenta a ORF similar à família IV das enzimas lipolíticas, enquanto o segundo possui três ORFs pertencentes à família V e uma à família IV. Através dos alinhamentos foi possível identificar os sítios ativos representativos de cada família, confirmando o resultado das árvores filogenéticas. Quando a mesma análise foi realizada com sequências já patenteadas, algumas ORFs mostraram similaridade com sequências pertencentes à Bayer Chemicals e Monsanto. Duas ORFs foram selecionadas para clonagem em *Escherichia coli*

BL21, usando-se o vetor de expressão pET28a, e em ambos casos os clones obtidos apresentaram atividade lipolítica em placa de petri contendo tributirina.

Palavras-chave: Biblioteca metagenômica. Consórcio Microbiano. Lipase. Esterase. Biotecnologia.

ABSTRACT

PEREIRA, M. R. **Screening for lipolytic enzyme codification genes in a metagenomic library of consortia specialized in diesel oil degradation**. 2011. 102 f. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Microorganisms and microbial enzymes have long been used for processing natural materials. Currently, these enzymes are used as "keys" for activating components in the process of food manufacturing and industrialization and the production of detergents. In this context, lipolytic enzymes have been attracting global market attention because they show enormous biotechnological potential. This includes uses such as in enzyme mixtures for the production of detergents, the processing of leather where the enzymes are applied with other hydrolytic enzymes for the removal of hair and subcutaneous fat, 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, a very positive trait which permits pharmaceutical products made with these enzymes to have few collateral effects. Research done on microbe diversity shows that most of the microorganisms which compose our biosphere have not yet been studied, a fact confirmed by DNA complexity estimates and the discovery of many unique environmental *16S rRNA* and *18S rRNA* gene sequences. When accessing the genetic resources of microbe species, metagenomic science was found to be an approach which offers an almost unlimited combination for the discovery of new genes that codify relevant products such as lipases and esterases. The present work was done as an attempt to find genes which codify lipolytic enzymes in a fosmid metagenomic library composed of diesel oil degradation microbe consortia, with approximately 4500 clones. Clones were selected according to lipolytic activity and were assessed by cultivation in Petri dishes containing Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 1% tributyrin (v/v), 1% gum arabic (w/v), 0.00125% chloramphenicol (v/v) and 0.001% arabinose (v/v). All cultures were maintained at 37ºC for 48 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 showed prominent positive results, producing larger halos compared to the others. These were selected and had their DNA sub cloned in pUC19 vectors. DNA from the sub libraries was sequenced by ABI 3100 (Applied Biosystems), generating a complete *contig* for each clone. These were compared to sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) bank by the ORF Finder. An ORF of 322 amino acids with 76% of identity for a possible esterase/lipase was identified in one of the assessed *contigs*. Notwithstanding, four ORFs related to esterase/lipase could be identified in the second assessed clone, with one of these attaining 58% of identity to a possible esterase/lipase of non cultivatable bacteria. For comparison of the found ORFs and the deposited sequences, alignments were done using the Clustal W program and cladograms were constructed using MEGA. Assessment of the cladograms showed that the first clone presented an ORF similar to that of lipolytic enzyme family IV, while the second had three ORFs pertaining to family V and one to family IV. The alignments made possible the identification of active sites which represent each family, confirming the results obtained with the construction of the cladograms. When the same evaluation was done using patented sequences, some ORFs showed similarities to sequences owned by Bayer Chemicals and Monsanto. Two ORFs were selected for cloning in *Escherichia*

coli BL21, using the pET28a expression vector. In both cases the obtained clones presented lipolytic activity when cultivated in Petri dishes containing tributyrin.

Key words: Metagenomic library. Microbe consortium. Lipase. Esterase. Biotechnology.

1 INTRODUÇÃO

O uso de micro-organismos e enzimas microbianas no processamento de materiais naturais tem uma longa tradição. Esta capacidade de exploração de biossintéticos microbianos, de qualquer modo, foi inconsciente e facilitada pela ubiquidade dos micro-organismos. Consequentemente, hoje em dia, as enzimas são usadas como “chaves” de ativação de componentes em detergentes, em vários alimentos industrializados e na manufatura de papel. A preferência pela química orgânica sintética para catálise enzimática e não pela clássica catálise química está baseada em enzimas de L-aminoácido, que apresentam características de quimio, régio e enantioseletividade. Adicionalmente, os produtos do metabolismo secundário microbiano são compatíveis tanto em relação à eficiência quanto com a sua interferência ambiental (LORENZ et al., 2002).

A biosfera é dominada por micro-organismos, mas a maioria ainda não foi estudada. Estima-se que 99% dos organismos procariontes não foram estudados em função dos métodos tradicionais de cultivo, que limitam o desenvolvimento em condições de laboratório (HENNE et al., 2000; HARDEMAN e SJOLING, 2007; ROH e VILLATTE, 2008). Os recentes avanços de pesquisas em ecologia molecular microbiana fornecem fortes evidências da existência de novas espécies de micro-organismos no meio ambiente, tanto em número quanto em diversidade (STEELE e STREIT, 2005), principalmente quando comparado com aqueles que são pouco cultiváveis em laboratório. A confirmação vem de estimativas da complexidade do DNA e da descoberta de várias sequências únicas dos genes *16S rRNA* e *18S rRNA* de várias fontes do ambiente (RONDON et al., 2000; SILVEIRA et al., 2006).

Para acessar o recurso genético da vasta maioria das espécies microbianas que há muito tempo têm escapado dos exames minuciosos científicos, uma nova abordagem denominada metagenoma começou a ser usada (HANDELSMAN et al., 1998). Esta estratégia abrange a extração direta do DNA genômico de amostras do ambiente e clonagem do material obtido (RONDON et al., 2000). Os resultados são bibliotecas metagenômicas, que servem como uma base para examinar vias metabólicas; analisar a diversidade microbiana; e identificar genes codificadores de proteínas de interesse biotecnológico. Estes genes podem ser prospectados através de sondas específicas, (hibridização de DNA-DNA); testes *in vitro* utilizando substratos

específicos; e protocolos de PCR, tendo como parâmetro sequências similares ou regiões conservadas.

Prévios estudos têm demonstrado que a análise metagenômica oferece uma combinação quase ilimitada para encontrar novos genes codificadores de produtos gênicos relevantes como lipases e esterases (HENNE et al., 2000; CIESLINSKI et al., 2009; WU e SUN, 2009; COUTO et al., 2010; HU et al., 2010). Por exemplo, nos últimos dez anos vários genes codificadores de enzimas lipolíticas puderam ser identificados em bibliotecas metagenômicas advindas de várias amostras ambientais como solo (HENNE et al., 2000; RONDON et al., 2000; LEE et al., 2004), água de lagoa e lago (REES et al., 2003; RANJAN et al., 2005), de mar (CHU et al., 2008), de rio (WU e SUN, 2009), sedimento de manguezais (COUTO et al, 2010) e campos termais (RHEE et al., 2005). Entre as descobertas, Hu et al. (2010) encontraram no sedimento marinho do mar do sul da China um gene codificador de esterase, o qual é importante candidato à aplicações industriais.

Já há seis anos, o comércio global das indústrias de enzimas está estimado em 2,3 bilhões de dólares, cujo principal lucro está divido em detergentes (US$ 789 milhões), aplicações alimentícias (US$ 634 milhões), agricultura (US$ 237 milhões), e outras aplicações incluindo enzimas para produção de tecidos e produtos químicos (LORENZ e ECK, 2005).

Dentro deste comércio, as enzimas lipolíticas estão atraindo enorme atenção por causa dos seus potenciais biotecnológicos (VAKHLU e KOUR, 2006). A maioria das lipases usadas nas indústrias são enzimas microbianas, de origem fúngica (*Candida* sp., *Geotrichium* sp., *Rhizopus* sp., etc) ou bacteriana (*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Staphyloccoccus* sp., etc) (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Por serem enzimas versáteis e amplamente utilizadas a expectativa é que as lipases futuramente sejam tão importantes como catalisadores industriais, o quanto são atualmente as proteases e carboidrases (TREVISAN, 2004). Um exemplo disto é a grande atenção destinada a esta enzima para a produção de biodiesel, através da transesterificação de gorduras, uma alternativa do combustível petróleo para os problemas ambientais (GAO et al., 2009).

As lipases de origem microbiana são economicamente atrativas por serem: facilmente biodegradáveis, causando menor impacto ambiental; atuarem geralmente em condições amenas (pH próximo à neutralidade e temperaturas de 20 a 40 ºC); e serem quimio-seletivas, ou seja, atuam em um único tipo de grupo funcional, proporcionando para a indústria farmacêutica, por

exemplo, a obtenção de fármacos com efeitos colaterais reduzidos (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; VAKHLU e KOUR, 2006).

As enzimas derivadas de micro-organismos disponíveis para uso industrial são fontes de síntese de novos e interessantes produtos, permitindo assim, diversas aplicações com alto ganho nos processos biotecnológicos; maior eficiência, com consequentemente redução de gastos; menor necessidade de utilização de produtos químicos cáusticos e perigosos, o que gera vantagem ao meio ambiente (LORENZ e ECK, 2005). No entanto, quanto aos processos industriais de lipases, o maior problema está relacionado ao custo das etapas necessárias para a purificação que, em geral, provocam perdas na atividade das enzimas e aumentam o custo final, entretanto, devido aos recentes avanços na tecnologia de engenharia genética e de modificação e imobilização de lipases há perspectivas na mudança deste quadro (SAXENA et al., 2003; KOBLITZ e PASTORE, 2004).

A fim de bioprospectar genes de interesse biotecnológico, dentre outras aplicações, foi construída no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas (LBMP), na UNESP – Campus de Jaboticabal, uma biblioteca fosmidial de DNA metagenômico a partir de um consórcio microbiano degradador de óleo diesel. Esta biblioteca foi confeccionada por Paixão et al. (2010) a partir de um consórcio microbiano extraído do solo com contaminação permanente, por um período de 15 anos, de uma antiga fábrica de lubrificantes localizada na cidade de Ribeirão Preto - SP. A biblioteca possui aproximadamente 4500 clones e vários genes de importância biotecnológica estão sendo prospectados, entre eles, genes codificadores de enzimas lipolíticas. O consórcio microbiano, do qual foi construída a biblioteca, apresenta uma gama de micro-organismos degradadores de óleo diesel (PAIXÃO et al., 2010), e nela almeja-se obter enzimas lipolíticas com características distintas das já descritas e disponíveis na literatura.

6 CONCLUSÕES

- A seleção dos clones da biblioteca metagenômica de consórcio degradador de óleo diesel foi feito através da expressão funcional da atividade lipolítica e este método, juntamente com as análises de bioinformática, permitiu a descoberta de novos genes;
- Foram selecionados dois clones que apresentam formação de halo nítido e o DNA fosmidial fragmentado dos mesmos foi subclonado em plasmídeo. A técnica mostrou-se eficiente para obter o *contig* completo de ambos;
- O clone Pl17.E10 apresenta 25 ORFs, sendo que, quatro foram confirmadas como novas representantes das enzimas lipolíticas. Uma ORF pertence à família IV e as outras três à família V;
- O clone Pl32.D09 possui 32 ORFs, no qual uma é representante da família IV das enzimas lipolíticas;
- A caracterização dos genes encontrados no clone Pl17.E10 e Pl32.D09 possibilitou verificar a presença da tríade catalítica na sequência de aminoácidos, que é essencial para lipases e esterases. Esta análise foi de encontro com o resultado obtido nas construções das árvores filogenéticas;
- Este estudo demonstrou que a abordagem metagenômica pode ser muito utilizada para expandir o conhecimento de enzimas, especialmente de lipases bacterianas.
- Futuros estudos de caracterização enzimática destas novas enzimas lipolíticas serão interessantes a fim de predizer as possíveis aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS*

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.

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.

CHU, X.; HE, H.; GUO, C.; SUN, B. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from south China sea. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 615-625, 2008.

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.

D'AMICO, S.; COLLINS, T.; MARX, J. C.; FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. **EMBO Reports**, v. 7, p. 385–389, 2006.

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.

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

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186- 194, 1998.

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.

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.

HAMME, J.; SINGH, A.; WARD, O. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

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.

HONG, K. S.; LIM, H. K.; CHUNG, E. J.; PARK, E. J.; KIM, J. C.; CHOI, G. J.; CHO, K. Y.; LEE, S. W. Selection and caracterization of forest soil metagenome genes enconding lipolytic enzymes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 1655-1660, 2007.

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.

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.

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, 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.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 287-292, 2004.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **American Society for Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

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.** Elsevier v. 13, p. 572-577, 2002.

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

MARTÍNEZ, A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Characterization of the *lipA* gene enconding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strainB83. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 731-735, 2001.

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.

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.

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.

REES, H. C.; GRANT, S.; JONES, E. B.; GRANT, W. D.; HEAPHY, E. S. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles**, v. 7, p. 415-421, 2003.

RHEE, J. K.; AHN, D. G.; KIM, Y. G.; OH, J. W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 817-825, 2005.

ROBLES, J.; DOERS, M. PGEM^{R}-T Vector Systems troubleshooting guide. **Promega Notes**, Madison, v. 45, p. 19, 1994.

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

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of

uncultured microorganisms. **Applied Environmental Microbiology,** v. 66, n. 6, p.2541–2547, 2000.

RUIZ, C.; BLANCO, A.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P. Analysis of *Bacillus megaterium* system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. **FEMS Microbiology Letters,** v. 217, p. 263-267, 2002.

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.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2003.

SCHLEHECK, D.; DONG, W.; DENGER, K.; HEINZLE, E.; COOK, A. M. An α-Proteobacterium Converts Linear Alkybenzenesulfonate Surfactants into Sulfophenylcarboxylates ane Linear Alkyldiphenyletherdisulfonate Surfactants into Sulfodiphenylethercarboxylates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1911-1916, 2000.

SIDDIQUI, K. S.; CAVICCHIOLI, R. Cold-adapted enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, p. 403-433, 2006.

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.

STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics: Advances in ecology and biotchenology. **FEMS Microbiology Letters,** v. 247, p. 105-111, 2005.

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.

TIRAWONGSAROJ, P.; SRIPRANG, R.; HARNPICHARNCHAI, P.; THONGARAM, T.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. **Journal of Biotechnology**, v. 133, p. 42-49, 2008.

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

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

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.

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.

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.

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.