



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

FRANCISCO JONATHAN DOS SANTOS ARAÚJO

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA ESTERASE (LIPG7) ISOLADA A PARTIR
DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAL**

FORTALEZA

2017

FRANCISCO JONATHAN SANTOS ARAÚJO

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA ESTERASE (LIPG7) ISOLADA A PARTIR DE
UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAL

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Maria Maciel Melo.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Denise Cavalcante Hissa.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A689e Araújo, Francisco Jonathan dos Santos.

Expressão e purificação de uma esterase (LIPG7) isolada a partir de uma biblioteca metagenômica de sedimentos de manguezal / Francisco Jonathan dos Santos Araújo. – 2017.

45 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Coorientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

1. Manguezal. 2. Esterase. 3. Superexpressão. 4. Metagenômica. I. Título.

CDD 661

FRANCISCO JONATHAN DOS SANTOS ARAÚJO

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA ESTERASE (LIPG7) ISOLADA A PARTIR DE
UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAL

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Aprovado em 28/11/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Universidade Federal do Ceará

Dra. Mirella Leite Pereira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus
A minha Família e Amigos

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo, por toda a inspiração, amor, fé e esperança que me ajudaram a construir a pessoa que sou hoje.

Aos meus pais, Francisca Sandra e Antônio Carlos por sempre me apoiarem nas minhas decisões, por terem me proporcionado uma educação de excelência e por estarem sempre do meu lado ao longo desses quatro anos. Ao meu irmão Carlos Henrique por toda sua cumplicidade, amor e apoio.

Às minhas avós Maria de Fátima e Maria Cosma por cuidarem tão bem de mim ao longo da minha vida, me dando a educação que necessitava e por sempre estarem comigo com seus abraços calorosos e cheios de amor.

À minha tia Fabiana de Oliveira por todo o incentivo à minha educação, por ser minha inspiração e por toda a ajuda dado a mim ao longo da minha vida.

A toda a minha família por todo o suporte, alegria e amor.

À minha orientadora Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, minha mãe científica, por ser meu exemplo de pesquisadora e professora, que me acolheu desde o ensino médio com seus ensinamentos científicos, profissionais e sobre a vida.

À minha co-orientadora Denise Cavalcante Hissa por todos os ensinamentos passados, pela sua grande cumplicidade, determinação e carinho dado a mim ao longo desses anos de iniciação científica.

Ao Professor Dr. Francisco Erivan Melo pela sua disponibilidade e pelo seu apoio na concessão de bolsas de iniciação científica ao longo da minha trajetória na graduação.

À minha grande amiga eterna faixa preta Walderly Melgaço, por todo o seu apoio, pelos momentos de descontração e os conselhos que me instigavam a querer sempre expandir os meus conhecimentos e o amor pela ciência.

À minha amada e grande amiga Gabrielly Oliveira da Silva, que me deu a graça de sua amizade desde o ensino médio e junto comigo sonhou em entrar em uma universidade pública, e agora juntos realizamos esse sonho apoiando um ao outro.

À minha amiga recém Potirensse Claudiane Carvalho pelas mais divertidas caronas até a universidade e pelas loucuras de cada dia.

A toda equipe do laboratório de ecologia microbiana e biotecnologia: Mirella Leite; Bárbara Cibelle; Bella Giselle; Samuel Araújo; Saulo Gonçalves; Natália Cavalcante; Brenda Suellen; João Alberto; Lara Andrade; Maria Luíza; Pedro Amaral; “Seu Valdenor” pelos momentos de descontração e por tornar o ambiente de trabalho um lugar divertido e cheio de aprendizado.

Aos meus amigos “Fofineos”: Alex dos Santos; Mário Lima; Matheus Augusto; Karina Rodrigues; Malu Cavalcante e Ana Barroso pelos momentos de muita diversão, risadas, por me apoiarem em todos os segmentos da minha vida, por torcerem por mim e sonhar junto comigo ao longo desse tempo de irmandade.

À minha turma cinco do bacharelado em biotecnologia e a turma seis pelas divertidas aulas, pelos momentos de aflição e desespero, pela alegria e cumplicidade ao longo desses anos de graduação.

Ao grupinho da faculdade “Uz Mopaduz”: Cristiano Nascimento; Melissa Ribeiro; Ruthyelle Oliveira; Pâmella Luiza; Mathias Coelho e Jéssica Loren pela amizade, pelos momentos de desespero dos primeiros semestres e pelo nosso mútuo apoio e irmandade.

Ao meu amado amigo Éwerton Lima pela sua amizade, apoio, pelos seus conselhos, por estar comigo em todas as horas e pelas nossas famigeradas “noites no dragão” de muita diversão e alegria.

A todo o corpo administrativo do Bacharelado em Biotecnologia, em especial a coordenadora Profa Dra. Cristina Paiva, a vice-coordenadora Profa. Dra. Májory Holanda e ao nosso querido assistente administrativo Gilmar Ferreira.

Ao CNPq e a Universidade Federal do Ceará por contribuir e possibilitar a realização deste sonho através do apoio financeiro e técnico.

RESUMO

Os microrganismos detêm o mais rico repertório de processos químicos e diversidade genética encontrados na natureza. Na indústria, os microrganismos ou suas biomoléculas podem ser empregados na produção de vários compostos comerciais. Enzimas lipolíticas, como as esterases, são utilizadas em vários setores da indústria como a farmacêutica, de cosméticos e de alimentos. Novas ferramentas, incluindo a metagenômica, vêm auxiliando os pesquisadores a prospectarem novas enzimas com características melhoradas de amostras ambientais diversas. Os manguezais são ecossistemas potenciais para a busca de novas enzimas devido suas condições ambientais extremas, alta atividade biológica e baixo número de estudos sobre o microbioma associado a esses ambientes. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a triagem de clones metagenômicos de amostras de sedimentos de manguezal para a prospecção de enzimas lipolíticas bem como a expressão e purificação de uma esterase (LipG7) pertencente à família VIII das carboxilesterases. Para isso, clones de uma biblioteca metagenômica construída a partir de amostras de sedimentos do manguezal do Rio Jaguaribe, Fortim - Ce, foram testados para prospecção de enzimas lipolíticas em Ágar Luria Bertani (LB), contendo 1% de tributirina. A detecção da atividade enzimática foi confirmada pela formação de halos em volta das colônias após 72 h de incubação a 37 °C. Foram analisados 1152 clones carregando insertos de DNA de 3 kb em média, tendo sido encontrados 3 clones positivos para esterases. A análise do inserto presente no clone LipG7, mostrou se tratar de uma esterase pertencente à família VIII das esterases verdadeiras. Esse gene foi expresso em três linhagens comerciais de *E. coli*, Rosetta-gami, ArcticExpress e BL21, sob a forma de agregados insolúveis. Após o tratamento com cloridrato de guanidina e posterior purificação em cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de níquel, LipG7 foi obtida na forma solúvel com atividade de $216,3 \pm 16,4$ U/mg contra o substrato sintético 4-nitrofenil butirato a 30 °C e teve sua atividade aumentada pela adição do íon bivalente Mg²⁺.

Palavras-chave: Manguezal, Esterase, Superexpressão, Metagenômica.

ABSTRACT

The microorganisms hold the richest repertoire of chemical processes and genetic diversity found in nature. Their biomolecules can be employed in many sectors of modern industry for the production of various commercial compounds. Lipolytic enzymes such as esterases are used in pharmaceuticals, cosmetics and food industries. New tools, including metagenomics, have been helping researchers to prospect novel enzymes from diverse environmental samples with improved features. Mangroves are considered as potential ecosystems for the prospection of new enzymes due to their extreme environmental conditions, high biological activity and the low number of studies on the microbiome associated to these environments. In this context, the present work aimed the screening of metagenomic clones constructed from mangrove sediments for production of lipolytic enzymes as well as expression and purification of the esterase LipG7, which belongs to the VIII family of carboxylesterases. For that, clones were tested for lipolytic activity in Luria Bertani Agar (LB) containing 1% tributyrin. Positive activities were confirmed by the formation of halos around the colonies after 72 h of incubation at 37 °C. From a screening of 1152 plasmidial clones (3 kb DNA), 3 positives clones for esterases were detected. The analysis of insert in clone LipG7 showed to be an esterase belonging to the VIII family of true esterases. This gene was expressed in three commercial *E. coli* strains, Rosetta-gami, ArcticExpress and BL21, but as insoluble aggregates. After treatment with guanidine hydrochloride and subsequent purification on affinity chromatography using nickel column, LipG7 was obtained in soluble form and showed an activity of 216.3 ± 16.4 U/mg against the synthetic substrate 4-nitrophenyl butyrate at 30 °C that was increased by addition of the bivalent Mg²⁺ ion.

Keywords: Mangrove, Esterase, Overexpression, Metagenomics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema básico da técnica de metagenômica baseada na função utilizando a clonagem.....	5
FIGURA 2 - Métodos e procedimentos de engenharia molecular para melhorar o desempenho das enzimas industriais.....	10
FIGURA 3 - A ação catalítica das lipases, um triglicerol hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos.	11
FIGURA 4 - Clones metagenômicos que apresentaram halos positivos para atividade lipolítica: (A) LipG7 ; (B) LipG6; (C) LipH7	18
FIGURA 5 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento de 17 sequências de aminoácidos de representantes da enzima 1,4-butanodiol diacrilato esterase.....	21
FIGURA 6 - Resultado do BLASTx mostrou que LipG7 apresenta domínios conservados de Beta-lactamases e de proteínas de ligação AmpC	22
FIGURA 7 - Resultado da PCR de colônia utilizando iniciadores específicos para o inserto G7.	23
FIGURA 8 - Verificação da presença da LipG7 na fração solúvel e insolúvel após a lise celular, indução em Rosetta-gami a 30 °C.....	23
FIGURA 9 – Resultado SDS PAGE Laemmli mostrando a eluição da proteína sob um gradiente de concentração de imidazol.....	26
FIGURA 10 - Atividade relativa enzimática sob influência de íons bivalentes, detergentes e EDTA.	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Produtos naturais de microrganismos de mangue e suas aplicações biotecnológicas	7
TABELA 2 – Enzimas utilizadas em diversos setores industriais.....	9
TABELA 3 - Iniciadores utilizados para sequenciamento dos insertos metagenômicos.	14
TABELA 4 - Principais hits obtidos após a execução do BLASTx contra o banco de dados de proteínas não-redundantes do NCBI.	20
TABELA 5 - Parâmetros gerais da esterase LipG7 obtidas pela ferramenta ProtParam do ExPASy.	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Bioprospecção de produtos naturais.....	2
2.2. Prospecção metagenômica	3
2.3. Enzimas Industriais	8
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo Geral	12
3.2. Objetivos Específicos	12
4. METODOLOGIA.....	13
4.1. Triagem de clones com atividade lipolítica.....	13
4.2. Sequenciamento e análise filogenética dos insertos com atividade lipolítica	13
4.3. Subclonagem e transformação da esterase LipG7 em <i>E. coli</i>	14
4.4. Avaliação da expressão da LipG7 nas 3 linhagens de <i>E. coli</i>	15
4.5. Ressolubilização de corpos de inclusão	16
4.6. Purificação da LipG7	16
4.7. Efeito da adição de íons bivalentes e detergentes na atividade da LipG7	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1. Triagem de clones com atividade lipolítica.....	18
5.2. Sequenciamento e análise filogenética dos insertos com atividade lipolítica	19
5.3. Subclonagem e transformação da esterase LipG7 em <i>E. coli</i>	22
5.4. Avaliação da expressão da LipG7 nas 3 linhagens de <i>E. coli</i>	23
5.5. Ressolubilização de corpos de inclusão	24
5.6. Purificação da LipG7	25
5.7. Efeitos da adição de íons bivalentes e detergentes na atividade da LipG7.	27
6. CONCLUSÃO.....	29
7. BIBLIOGRAFIA	30

1. INTRODUÇÃO

A bioprospecção tem por definição a exploração da biodiversidade bioquímica e de recursos genéticos para alcançar objetivos econômicos, biotecnológicos e/ou de conservação ambiental (FIRN, 2003). Uma das moléculas bastante estudadas e bioprospectadas de diversos ambientes terrestres são as enzimas que são moléculas em sua maioria de natureza protéica com alto poder de catalisar reações químicas e biológicas. Essas moléculas são utilizadas em vários setores industriais pois apresentam algumas vantagens em relação aos processos catalisados por agentes químicos, tais como a alta especificidade e seletividade ao seu substrato (GRÖGER; HUMMEL, 2014).

O mercado mundial das hidrolases atualmente gera um montante de 4 bilhões de dólares ao ano (ABIAM, 2015). Um exemplo de hidrolases são as esterases, que compreendem um subgrupo das lipases e são caracterizadas pela hidrolise da ligação éster de cadeias curtas de ácidos graxos ($C<10$). Elas são amplamente aplicadas por suas características notáveis como a estabilidade em solventes orgânicos, alta especificidade e estereoseletividade (JAEGER; EGGERT, 2002). Essas enzimas podem ser aplicadas em vários seguimentos da indústria como a farmacêutica, cosméticos, comida, detergente, curtume, têxtil, papel e a indústria do biodiesel (GUNCHEVA; ZHIRYAKOVA, 2011).

Tradicionalmente, muitas enzimas foram descobertas pelas técnicas dependentes de cultivo, entretanto a estimativa é de que menos de 0,1% dos microrganismos do solo são cultiváveis. Dessa forma, a metagenômica pode ser usada para acessar todo o potencial gênico presente em uma amostra ambiental, pois nessa abordagem os DNAs microbianos são extraídos diretamente dessas amostras e são clonados em hospedeiros afim de permitir a investigação funcional desses fragmentos de DNA independentes da cultura microbiana de origem (XU, 2006). O interesse pela descoberta de novas enzimas e/ou enzimas com característica melhoradas, tem guiado pesquisas através da metagenômica de diferentes ecossistemas.

Os manguezais são ecossistemas costeiros sujeitos a inundações periódicas, variações de salinidade e temperatura (HOLGUIN *et al.*, 2006). São ecossistemas pouco explorados e embora tenham uma alta atividade biológica, paradoxalmente apresentam uma baixa disponibilidade de nutrientes. Essa alta produtividade é o resultado da rápida ciclagem de nutriente comumente associada à atividade de microrganismos que colonizam o solo dessas regiões (REEF; FELLER; LOVELOCK, 2010). Devida a sua alta diversidade de microrganismos

ainda pouco explorados, esses ambientes tornam-se um berço para a prospecção de isolados e/ou genes para aplicações biotecnológicas diversas ainda não conhecidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bioprospecção de produtos naturais

A bioprospecção é definida como a exploração da biodiversidade bioquímica e de recursos genéticos para a descoberta de novos compostos naturais voltados para a produção de processos alimentares, bens de consumo, saúde pública e usos ambientais e energéticos (FIRN, 2003).

Os microrganismos detém o mais rico repertório de processos químicos e diversidade genética encontrados na natureza (MYERS, 1996). Esse grupo de organismos representa a base ecológica e desempenha funções importantes na manutenção de processos biogeoquímicos e da cadeia alimentar, além de manter relações vitais entre si e com outros organismos incluindo o homem (CEVERA, 1998).

A surpreendente atividade bioquímica dos microrganismos está relacionada a sua grande diversidade metabólica e adaptação genética adquirida ao longo da sua existência, o que os torna uma importante fonte para a prospecção de recursos genéticos e biomoléculas para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável. Além do mais, estima-se que somente 0,1-10% da diversidade microbiana é conhecida, dependendo do ambiente analisado, dessa forma o conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de microrganismos se tornou o foco da biotecnologia contemporânea, visando as possibilidades de aplicações desses organismos ou de suas moléculas em diversas áreas (PANIZZON *et al.*, 2015).

Na indústria, os microrganismos ou suas biomoléculas podem ser empregados na produção de compostos comerciais ou para transformação de substratos em produtos de maior valor agregado. Na indústria de alimentos, os microrganismos são utilizados para a produção de bebidas, panificação, produção de queijo e seus derivados, ácidos orgânicos, fermento biológico, enzimas dentre outras aplicações. Na agropecuária, destacam-se os microrganismos utilizados no controle biológico de pragas e vetores, que destroem hectares de plantações comerciais e dessa forma necessitam de um controle imediato, além disso, da utilização de microrganismos fixadores de nitrogênio. Já na área ambiental é crescente o número de trabalhos buscando a

recuperação de áreas contaminadas ou degradadas pela ação do homem através da biorremediação, essas técnicas são bastante promissoras e dependentes de novos isolados. Dessa forma, o aumento de estudos visando a bioprospecção de novas biomoléculas pra atender a demanda de diferentes setores da indústria da biotecnologia (THATOI *et al.*, 2013).

Atualmente, a busca de biomoléculas mais estáveis e com características melhoradas como por exemplo, atuar em valores extremos de pH, temperatura e altas concentrações de sal, tem ganhado maior atenção devido essas serem características requeridas por alguns processos industriais. Amostras de ambientes extremófilos se tornaram uma ótima estratégia para permitir a bioprospecção de moléculas com essas características e com alta performance em suas atividades.

Dentre alguns exemplos de ambientes onde esses organismos extremófilos são encontrados, estão as aberturas termais, no fundo do oceano, nas geleiras da antártica, em fontes termais, os desertos e locais submetidos a estresses causados pelo homem(FUJIWARA, 2002).

Um dos primeiros casos de cepas bacterianas prospectadas de ambientes extremos e com muita importância para a história da biologia molecular foi a bactéria *Thermus aquaticus* identificada em uma bacia termal no Parque Nacional de Yellowstone, onde Chien *et al.*,1976 purificaram a enzima termofílica *Taq* polimerase que possibilitou a automatização da reação em cadeia da polimerase (PCR), um método amplamente utilizado para amplificar segmentos curtos de DNA. Desde então, outras enzimas extremófilas vem sendo descobertas como lipases que atuam em pH altos (ZHANG *et al.*, 2009), esterases adaptadas a baixas temperaturas (LEE, 2016) e amilases tolerantes a altas concentrações de sal (QIN *et al.*, 2014).

As técnicas de biosprospecção e acesso a diversidade genética de microrganismos vem sofrendo profundas alterações em função das mudanças e dos avanços nas áreas da biologia molecular, genômica, metagenômica e bioinformática de modo a permitir a prospecção de uma fração maior da riqueza genética e bioquímica dos organismos não cultivados de amostras ambientais.

2.2. Prospecção metagenômica

Microrganismos cultiváveis do solo têm sido uma inestimável fonte de prospecção de compostos naturais com atividades biológicas importantes para vários setores da indústria contemporânea. Para isso esses compostos biológicos têm sido acessados por métodos

tradicionais envolvendo isolamento e cultivo de microrganismos a partir de amostras ambientais. Essas biomoléculas passam por etapas de triagem para as atividades desejadas e finalmente passam para testes de escalonamento e produção em grandes escalas.

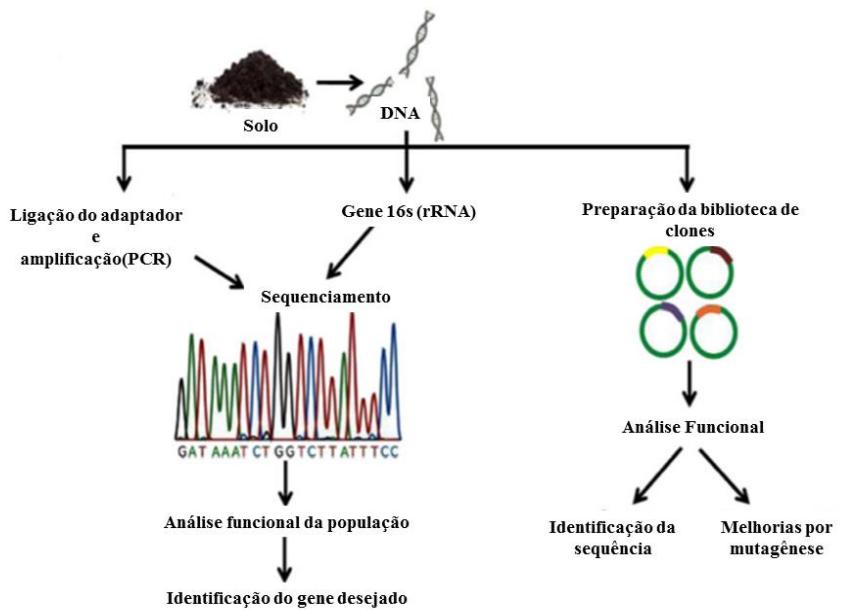
Apesar do êxito dessa técnica, várias limitações foram identificadas ao longo do tempo, como o fato de que somente 1% da microbiota do solo é passível de cultivo pelas técnicas de isolamento tradicionais da microbiologia (AMANN *et al.*, 1995), além disso algumas reações de biotransformação e biocatalíticas permanecem inviáveis devido à ausência de enzimas para essas reações ou deficiências associadas às mesmas, tais como características físico-químicas (pH, temperatura, salinidade), baixa taxa de expressão ou dificuldade na purificação da enzima. Dessa forma, a descoberta de novas moléculas depende de novas técnicas que consigam acessar todo a diversidade de microrganismos contidas nas amostras ambientais. Avanços nas ferramentas moleculares têm permitido que os biotecnologistas e ecólogos moleculares superem essa barreira, possibilitando a prospecção de genes funcionais e o entendimento de comunidades microbianas complexas, fornecendo uma nova abordagem de estudos denominada metagenômica (HANDELSMAN *et al.*, 1998).

A metagenômica é definida como uma análise genética direta dos genomas contidos numa amostra ambiental, sem a necessidade do seu cultivo *in vitro*. A metagenômica consiste principalmente na extração do DNA total da amostra analisada, com ou sem clonagem em vetores, permitindo o acesso aos genes de funções de interesse de microrganismos não cultiváveis (FIGURA 1) (MADHAVAN; SINDHU, 2017).

O termo metagenômica foi primeiramente proposto por HANDELSMAN *et al.* (1998), enquanto que a primeira abordagem usando DNA ambiental foi relatado por Ray *et al.* (1995) utilizando amostras de um digestor anaeróbico que estava em operação contínua por 10 anos para a busca de genes relacionadas com a produção de celulases.

As técnicas de metagenômica tem basicamente duas abordagens para a triagem de biomoléculas de amostras ambientais: a triagem baseada na homologia das sequências (dependentes de homologia) e a triagem baseada em função (dependente de expressão) (LAM *et al.*, 2015).

FIGURA 1 - Esquema básico da técnica de metagenômica baseada na função utilizando a clonagem.



Fonte: Adaptado de Madhavan e Sindhu, (2017).

A abordagem baseada na homologia das sequências é realizada através do uso de sondas de DNA marcados ou iniciadores de PCR desenhados a partir de sequências de genes já conhecidos. Nessa técnica é utilizado sequências conservadas dos genes, sendo detectado somente variantes de sequências de genes já conhecidos, tornando essa abordagem discutível quanto a possibilidade de acesso de novos genes funcionais. Porém há exemplos onde a técnica foi bem sucedida como Knietsch *et al.*, (2003) que isolaram genes de uma coenzima B12-glicerol dependentes e diol desidratases a partir dessa técnica.

O avanço das técnicas de sequenciamento massivo possibilitou a obtenção de informações genéticas de forma cada vez mais rápida e eficiente. Os sequenciadores de próxima geração permitem o sequenciamento direto de todo o DNA metagenômico sem a necessidade de etapas de clonagem, sendo cada vez mais aplicados para o estudo de genes em amostras metagenômicas de comunidades microbianas específicas (MADHAVAN; SINDHU, 2017).

Por outro lado, a triagem baseada em função parte da construção de uma biblioteca metagenômica através da clonagem dos fragmentos de DNA metagenômico em vetores apropriados como plasmídeos, cosmídios, vírus e fosmídios. Dependendo do tamanho dos insertos que se deseja estudar, as bibliotecas metagenômicas devem ser construídas usando

plasmídeos para insertos de até 15 Kb e formídeos, cosmídeos ou cromossomos artificiais bacterianos para insertos de até 40 Kb. Essa técnica é dependente da expressão dos fragmentos metagenômicos em um hospedeiro cultivável, como a *E. coli*, para que assim possa ser detectada a atividade metabólica associado a esse gene (AAKVIK *et al.*, 2011).

Uma vez que a técnica necessita da expressão do gene pela bactéria hospedeira, quando se trata de genes de bactérias não cultivadas essa expressão pode se dar de forma errônea e limitar a detecção da expressão de biomoléculas ainda desconhecidas. Apesar dessa desvantagem, a abordagem baseada em funções provou ser viável para procurar novos genes e produtos de genes (SIMON; DANIEL, 2011).

Compostos bioativos geralmente mostram propriedades de acordo com as condições físico-químicas dos habitats nos quais seus organismos produtores crescem. Para a aplicação na indústria por exemplo, a escolha de ambientes considerados extremos para um estudo metagenômico são frequentemente requeridos visando suas aplicações sob condições adversas.

Os manguezais, por exemplo, são ecossistemas costeiros onde várias condições extremas são identificadas como inundações periódicas, alta taxas de salinidades, temperaturas e a baixa disponibilidade de nutrientes (HOLGUIN *et al.*, 2006). Embora esses ambientes apresentam grande importância na ecologia e notória diversidade de microrganismos associados, são ambientes ainda poucos explorados. Devido a uma diversidade de microrganismos ainda pouco explorada esses ambientes representam um berço para a prospecção de isolados microbianos e/ou genes ainda não conhecidos para diversas aplicações biotecnológicas (COUTO *et al.*, 2010). Vários trabalhos têm reportado a bioprospecção de componentes bioativos em manguezais ao redor do mundo, alguns deles por técnicas dependentes e outros por técnicas independentes de cultivo. Várias enzimas como lipases, fitases, esterases, proteases, xilanases e amilases tem sido isoladas a partir de manguezais, além de vários outros bioproductos de importância econômica como biossurfactantes, bioplásticos, ágar, alginato e carragenana (TABELA 1).

Couto *et al.*, (2010) descreveram uma nova lipase, nomeada LipA, obtida a partir de uma biblioteca metagenômica de um manguezal do Paraná. LipA foi 52% idêntico a uma enzima lipolítica de uma bactéria não cultivada e compartilhou identidade muito baixa ($\leq 31\%$) com lipases/esterases de microrganismos cultiváveis. A determinação da atividade usando extratos brutos de *Escherichia coli* carreando o gene *lipA* revelou que esta nova enzima tem preferência

por ésteres com ácidos graxos de cadeia curta ($C \leq 10$; 0,87 U/mg). Isso corrobora com a ideia de que os manguezais são fontes para a prospecção de novas enzimas ainda não relatadas na literatura.

TABELA 1 - Produtos naturais de microrganismos de mangue e suas aplicações biotecnológicas

Produto Natural	Fonte	Aplicação
Enzimas Xilanolíticas	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. fumigates</i> , <i>Penicillium brasiliense</i> , <i>Chaetomium thermophile</i> , <i>Humicola insolens</i> , <i>Humicola lanuginosa</i> , <i>Humicola grisea</i> , <i>Melanocarpus albonymces</i> and <i>Bacillus sp.</i>	Fabricação de papel, Ração animal, Pães, indústria de sucos e vinhos e produção de xilitol
Ágar, Carragenana e Alginato	<i>Codium fragile</i> , <i>C. latum</i> , <i>C. dworkinii</i> , <i>C. tomentosum</i>	Anticoagulante
Metabolitos Secundários	<i>Actinomycetos</i>	Anti-tumor, anti-câncer e anti-inflamatório
Amilase, protease, esterase e lipases	<i>Vibrionales</i> , <i>Actinomycetales</i> and <i>Bacillales</i>	Aplicações industriais
Fitases	<i>Bacillus circulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. pantothenicus</i>	Aplicações industriais
Biosurfactante	<i>Leucobacter</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> ,	Industrial
Catalase, peroxidase, oxidase, polyphenol oxidase and ascorbic acid oxidase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. alcaligenes</i> , <i>Methylococcus sp</i>	Aplicações industriais

Fonte: Adaptado de Thatoi *et al.*, 2013.

Embora a construção de bibliotecas metagenômicas de amostras de solo seja considerado uma técnica simples, manusear uma grande quantidade de clones é uma tarefa árdua. Muitos trabalhos como o de Gao *et al.* (2016), ao final da aplicação da técnica, obtiveram um total de 40.000 clones de fosmídios contendo genes metagenômicos de uma amostra marinha.

A obtenção de um grande número de clones foi possível pela automatização do processo de produção e triagem. Estima-se que sejam necessários 10^7 clones contendo plasmídeos (com insertos de até 5 kb) ou 10^6 clones contendo BAC (insertos de até 100 kb) para cobrir toda a diversidade genética de uma comunidade microbiana contida em uma grama de solo (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Essas estimativas partem do pressuposto de que todas as espécies são igualmente abundantes na amostra. Dessa forma, para se obter uma representação significativa da diversidade de genomas total da amostra, o que incluem genoma de membros raros (menos de 1%), foi calculado que as bibliotecas contendo 10.000 Gb de DNA

metagenômico (1011 clones BAC) são requeridas (RIESENfel; GOODMAN; HANDELSMAN, 2004).

Um número acentuado de novas enzimas de interesse industrial vem sendo identificadas pela técnica de triagem pela sua função como esterases (LEE, 2016; ZHANG et al., 2015), lipases (SU *et al.*, 2015), celulases (YANG *et al.*, 2016), proteases (GONG *et al.*, 2017) e lacases (FERRER; BELOQUI; GOLYSHIN, 2010).

2.3. Enzimas Industriais

Enzimas são potentes biocatalizadores na sua maioria de natureza proteica e conhecidos amplamente por aumentar a velocidade de reações biológicas e químicas. Sabe-se que as enzimas desempenham um papel crucial como catalisadores metabólicos, o que permite o seu uso em vários setores da indústria como de alimentos, farmacêuticos, detergentes, têxteis, celulose e papel, alimentos para animais, couro e cosméticos (ADARIO; DEMAIN, 2014).

Os microrganismos tornaram-se valiosas fontes de enzimas devido suas vantagens como o fácil cultivo, o seu amplo recurso bioquímico e a diversidade genética. Alguns fatores motivam o uso de enzimas microbianas em aplicações industriais, como o aumento da demanda por produtos de consumo, a necessidade de redução de custos nos processos industriais, a segurança ambiental e a possibilidade de reações mais específicas quando comparados com catalisadores químicos (CHOI; HAN; KIM, 2015).

A demanda por enzimas industriais está sofrendo um aumento contínuo impulsionado pela necessidade de soluções sustentáveis para processos industriais e pelo crescimento da demanda de alimentos resultado do aumento da população mundial. Estima-se que mais de 500 produtos industriais já estão sendo feitos utilizando enzimas proveniente de microrganismos (KUMAR; SINGH, 2013).

O mercado das enzimas atingiu um montante de US \$ 5 bilhões de dólares em 2016 e espera-se que ultrapasse US \$ 9,5 bilhões até 2024 (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2017). A aplicação de quimosimas na indústria de alimentos é apontada como uma das maiores arrecadações em 2018 onde chegará a um montante de 2,3 bilhões de dólares, esse valor só fica abaixo do valor arrecadado na aplicação de hidrolases na indústria de petróleo e gás que marcou 330 bilhões de dólares em 2015 (TABELA 2).

TABELA 2 – Enzimas utilizadas em diversos setores industriais

Enzimas	Setor/Indústria	Potencial Valor de Mercado
Lipase, Protease, Celulase, Amilase	Detergente (Novozymes)	\$2.767 M em 2019 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/protein-hydrolysis-enzymes.asp)
Amilase, Glucoamilase, Glucose Isomerase	Processamento de amido (Novozymes/Dinamarca, DuPont/EUA, Rouquette Frères/França etc.)	\$2.238 M em 2018 (http://www.prnewswire.com/news-releases/alcohol-and-starchsugar-enzyme-market- by-type-carbohydrase-protease-and-lipase-by-application-industrial-specialty-- geography---global-trends--forecasts-to-2018-256229371.htmIV)
Protease, Fitase, Xilanase	Para ração animal (Royal DSM NV)	\$1.371 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Xilanase	Celulose e Papel	200 M (www.novozymes.com)
Arbinanase, Amilase, Poligalacturonanase	Processamento de frutas ou Vegetais (Novozymes, DSM)	Enzimas em alimentos: \$ 2.3 B em 2018 (http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul10/articles22.htm)
Hidrolase	Óleo e Gás (Novozymes)	\$330 B em 2015 (Petrochina, China)
Quimosina	Laticínios (Pfizer, Chr. Hansen)	Enzimas em alimentos: \$ 2.3 B em 2018 (http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul10/articles22.htm)
Urease, Pectinase	Vinho (Carlsberg)	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Protease	Carne (Novozymes)	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Amilase	Têxtil (Novozymes)	\$2.7 M em 2019 (www.marketsandmarkets.com)
Amilase	Panificação	\$695.1 M em 2019 (www.marketsandmarkets.com)
β-Glucanase	Produção de cervejas	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Protease	Curtume	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)

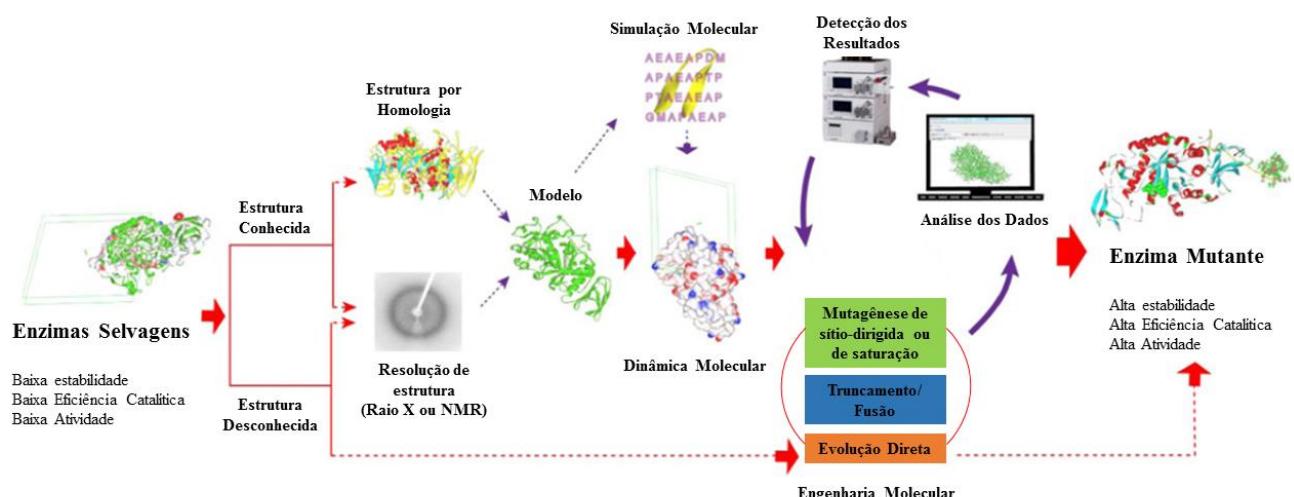
Fonte: Adaptado de SINGH *et al.*, (2016).

Muitos processos industriais que utilizam a síntese química para produção de produtos químicos e farmacêuticos apresentam várias desvantagens: baixa eficiência catalítica, falta de especificidade enantiomérica para síntese quiral, necessidade de alta temperatura, baixo pH e alta pressão. Além disso, o uso de solventes orgânicos leva a resíduos orgânicos e poluentes. A utilização de enzimas são mais úteis para estas aplicações, pois algumas enzimas trabalham em condições de reação consideradas leves como por exemplo, pH, temperatura e pressão ambiente, elas têm uma meia vida longa, uma alta seletividade estereoquímica que produz produtos de reação régio-quimicamente definidos em uma reação de 10^5 a 10^8 vezes (JOHNSON, 2013).

As enzimas podem ser modificadas para melhorarem suas características e com isso suplementarem seu desempenho para uma determinada aplicação biotecnológica. Alguns métodos de engenharia molecular, como a evolução direta e a mutagênese de sítio dirigida, foram desenvolvidos para aperfeiçoar as características das enzimas naturais (FIGURA 2). Dentre as

características que se pode alterar estão sua estabilidade, a especificidade pelo substrato e sua atividade específica (YANG *et al.*, 2014).

FIGURA 2 - Métodos e procedimentos de engenharia molecular para melhorar o desempenho das enzimas industriais.

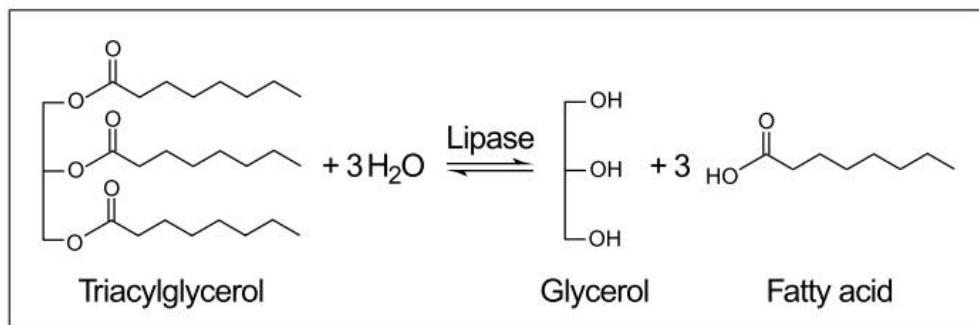


Fonte: Adaptado de Yang *et al.*, (2014).

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise ou a síntese de ésteres a partir de glicerol e ácidos graxos (FIGURA 3), e em sua estrutura contém uma dobra de uma folha β principalmente paralela flanqueada por conexões α -helicoidais (OLLIS *et al.*, 1992). Dentro desse grupo de enzimas elas são diferenciadas pelo tamanho da cadeia carbônica do seu substrato, enquanto lipases preferem longas cadeias carbônicas (≥ 10 carbonos), esterases hidrolisam cadeias curtas (< 10 carbonos) (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Apesar desta diferença, ambas são referidas como lipases ou "enzimas lipolíticas". Elas são muito utilizadas em diversos setores da indústria como a farmacêutica, cosméticos, alimentos, couro, papel, têxtil e biodiesel (JAEGER; EGGERT, 2002).

As razões para o grande potencial biotecnológico das lipases microbianas incluem o fato de elas serem estáveis em solventes orgânicos, geralmente não requererem cofatores, possuírem uma ampla especificidade de substratos e exibirem quimioseletividade, regioseletividade e estereoseletividade. As estruturas de muitas lipases já foram resolvidas, isso também facilita consideravelmente o design de estratégias de engenharia racional de lipases (JAEGER; EGGERT, 2002).

FIGURA 3 - A ação catalítica das lipases, um triglicerol hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos.



Fonte: Adaptado de Jaeger e Reetz, 1998.

Os desafios da indústria de lipases incluem a descoberta de novas enzimas com boas propriedades, por exemplo, alta estabilidade da enzima em solventes orgânicos miscíveis em água é desejada na indústria farmacêutica e para produção de biodiesel (MARUTHAMUTHU; VAN ELSAS, 2017); lipases halotolerantes são particularmente úteis para as aplicações industriais relacionadas à produção de produtos marinhos (ESAKKIRAJ *et al.*, 2016); lipases alcalinas são extremamente importantes na produção de detergentes devido o pH básico do meio onde vão atuar e não terem sua atividade afetada na presença de surfactantes e íons metálicos (SU *et al.*, 2015) etc.

Atualmente, várias novas lipases microbianas vêm sendo descobertas pela técnica da metagenômica, sendo o maior número de enzimas extremófilas incluindo espécies termófilas, psicrófilas e halofílicas (CASTILLA *et al.*, 2017; SANTI *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2016; JIMÉNEZ *et al.*, 2012; LEE, 2016). Todas estas enzimas foram superexpressas utilizando a *Escherichia coli* como hospedeiro heterólogo, no entanto, a eficiência de expressão em termos de rendimento de proteína enzimaticamente ativa nem sempre é favorável necessitando de algumas técnicas como a desnaturação seguida de *refolding* da enzima (SU *et al.*, 2015) ou a coexpressão de chaperonas (VLASOVA *et al.*, 2013) para facilitar o dobramento da lipase e obter a enzima na sua forma ativa e solúvel.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo a triagem funcional para a busca de enzimas lipolíticas em uma biblioteca metagenômica de sedimentos do manguezal do Rio Jaguaribe (Fortim, Ceará) e a expressão de uma esterase LipG7 em *Escherichia coli*.

3.2. Objetivos Específicos

- Triagem funcional para a produção de enzimas lipolíticas;
- Sequenciamento dos insertos positivos para atividade lipolítica;
- Anotação gênica dos insertos metagenômicos;
- Expressão da enzima recombinante em *E. coli*.
- Purificação da enzima recombinante LipG7;
- Avaliação do efeito de íons bivalentes e detergentes na atividade catalítica da enzima recombinante.

4. METODOLOGIA

4.1. Triagem de clones com atividade lipolítica

Um total de 1.152 clones de uma biblioteca metagenômica preparada a partir de sedimentos de manguezal do rio Jaguaribe, Ceará (NOGUEIRA, 2011), foram triados para atividade lipolítica. Primeiramente, os clones foram reativados a 37 °C por 16 h a 150 rpm em blocos de crescimento de 96 poços contendo 1 mL de caldo Luria Bertani (LB, composição g/l: triptona 10,0; extrato de levedura 5,0; cloreto de sódio 5,0) e ampicilina (100 µg/mL). As produções de lipases/esterases foram observadas através de ensaios em placas contendo ágar Luria Bertani (LB) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 1% de tributirina. Os clones foram inoculados com o auxílio de um replicador estéril e incubados a 37 °C por 72 h. A atividade positiva foi detectada pela formação de halos transparentes ao redor das colônias.

4.2. Sequenciamento e análise filogenética dos insertos com atividade lipolítica

Os clones positivos para atividade lipolítica foram crescidos em caldo LB com ampicilina (100 µg/mL) e incubados por 24 h a 150 rpm. Em seguida, 3 mL de cada cultura foram submetidos à extração plasmidial. Para isto, a cultura foi centrifugada 7000 g por 30 seg e o pellet foi resuspendedido em 200 µL de uma solução de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) e 100 µg/mL de RNase A e deixado em repouso por 10 min em temperatura ambiente. Depois disso, 200 µL de uma solução de 200mM de NaOH e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) foram acrescentados seguido de 200 µL de uma solução de 3M de KOAc pH 5.5 e centrifugado a 7000 g por 3min. Finalmente, o DNA plasmidial foi purificado e precipitado com a adição de 500 µL de clorofórmio e 350 µL de isopropanol, respectivamente, com cada passo intercalados com etapas de centrifugação a 13000 rpm por 3 min (BIRNBOIM, 1983). A qualidade dos DNAs plasmidiais obtidos ao fim do processo foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com corante SYBR™ safe (Invitrogen, EUA) com uma corrente de 100 V. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, EUA) a 260nm.

Os plasmídeos foram sequenciados pela Macrogen (Seoul, Coreia) utilizando os iniciadores mostrados na tabela 3. As sequências parciais foram usadas para gerar sequências consenso usando o programa CondonCode Aligner 6.0.2. As sequências consenso obtidas foram analisadas e comparadas contra o banco de dados de proteínas não redundante do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTx) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A análise filogenética foi realizada usando o programa GENEIOUS versão 10.2.2 (KEARSE *et al.*, 2012). Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o algoritmo Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) com um *bootstrap* de 1000 reamostragens (FELSENSTEIN, 1985). A árvore filogenética foi construída utilizando 17 sequências de aminoácidos escolhidas com base nos resultados obtidos pela análise do BLASTx.

TABELA 3 - Iniciadores utilizados para sequenciamento dos insertos metagenômicos.

Clone	Iniciadores	
	Forward	Reverse
G6	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	5'-AAGAACATCGATTTCATGGCAG
	5'-ATAACAGATTCAAACACCGGC	5'-TTGGAACCATCATCATACTCAGC
	5'-GTTGACGAAACTATGATATGCCG	5'-ATTGGACGATTATCACCAAGTGG
G7	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	5'-AAGAACATCGATTTCATGGCAG
	5'-GCCATCACACATAGAACCAAGAGG	5'-TAGCGATGGGATGGAAGTGCTCC
H7	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	5'-AAGAACATCGATTTCATGGCAG

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3. Subclonagem e transformação da esterase LipG7 em *E. coli*

Para a amplificação do gene LipG7 uma PCR foi realizada usando os iniciadores: *Forward*, 5'- AAA GAA TTC AGA GAA TCT TTA TTT TCA GGG CAT GAG CGA CTC ACT GCG TCA GG -3' e *Reverse*, 5'- AAC TCG AGT CAT TTC AGG TGA CGA TAG ATT GCC G-3'. A reação foi completada em um volume final de 20 µL contendo 100 ng de DNA molde, Go Taq Buffer 1X (Promega, EUA), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,5 µM de cada primer e 1 unidade de GoTaq DNA Polimerase (Promega, EUA). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastecycler®(Eppendorf, Alemanha) programado para um passo de

desnaturação inicial (94°C por 5 min) seguido por 30 ciclos de 1 min a 94°C , 1 min a $61,8^{\circ}\text{C}$, tendo como base o resultado de um gradiente de temperatura de anelamento previamente realizado, e 1 min a 72°C . Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com o corante SYBRTM safe (Invitrogen, EUA) e purificados usando o kit *WizardTM SV gel and PCR clean-up system* (Promega, EUA).

Para a expressão em *E. coli*, o gene LipG7 foi subclonado no vetor de expressão pET302/NT (Thermo Fisher, EUA) que possui promotor *lac* e cauda de 6 histidinas em seu N-terminal. As reações de digestão do gene LipG7 e do vetor foram realizadas em um volume total de 20 μL , contendo tampão Tango 2X, 25 U de enzima de restrição (*EcoRI* e *XhoI*) e 10 μg de inserto ou 10 μg de vetor pET302/NT por 16 h a 16°C . A reação de ligação foi realizada utilizando 140 ng de inserto ou 100 ng de vetor, tampão DNA ligase T4 1X e 0,4 U de T4 DNA ligase (Biolabs, EUA) em um volume final de 20 μL por 16 h a 16°C . A transformação foi realizada em 3 linhagens de *E. coli* eletrocompetentes (BL21, Rosetta-gami e ArcticExpress) utilizando um eletroporador (BTX ECM 399, EUA) com pulso de 1800 V.

As células transformadas foram incubadas a 37°C por 1 h a 150 rpm e plaqueadas em Agar LB suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h a 37°C . Posteriormente, 10 colônias foram coletadas e submetidas a um PCR em colônia fresca, utilizando as mesmas condições da PCR anterior, para a confirmação da presença do inserto em cada linhagem.

4.4. Avaliação da expressão da LipG7 nas 3 linhagens de *E. coli*

Uma colônia isolada de cada linhagem de *E. coli* transformada (BL21, Rosetta-gami e ArcticExpress) foi utilizada para um pré-inóculo em caldo LB suplementado de ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) por 16 h a 37°C . Após isso, 400 μl de cada pré-inóculo foram adicionados em erlenmeyer contendo 400 mL de LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) e este foi incubado a 37°C sob 200 rpm. Após a densidade óptica de 0,6 - 0,8 a 600 nm ser atingida, cada cultura foi distribuída em alíquotas de 20 mL em falcons estéreis. A indução da produção da proteína nos 3 sistemas foi realizada utilizando um gradiente de concentrações de isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) de 0,1, 0,5 e 1 mM em diferentes tubos falcons. Para as linhagens BL21 e Rosetta-gami além do gradiente de IPTG também foi utilizado um gradiente de temperatura de 20, 30 e 37°C por 3 h. Na linhagem ArcticExpress foi utilizada o gradiente de IPTG na temperatura de 13°C .

por 24 e 36 h. Após a indução, todas as células foram centrifugadas a 7870 x g, 4 °C por 5 min, e lavadas com solução salina (NaCl 0,15 M). Os pellets foram ressuspensos em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 150 mM NaCl. Em seguida, as células foram lisadas por sonicação (2 ciclos: 3 seg *on*/3 seg *off*, amplitude de 30%) (Qsonica Q125, EUA) e centrifugadas a 15000 x g, 4 °C por 45 min. A expressão da proteína foi verificada em gel de eletroforese de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE Laemmli) seguindo o método de Laemmli, 1970.

4.5. Ressolubilização de corpos de inclusão

A cepa transformada *E. coli* Rosetta-gami foi induzida utilizando um erlenmeyer de 2 litros contendo 400 mL de caldo LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL). Para isso, a linhagem foi crescida a 37 °C, 200 rpm até uma densidade óptica de 0,6 - 0,8 a 600 nm. A indução da expressão da enzima foi realizada pela adição de 0,5 mM de IPTG a 30 °C por 3 h. Após a indução, as células foram lisadas por sonicação utilizando 2 ciclos de 3 seg *on* e 3 seg *off*, por 5 min com amplitude de 30% (Qsonica Q125, EUA) e centrifugadas a 15000 x g, 4 °C por 45 min.

Para o tratamento da fração insolúvel foram testados dois agentes desnaturantes, cloridrato de guanidina e o detergente N-laurilsarcosina. Para o teste com cloridrato de guanidina, o *pellet* contendo a proteína insolúvel foi ressolutibilizado em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 5 mM, ditioreitol (DTT) 5 mM, Uréia 2 M e 2% TritonX-100 e centrifugado a 15000 x g, 4°C por 30 min. Esse processo foi repetido 3 vezes e alíquotas foram retiradas em cada ciclo de lavagem. Após as lavagens o *pellet* foi ressuspensos em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e cloridrato de guanidina 3 M, onde foi deixado em temperatura ambiente por 30 min e posteriormente centrifugado a 8.000 x g, 4°C por 30 min (PALMER; WINGFIELD, 2004). Já para o N-laurilsarcosina o *pellet* foi solubilizado em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 com 0,2 % de N-laurilsarcosina e incubado em baixa rotação a 13 °C por 16 h (PETERNEL *et al.*, 2008).

4.6. Purificação da LipG7

A purificação da proteína foi feita por cromatografia de afinidade utilizando a coluna Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences, EUA). A coluna foi primeiramente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e NaCl 100 mM e carregada posteriormente

com o extrato proteico contendo a enzima na forma solúvel. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM e imidazol 6 mM para a retirada de proteínas com baixa afinidade. A eluição da enzima foi avaliada pela adição de 50, 100, 150, 200 e 250 mM de imidazol. O desempenho da indução, tratamento dos corpos de inclusão e purificação foram avaliadas por eletroforese SDS-PAGE Laemmli. A concentração da enzima no final do processo foi determinada utilizando espectrofotometria a 280 nm com a ajuda do coeficiente de extinção da enzima (1,367 ml/mg/cm) que foi deduzido a partir da sequência de aminoácidos.

A atividade lipolítica foi mensurada pela liberação de 4-nitrofenol durante a hidrólise do substrato 4-nitrofenil butirato (C4) (Sigma-Aldrich, EUA). A reação de hidrólise foi feita em microplacas de 96 poços em um volume total de 260 µL, utilizando 1mM do substrato 4-nitrofenil butirato e 50 mM de tampão fosfato pH 7,2 a 30 °C por 30 min. A quantidade de 4-nitrofenol resultante da atividade enzimática foi observada por espectrofotometria no comprimento de onda de 410 nm cujo o coeficiente de distinção de 123,45 foi calculado pela construção de uma curva padrão desse composto. Todos os experimentos foram analisados em triplicatas dessa forma os resultados são expressos em valores médios sendo calculado o desvio padrão. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade necessária para liberar 1µmol de 4-nitrofenol por min.

4.7. Efeito da adição de íons bivalentes e detergentes na atividade da LipG7

A atividade catalítica da LipG7 foi avaliada sob a influência de íons metálicos, surfactantes não iônicos (TritonX-100 e Tween 80) e EDTA. Para isto, a atividade da enzima com 1 mM do 4-nitrofenil butirato em tampão fosfato 0,5 mM pH 7,2 foi mensurada na presença de 0,5 mM dos íons Mg²⁺, Mn²⁺ ou Ca²⁺, 1 % (v/v) dos detergentes tritonX-100 ou tween 80 e 0,5 mM de EDTA. A reação foi realizada a 30 °C por 30 min e analisado posteriormente em espectrofotômetro a 410 nm. Para uma maior confiabilidade dos resultados, foram feitos controles das reações para cada condição, com o incremento dos íons, dos detergentes ou EDTA. Todos os experimentos foram analisados em triplicatas e os dados foram submetidos à análise de variância pelo método ANOVA e pelo método de comparações múltiplas (Teste de Tukey) no programa *GraphPad Prism* versão 6.01.

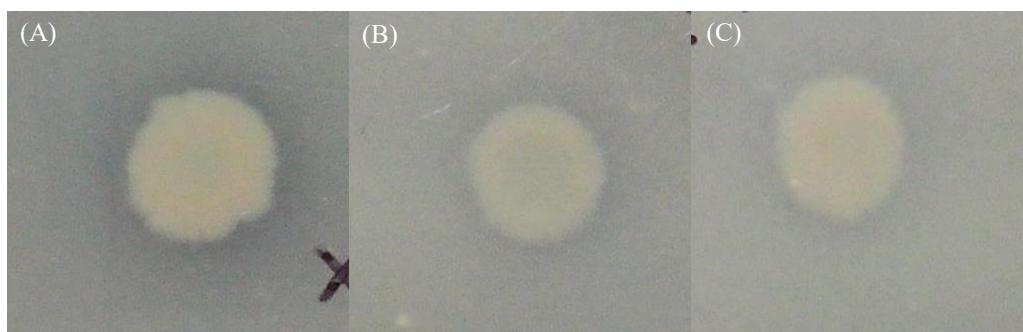
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Triagem de clones com atividade lipolítica

Um total de 1.152 clones de uma biblioteca metagenômica de sedimentos de manguezal do rio Jaguaribe foram submetidos à pesquisa de enzimas lipolíticas, resultando em 3 (0,26%) clones positivos para lipases, denominados LipG6, LipG7 e LipH7. A atividade lipolítica foi revelada pela formação de halos transparentes em volta das colônias (FIGURA 4). Os clones continham um tamanho médio de inserto de 3 kb, correspondendo a 3,4 Mb de DNA metagenômico. Foram encontrados 3 clones positivos para lipases, representando aproximadamente um gene para esta classe de enzima por 1,2 Mb de DNA (um clone positivo para cada 384 clones testados).

Em geral, milhares de clones são triados nos trabalhos com metagenômica para a obtenção de poucos clones positivos (LAM *et al.*, 2015). Portanto, neste estudo foi obtido um bom rendimento de clones positivos. Trabalhos como o de Henne *et al.*, (2000) ao estudar uma biblioteca metagenômica construída a partir de amostras de três solos diferentes, identificaram um clone positivo para lipase depois de um *screening* de 730000 clones com um tamanho médio de inserto de 6.5 Kb, isso corresponde a um clone positivo por 473 Mb de DNA. Pereira *et al.*, (2015) analisaram uma biblioteca fosmidial construída a partir de amostras de solo contaminados com petróleo e encontraram um clone positivo para lipase após triarem 4.224 clones metagenômicos, correspondendo a um gene com atividade para cada 4,9 Mb de DNA.

FIGURA 4 - Clones metagenômicos que apresentaram halos positivos para atividade lipolítica: (A) LipG7 ; (B) LipG6; (C) LipH7.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em sedimentos de manguezais brasileiros, trabalhos relacionados com a prospecção de enzimas por estratégias metagenômicas são escassos. Couto *et al.*, (2010) isolaram uma nova lipase de uma biblioteca fosmidial contendo 2400 clones derivada de sedimento de um manguezal do Paraná com insertos em torno de 20 a 30 Kb, correspondendo a um gene com atividade lipolítica por 60 Mb de DNA.

Muitas vezes o baixo número de clones lipolíticos funcionais encontrados em bibliotecas metagenômica se dá pela possibilidade de não reconhecimento dos elementos de regulação da bactéria não cultivada pela cepa hospedeira (*E. coli*), dificuldades na expressão de genes lipolíticos em células heterólogas devido à necessidade de dobramentos específicos (JAEGER; EGGERT, 2002) ou toxicidade da enzima (BELL *et al.*, 2002). Por outro lado, uma análise mais cuidadosa e minuciosa da atividade durante a triagem pode elevar o número de clones positivos, já que a expressão da enzima pode estar se dando de forma basal pelas razões citadas acima (RANJAN *et al.*, 2005). Ensaios mais sensíveis como os protocolos desenvolvidos com base na queda de pH devido a liberação de prótons após a lipólise dos ácidos graxos podem otimizar a triagem de enzimas lipolíticas. Rajni *et al.* (2006) desenvolveram um método mais sensível pela seleção criteriosa do pH inicial do substrato cromogênico, que foi ajustado perto do ponto final do corante, de modo que mesmo uma ligeira queda em pH resulta em mudança de cor imediata.

5.2. Sequenciamento e análise filogenética dos insertos com atividade lipolítica

A extração plasmidial e o sequenciamento dos fragmentos metagenômicos dos clones LipG6, LipG7 e LipH7 mostraram que os insertos continham tamanhos aproximados de 4.0, 2.9 e 0.8 Kb, respectivamente. A avaliação da homologia dessas sequências com enzimas lipolíticas conhecidas se deu utilizando a ferramenta BLASTx contra o banco de dados de proteínas não redundantes do NCBI. A análise dos clones LipG6 e LipH7 não revelaram homologia com lipases ou esterases conhecidas. Os principais hits obtidos após a execução do BLASTx mostraram homologia com o regulador transcripcional da família AraC e com fosfatidiltransferases, respectivamente. Uma sequência parcial de 1179 pb do clone LipG7, entretanto, mostrou 80% de identidade com a enzima 1,4-butanodiol diacrilato esterase da bactéria *Porticoccus hydrocarbonoclasticus* (TABELA 4).

TABELA 4 - Principais *hits* obtidos após a execução do BLASTx contra o banco de dados de proteínas não-redundantes do NCBI.

Clone	Descrição	Espécie	Query cover	E. value	Identidade	Número de acesso
LIPG7	1,4-butanodiol diacrilato esterase	<i>Porticoccus hydrocarbonoclasticus</i>	99%	0.0	80%	WP036858555
	1,4-butanodiol diacrilato esterase	<i>Methylibium sp.</i>	98%	0.0	72%	WP036235362
	1,4-butanodiol diacrilato esterase	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	98%	0.0	71%	WP042383693
LIPG6	Reguladores transcricionais AraC	<i>Fluoribacter bozemanae</i>	22%	6,00E-121	62%	WP058458094.1
	Reguladores transcricionais AraC	<i>Shewanella mangrovi</i>	20%	3,00E-101	54%	WP063355125.1
LIPH7	CDP-Alcool fosfatidiltransferase	<i>Porticoccus hydrocarbonoclasticus</i>	31%	2,00E-28	68%	WP051921200.1
	Proteínas da família GtrA	<i>Porticoccus hydrocarbonoclasticus</i>	41%	9,00E-24	62%	WP081890842.1
	inositol-3-fosfato sintase	<i>Porticoccus hydrocarbonoclasticus</i>	16%	3,00E-14	79%	WP036859314.1

Fonte : Elaborada pelo autor.

As características da esterase LipG7 foram avaliadas utilizando a ferramento ProtParam do Expasy. Características como: Ponto isoelétrico, massa molecular e coeficiente de extinção molar foram avaliados (TABELA 5). A análise filogenética do inserto contido no clone LipG7 construída utilizando 17 sequências de aminoácidos de representantes da enzima lipolítica 1,4 butanodiol diacrilato esterase (FIGURA 5) mostrou que LipG7 apresenta maior similaridade e, consequentemente, foi agrupada com uma esterase de *P. hydrocarbonoclasticus* (GUTIERREZ *et al.*, 2012). Essa bactéria foi isolada a partir de culturas de fitoplâncton marinho e revelou-se capaz de degradar hidrocarbonetos aromáticos. No estudo os pesquisadores observaram que essas bactérias utilizavam hidrocarbonetos como fontes de carbono, enquanto que os açúcares testados não serviram como substratos para o seu crescimento.

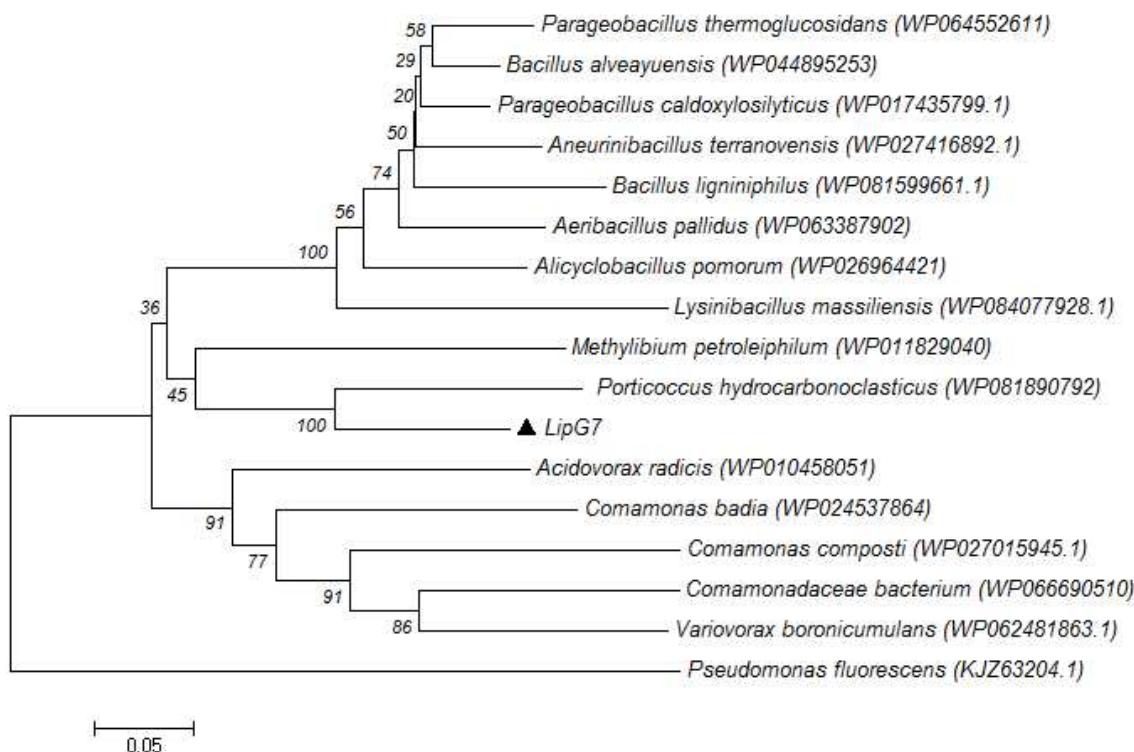
A enzima 1,4 butanodiol diacrilato esterase é uma representante da família VIII das esterases. Este grupo de esterases, ainda pouco caracterizado, contém uma região característica de alta identidade com β -lactamases e proteínas ligantes à penicilina (BORNSCHEUER, 2002).

TABELA 5 - Parâmetros gerais da esterase LipG7 obtidos a partir da sequência de aminoácidos pela ferramenta ProtParam do ExPASy.

Esterase	Número de Aminoácidos	Ponto isoelétrico	Massa Molecular	Coeficiente de extinção molar
LipG7	392	4.96	43079.78 Da	1,367 ml/mg/cm

Fonte: Elaborado pelo autor.

FIGURA 5 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento de 17 sequências de aminoácidos de representantes da enzima 1,4-butanodiol diacrilato esterase.

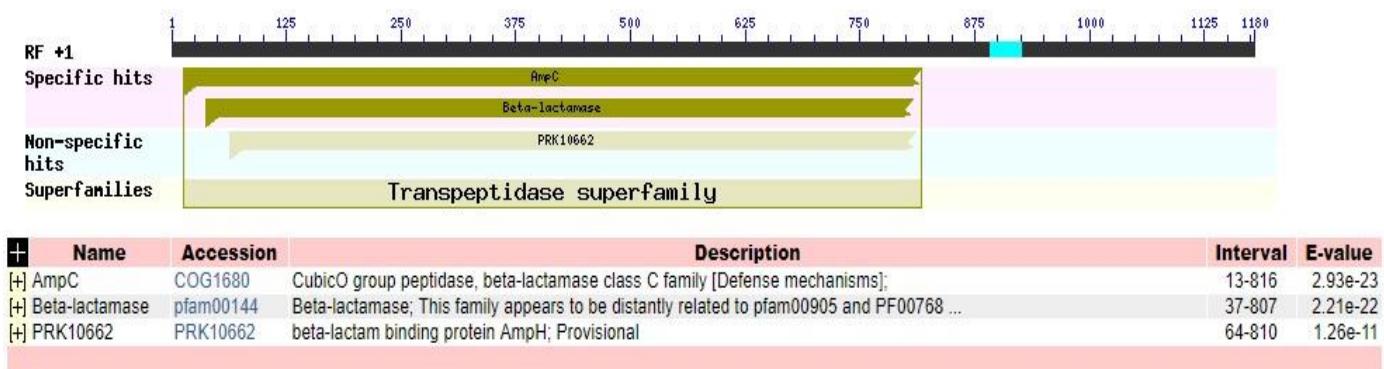


Fonte: Geneious.

Além disso, ao contrário de outras famílias de esterases microbianas, onde o resíduo de serina do sítio ativo está localizado frequentemente dentro da sequência G-x-S-x-G ou G-D-S-L, o resíduo de serina do sítio ativo de esterases da família VIII está situado dentro da sequência S-x-x-K (RASHAMUSE *et al.*, 2009). Nos resultados com o BLASTx, LipG7 apresentou domínios conservados de β -lactamases (FIGURA 6). Beta-lactamases são enzimas importantes, produzidas por algumas bactérias e que são responsáveis por sua resistência a antibióticos beta-

lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenemas, hidrolisando a quebra da ligação amida do anel beta-lactâmico (WILLIAMS, 1999). De fato, a sequência S-C-T-K encontrada na sequência de aminoácidos da esterase LipG7 corresponde a sequência conservada S-x-x-K, que é conservado tanto em β-lactamases de classe C (KNOX; MOEWS; FRERE, 1996) quanto em carboxilatoesterases da família VIII (ARPIGNY; JAEGER, 1999).

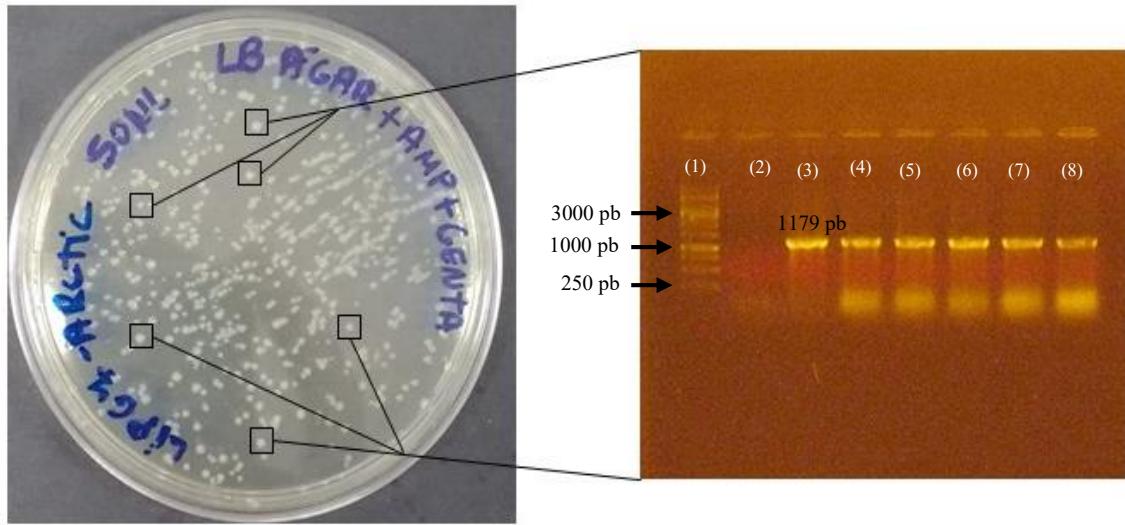
FIGURA 6 - Resultado do BLASTx mostrou que LipG7 apresenta domínios conservados de Beta-lactamases e de proteínas de ligação AmpC



Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> - Conserved domains

5.3. Subclonagem e transformação da esterase LipG7 em *E. coli*

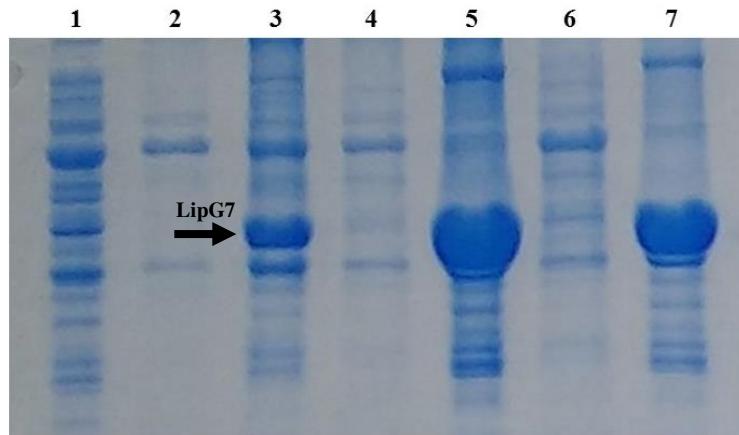
O gene LipG7 foi amplificado e clonado com sucesso sob controle do vetor de expressão pET302/NT. Após a transformação uma PCR de 10 colônias foi realizada para a confirmação da presença do inserto nas diferentes linhagens de *E. coli* (FIGURA 7). Em todas as linhagens transformadas pelo menos um clone dos 10 representantes escolhidos aleatoriamente para o teste, apresentaram amplificação, estes foram então cultivados e estocados a -80 °C.

FIGURA 7 - Resultado da PCR de colônia utilizando iniciadores específicos para o inserto G7.

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: Em (1) Marcador, (2) Branco, (3-8) clones de *E. coli* contendo o inserto.

5.4. Avaliação da expressão da LipG7 nas 3 linhagens de *E. coli*

A expressão da esterase lipG7 foi avaliada em 3 cepas comerciais de *E. coli* (Bl21, Rosetta-gami e ArcticExpress), através de eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) sendo identificado que em todas as condições de temperatura e concentração de IPTG a esterase foi produzida na forma insolúvel (FIGURA 8).

FIGURA 8 - Verificação da presença da LipG7 na fração solúvel e insolúvel após a lise celular, indução em Rosetta-gami a 30 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: (1) não induzido, (2) fração solúvel e (3) fração insolúvel 0,1 mM de IPTG, (4) fração solúvel e (5) fração insolúvel 0,5 mM de IPTG, (6) fração solúvel e (7) fração insolúvel 1 mM de IPTG.

Através desse experimento foi possível verificar também que a concentração de 0,5 mM de IPTG e a temperatura de 30 °C foi a condição visualmente mais efetiva na produção da proteína nas cepas Rosetta-gami (FIGURA 8), BL21 e ArcticExpress.

O sistema bacteriano é o sistema mais utilizado para a produção de proteínas heterólogas devido às suas inúmeras vantagens como alta velocidade de crescimento, baixo custo, facilidade na manutenção das culturas e a capacidade de produzir grande quantidade de proteínas, podendo chegar à cerca de 80% da sua massa seca (PACHECO *et al.*, 2012). Porém, pode apresentar algumas desvantagens como, por exemplo, a produção de proteínas em corpos de inclusão.

Corpos de inclusão são agregados de proteínas, na sua maioria na forma inativa, resultado de uma alta expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* (CHRUNYK *et al.*, 1993). O uso de temperaturas elevadas e a presença de altas concentrações de indutor durante a expressão da proteína, frequentemente resultam na expressão da proteína desejada nesses complexos insolúveis no citoplasma da célula sendo necessário ajustá-los para obtenção da mesma na forma solúvel. Por outro lado, atualmente existem vários protocolos de isolamento, solubilização e *refolding* de proteínas recombinantes de corpos de inclusão, estes agentes solubilizantes leves retém as estruturas secundárias das proteínas, inibem a agregação de proteínas e permitem a recuperação melhorada de proteínas ativas (PETERNEL *et al.*, 2008).

A expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* muitas vezes constitui uma sequência de erros e acertos, sendo necessário ajustar diversos parâmetros para sua produção na forma solúvel. Sabe-se que a escolha correta da linhagem hospedeira, vetor de expressão, temperatura, concentração do indutor e tempo de incubação pode alterar bastante a quantidade de proteínas produzidas e a quantidade na fração solúvel. O estudo dessas condições deve ser minuciosamente analisado dependendo da natureza da proteína em estudo evitando a formação de corpos de inclusão(ROSANO; CECCARELLI, 2014). Entretanto, as diferentes condições de temperatura, IPTG e células hospedeiras testadas no atual estudo não possibilitaram a obtenção da LipG7 na forma solúvel sendo testada a sua obtenção a partir da sua ressolubilização dos corpos de inclusão.

5.5. Ressolubilização de corpos de inclusão

Para obtenção da LipG7 a partir de corpos de inclusão foram testados um agente caotrópico e um detergente fraco. O tratamento dos corpos de inclusão utilizando o detergente N-lauroilsarcosina foi capaz de solubilizar a enzima, porém a mesma não apresentou atividade catalítica. Por outro lado, a solubilização do corpos de inclusão utilizando 3 M de cloridrato de guanidina se mostrou efetivo na desnaturação e solubilização da proteína, apresentando atividade catalítica após a renaturação da enzima para a sua forma nativa.

N-Lauroilsarcosina é um surfactante aniónico considerado um detergente fraco que potencialmente pode ser utilizado para a solubilização de agregados proteicos sem a necessidade da desnaturação da proteína de interesse. Como já descrito por Jevševar *et al.*, (2005) algumas proteínas recombinantes aprisionadas em corpos de inclusão podem ser recuperadas com o uso de 0,2% de volume de N-Lauroilsarcosina, podendo chegar a uma taxa de recuperação de 97%. Porém dependendo da natureza e forma dessas estruturas esse detergente fraco pode não ser efetivo como relatado por Peteruel *et al.*, (2008) onde foi observada uma baixa recuperação das proteínas testadas.

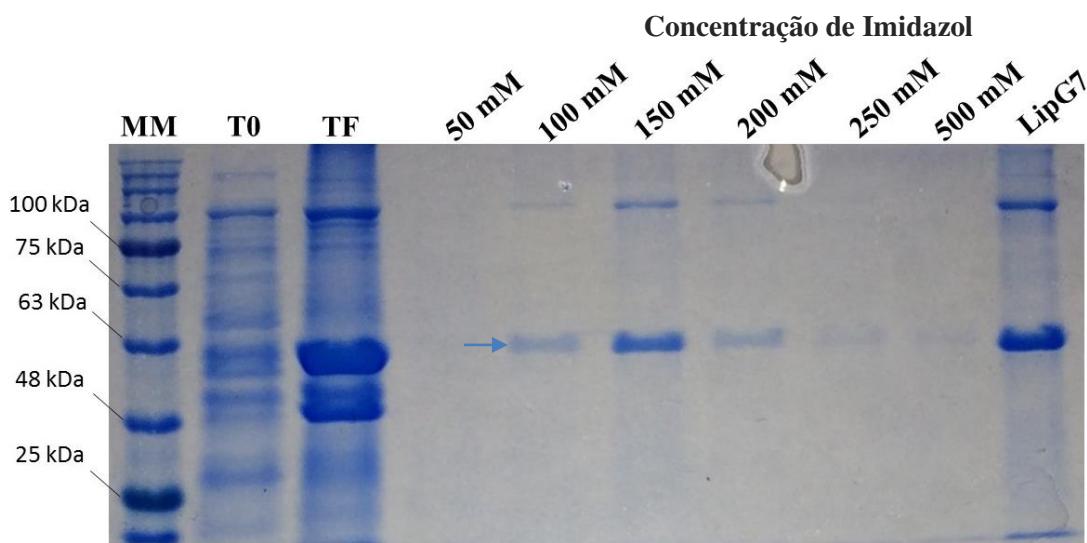
Cloridrato de guanidina é um agente caotrópico forte, útil para a desnaturação de proteínas e na solubilização de proteínas insolúveis na forma de corpos de inclusão. Essa substância é frequentemente usada como o primeiro passo no *refolding* de proteínas ou enzimas para sua forma ativa. Palmer e Wingfield, (2004) descreveram um protocolo de solubilização de proteínas de corpos de inclusão utilizando uma alta concentração de cloridrato de guanidina (3 M), essa extração é seguida de passos de purificação e retirada desse agente caotrópico direto da coluna cromatográfica para renaturação da proteína de interesse.

5.6. Purificação da LipG7

Após ressolubilização dos corpos de inclusão com cloridrato de guanidina a enzima foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Para avaliar a concentração ideal de imidazol as concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 mM foram utilizadas para eluição. Como resultado observamos em SDS-PAGE Laemmli que a concentração de 150 mM de imidazol possibilitou eluir grande parte da enzima (FIGURA 9) sem comprometer a sua atividade catalítica, tendo uma atividade específica de $216,3 \pm 16,4$ U/mg contra o substrato sintético 4-nitrofenil butirato a 30 °C, pH 7,2. Esse valor é superior aos encontrados em bibliotecas metagenômicas de outras amostras de outros solos como Jiménez *et al.* (2012b) e Kim *et al.*

(2006) que prospectaram novas esterases extremófilas com atividade específica de 0,142 U/mg e 63,7 U/mg, respectivamente.

FIGURA 9 – Resultado SDS PAGE Laemmli mostrando a eluição da proteína sob um gradiente de concentração de imidazol.



Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: MM: Marcador molecular, T0: Tempo inicial de indução, TF: tempo final de indução.

Já nas cepas BL21 e ArcticExpress não foram identificadas atividades lipolíticas mesmo depois do tratamento com cloridrato de guanidina e purificação. Essa diferença pode ser associada às modificações da linhagem Rosetta-gami que permitiram a produção da enzima em sua forma ativa mesmo estando em corpos de inclusão.

Apesar de a expressão heteróloga em *E. coli* apresentar capacidade limitada de modificações pós-traducionais e a ausência de alguns códons considerados raros, atualmente estão disponíveis várias linhagens modificadas para a expressão de diversos tipos de proteínas.

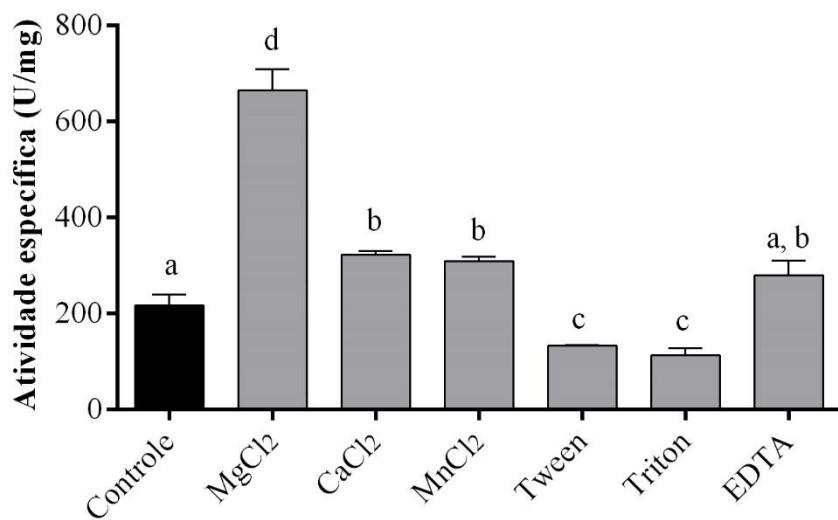
Como exemplos de linhagens modificadas podemos citar a *E. coli* BL21, essa cepa contém mutações em várias proteases citoplasmáticas que reduzem a taxa de proteólise da proteína de interesse resultando no acréscimo na produção de proteínas, outro exemplo é a linhagem ArcticExpress que é capaz de produzir a chaperonina Cpn60 e a co-chaperonina Cpn10 da bactéria psicrofílica *Oleispira antarctica*, onde ambas apresentam atividades para auxiliar o dobramento proteico em baixas temperaturas (4 a 12 °C) (FERRER *et al.*, 2004).

E. coli Rosetta-gami é derivada da junção das cepas Origami e Rossetta, portanto apresenta mutações em dois genes (*trxB*) e (*gor*) cuja ausência destes proporciona um ambiente citoplasmático menos redutor e consequentemente mais favorável para a formação de pontes dissulfeto, somando a isso essa linhagem também possui genes que codificam RNAs transportadores para os códons raros (FATHI-ROUDSARI *et al.*, 2016).

5.7. Efeitos da adição de íons bivalentes e detergentes na atividade da LipG7.

A atividade de esterases/lipases são freqüentemente afetadas por fatores como íons metálicos divalentes e surfactantes não iônicos (CHOI *et al.*, 2004; LIU; XU; HU, 2000). A adição de 0,5 mM dos íons Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Ca^{2+} promoveram um acréscimo significativo na atividade catalítica da LipG7, destacando-se o íon Mg^{2+} que promoveu um grande incremento na sua atividade catalítica. Os valores detectados no acréscimo de 0,5 mM de EDTA não apresentou diferença significativa em relação ao controle. Já a presença dos detergentes tween 80 e tritonX-100 diminuíram a atividade catalítica da enzima quase pela metade (FIGURA 10).

FIGURA 10 - Atividade relativa enzimática sob influência de íons bivalentes, detergentes e EDTA.



Fonte: Elaborada pelo autor

Em nosso estudo o incremento na atividade na presença de MgCl₂ indica que a ação catalítica da LipG7 pode ser estimulada pela ação de Mg²⁺. As lipases/esterases são conhecidas por não necessitarem de cofatores, porém muitas enzimas lipolíticas estimuladas por íons bivalentes já vêm sendo reportadas em muitos trabalhos. Gao *et al.* (2016) obtiveram uma nova esterase isolada a partir de uma biblioteca metagenômica de uma esponja marinha, que teve sua atividade estimulada pela adição do íon Ca²⁺ e a atividade afetada pelo EDTA, demonstrando sítios de ligação a íons na estrutura da proteína para a atividade catalítica. Choi *et al.*, (2004) relataram uma nova esterase de uma cepa de *Lactobacillus casei* que tinha sua atividade estimulada por Zn²⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ e inibida pelos íons Hg²⁺ e Ag⁺

A presença de sítios de ligação de íons na estrutura da proteína pode ser facilmente verificada com a adição de EDTA, pelo seu efeito quelante de íons. Salameh e Wiegel, (2007) tiveram uma lipase estimulada por Ca²⁺ com a atividade reduzida com 5 mM de EDTA e totalmente inibida com 10 mM de EDTA, demonstrando assim sítios de ligação de íons na sua estrutura importantes na sua atividade enzimática. Em nosso estudo utilizamos apenas 0,5 mM desse composto não tendo diferença significativa quando comparado ao controle, uma maior concentração talvez seja necessária para demonstrar o efeito de inibição pelo EDTA.

6. CONCLUSÃO

A prospecção funcional de uma biblioteca metagenômica de sedimentos de manguezal levou à descoberta de um clone produtor de uma esterase (LipG7). LipG7 compartilha 80% de identidade com a enzima 1,4-butanodiol diacrilato esterase, detectada no genoma da bactéria *Porticoccus hydrocarbonoclasticus*. LipG7 apresentou domínios conservados de β -lactamases, sendo agrupada na família VIII das carboxilesterases. O gene de LipG7 foi expresso em *E. coli* Rosetta-gami e teve sua atividade aumentada pela adição de Mg^{2+} . Mais estudos são necessários para caracterizar LipG7 e confirmar se é uma nova esterase.

7. BIBLIOGRAFIA

- AAKVIK, T. et al. Metagenomic Libraries for Functional Screening. **Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches**, n. May, p. 171–181, 2011.
- ADARIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–69, mar. 1995.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **The Biochemical journal**, v. 343 Pt 1, p. 177–83, 1 out. 1999.
- BELL, P. J. L. et al. Prospecting for novel lipase genes using PCR. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. Pt 8, p. 2283–91, ago. 2002.
- BIRNBOIM, H. C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. **Methods in enzymology**, v. 100, p. 243–55, 1983.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 73–81, 2002.
- CASTILLA, A. et al. A novel thermophilic and halophilic esterase from Janibacter sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 86–95, 2017.
- CHIEN, A.; EDGAR, D. B.; TRELA, J. M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. **Journal of Bacteriology**, v. 127, n. 3, p. 1550–1557, 1976.
- CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.
- CHOI, Y. J. et al. Characterization and Heterologous Gene Expression of a Novel Esterase from. **Society**, v. 70, n. 6, p. 3213–3221, 2004.
- CHRUNYK, B. A et al. Inclusion Body Formation and Protein Stability in Sequence Variants of Interleukin-lfl*. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 24, p. 18053–18061, 1993.
- 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**, v. 9, n. 1, p. 514–523, 2010.

- DE SANTI, C. et al. Characterization of a cold-active and salt tolerant esterase identified by functional screening of Arctic metagenomic libraries. **BMC biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 1, 2016.
- ESAKKIRAJ, P. et al. Purification and Characterization of Halophilic Alkaline Lipase from *Halobacillus* sp. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 86, n. 2, p. 309–314, 2016.
- FATHI-ROUDSARI, M.; AKHAVIAN-TEHRANI, A.; MAGHSOUDI, N. Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase. v. 8, n. 1, p. 16–22, 2016.
- FELSENSTEIN, J. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 39, n. 4, p. 783–791, jul. 1985.
- FERRER, M. et al. Functional consequences of single:double ring transitions in chaperonins: Life in the cold. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 167–182, 2004.
- FERRER, M.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P. N. Screening Metagenomic Libraries for Laccase Activities. In: [s.l: s.n.]. p. 189–202.
- FIRN, R. D. Bioprospecting—why is it so unrewarding? **Biodiversity and Conservation**, v. 12, n. 2, p. 207–216, 2003.
- FUJIWARA, S. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 518–525, 2002.
- GAO, W. et al. A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 41, 2016.
- GONG, B.-L. et al. Improvement of enzyme activity and soluble expression of an alkaline protease isolated from oil-polluted mud flat metagenome by random mutagenesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106, p. 97–105, 2017.
- GRÖGER, H.; HUMMEL, W. Combining the “two worlds” of chemocatalysis and biocatalysis towards multi-step one-pot processes in aqueous media. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 171–179, 2014.
- GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 1–21, 2011.
- GUTIERREZ, T. et al. Porticoccus hydrocarbonoclasticus sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium identified in laboratory cultures of marine phytoplankton. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 628–637, 2012.
- HANDELSMANL, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. [s.d.].
- HENNE, A. et al. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring

lipolytic activity on *Escherichia coli*. **ApplieHenne, A., Schmitz, R. A., Bömeke, M., Gottschalk, G., & Daniel, R. (2000). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 66(7), 3113–6.**, v. 66, n. 7, p. 3113–6, jul. 2000.

HOLGUIN, G. et al. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development—a case study. **Science of The Total Environment**, v. 363, n. 1–3, p. 260–274, 15 jun. 2006.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current opinion in microbiology**, v. 1, n. 3, p. 278–285, 1998.

JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–7, ago. 2002.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, set. 1998.

JEVŠEVAR, S. et al. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 2, p. 632–639, 2005.

JIMÉNEZ, D. J. et al. A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 361–370, 2012a.

JIMÉNEZ, D. J. et al. A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 361–370, 1 jan. 2012b.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts - The ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 503–517, 2013.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

KIM, Y. J. et al. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 2, p. 315–323, 2006.

KNIETSCH, A et al. Identification and characterization of genes encoding coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 6, p. 3048–3060, 2003.

KNOX, J. R.; MOEWS, P. C.; FRERE, J. M. Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. **Chemistry & biology**, v. 3, n. 11, p. 937–47, nov. 1996.

KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 365–378, 18 dez. 2013.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 15 ago. 1970.
- LAM, K. N. et al. Current and future resources for functional metagenomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–8, 2015.
- LEE, Y.-S. Isolation and Characterization of a Novel Cold-Adapted Esterase, MtEst45, from Microbulbifer thermotolerans DAU221. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2 mar. 2016.
- LIU, Y. Y.; XU, J. H.; HU, Y. Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 10, n. 5, p. 523–529, 2000.
- MADHAVAN, A.; SINDHU, R. Metagenome Analysis : a Powerful Tool for Enzyme Bioprospecting. 2017.
- MARUTHAMUTHU, M.; VAN ELSAS, J. D. Molecular cloning, expression, and characterization of four novel thermo-alkaliphilic enzymes retrieved from a metagenomic library. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 142, 2017.
- MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 7, p. 2764–2769, 1996.
- NOVOTOTSAYA-VLASOVA, K. et al. Expression and chaperone-assisted refolding of a new cold-active lipase from Psychrobacter cryohalolentis K5T. **Protein Expression and Purification**, v. 91, n. 1, p. 96–103, 2013.
- OLLIS, D. L. et al. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein engineering**, v. 5, n. 3, p. 197–211, abr. 1992.
- PACHECO, B. et al. A screening strategy for heterologous protein expression in Escherichia coli with the highest return of investment. **Protein Expression and Purification**, v. 81, n. 1, p. 33–41, 2012.
- PALMER, I.; WINGFIELD, P. T. Preparation and extraction of insoluble (Inclusion body) proteins from Escherichia coli. **Curr Protoc Protein Sci**, n. 8 M, p. 1–25, 2004.
- PANIZZON, J. P. et al. Microbial Diversity : Relevance and Relationship Between Environmental Conservation And Human Health. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 1, p. 137–145, 2015.
- PETERNEL, Š. et al. Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 34, 2008.
- QIN, Y.; HUANG, Z.; LIU, Z. A novel cold-active and salt-tolerant ??-amylase from marine bacterium Zunongwangia profunda: Molecular cloning, heterologous expression and biochemical characterization. **Extremophiles**, v. 18, n. 2, p. 271–281, 2014.

R. M. RAY, H. C. ALDRICH, A. C. WILKIE, L. O. INGRAM, K. T. S. AND; HEALY, F. G. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic.pdf. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 667–674, 1995.

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, set. 2005.

RASHAMUSE, K. et al. A novel family VIII carboxylesterase derived from a leachate metagenome library exhibits promiscuous ??-lactamase activity on nitrocefin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 491–500, 2009.

REEF, R.; FELLER, I. C.; LOVELOCK, C. E. Nutrition of mangroves. **Tree Physiology**, v. 30, n. 9, p. 1148–1160, 2010.

RIESENFIELD, C. S.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 981–989, 2004.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli : advances and challenges. v. 5, n. April, p. 1–17, 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–25, jul. 1987.

SALAMEH, M. A.; WIEGEL, J. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7725–7731, 2007.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: Past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153–1161, 2011.

SINGH, R. et al. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 6, p. 679–682, 2006.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.

SU, J. et al. A new alkaline lipase obtained from the metagenome of marine sponge *Ircinia* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 1093–1102, 2015.

THATOI, H. et al. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: A review. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2013.

WILLIAMS, J. D. Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors. **International journal of antimicrobial agents**, v. 12 Suppl 1, p. S3-7-7, ago. 1999.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: Concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 7, p. 1713–1731, 2006.

YANG, C. et al. Discovery of new cellulases from the metagenome by a metagenomics-guided strategy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 138, 2016.

YANG, H. et al. Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 23–29, 2014.

ZHANG, A. et al. Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 2–3, p. 78–84, 2009.

ZHANG, H. et al. Cloning, expression and characterization of a novel esterase from a South China Sea sediment metagenome. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 33, n. 4, p. 819–827, 2015.