



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I- CAMPINA GRANDE
CENTRO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

VITÓRIA ALMEIDA DE LIMA

**IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE UMA NOVA LIPASE A PARTIR DA
COMPOSTAGEM DE ARROZ VERMELHO**

**CAMPINA GRANDE
2018**

VITÓRIA ALMEIDA DE LIMA

**IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE UMA NOVA LIPASE A PARTIR DA
COMPOSTAGEM DE ARROZ VERMELHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Graduado em Ciências Biológicas.
Área de concentração: 20202008 Genética Molecular e de Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses.

**CAMPINA GRANDE
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

L732i Lima, Vitoria Almeida de.
Identificação e isolamento de uma nova lipase a partir da compostagem de arroz vermelho [manuscrito] / Vitoria Almeida de Lima. - 2018.
19 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.
"Orientação : Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses, Departamento de Biologia - CCBS."
1. Bioprospecção. 2. Enzima lipolítica. 3. Lipase. 4. Cultura do arroz. I. Título
21. ed. CDD 633.18

VITÓRIA ALMEIDA DE LIMA


IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE UMA NOVA LIPASE A PARTIR DA
COMPOSTAGEM DE ARROZ VERMELHO

Artigo apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Graduado em Ciências Biológicas.

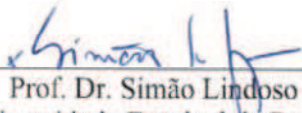
Área de concentração: 20202008 Genética Molecular e de Microrganismos.

Aprovada em: 14/11/18

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Maria José Silva de Lima
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Simão Lindoso de Souza
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Dedico este trabalho aos meus Pais Vicente Juvêncio de Almeida e Vera Lúcia Vieira de Lima Almeida com eterna gratidão e amor

Ao meu tio José Renato de Lima, com amor.

AGRADECIMENTOS

Muitos foram os que contribuíram de forma positiva durante essa jornada.

À maior de todas as energias, Deus. Desde o início da minha jornada acadêmica conspirando a meu favor; trazendo pessoas iluminadas para me ajudar e me acolher.

Aos meus pais, agradeço por toda motivação e incentivo desde o dia em que passei para o curso de Ciências Biológicas. Confesso que não estava muito animada devido às circunstâncias financeiras, mas vocês sempre fizeram o impossível para que eu chegasse até aqui. Agradeço o amor incondicional, paciência e confiança. Amo vocês!

Ao meu tio Zé, obrigada pela confiança por todos esses anos e toda ajuda. Saiba que serei eternamente grata por tudo, te amo.

Ao meu irmão, Vinícius Almeida, que sempre confiou em mim e me dava forças nos momentos difíceis. Te amo muito.

À minha amiga, Karla Simone, que me deu acolhimento nesta cidade e me ajudou a enfrentar os obstáculos acadêmicos.

Ao meu grande amigo e alma gêmea, Vinícius Souza, que me mostrou o verdadeiro valor da amizade e cumplicidade. Obrigada por ter me amparado nas horas de agonia, tanto na vida pessoal quanto na vida acadêmica. Confesso que você foi um dos maiores e melhores presentes que esta cidade me deu. Eu te amo, gratidão eterna.

À minha mãe Campinense, Dona Jaíra Albuquerque. Obrigada por todo amor e confiança depositados em mim. Serei eternamente grata por toda ajuda, por todo aconselhamento, por todo carinho e atenção. Saiba que serei eternamente grata por tudo! Te amo.

Às minhas amigas Larissa Lima, Simone Fernandes, Regina Coely e Nadja Melo, o meu muito obrigada por todos os conselhos, por todo companheirismo e todo carinho prestados durante esse tempo. Com vocês aprendi muito mais do que imaginam. Saibam que cada uma tem um espaço especial em meu coração.

À minha amiga Isabela Almeida, minha gratidão por proporcionar uma expansão de ideias/pensamentos/sentimentos em meu mundo; na forma de como encara a vida. Obrigada pelo companheirismo e por toda ajuda prestada de bom coração desde o início do curso até agora.

Às minhas primas/irmãs Tatiane Almeida e Talita Almeida por me ajudarem em momentos estressantes de trabalhos acadêmicos e me darem apoio emocional mesmo que há quilômetros de distância. Amo vocês!!!

Aos professores Simão Lindoso e Walclécio Lira que me deram credibilidade para participar de vossas pesquisas. Gratidão, aprendi muito com vocês.

Ao meu professor e orientador Carlos Henrique Meneses, obrigada pela confiança depositada em mim e pela amizade construída. Saiba que serei eternamente grata por todas as oportunidades que me foram dadas.

Ao meu companheiro Jorge Vasconcelos, por surgir em meu mundo num momento em que eu mais precisava e, em meio aos percalços, me dar motivos para sorrir. Obrigada por toda força, me espelho em você.

Por fim, à banca examinadora deste trabalho, professores Simão Lindoso e Maria José Lima, por suas contribuições.

SUMÁRIO

RESUMO	7
1 INTRODUÇÃO	7
2 MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 Obtenção do substrato para análise	9
2.2 Avaliação das amostras vegetais	9
2.3 Extração de DNA metagenômico	9
2.4 Purificação de DNA metagenômico	9
2.5 Construção da biblioteca metagenômica	10
2.5.1 <i>Reparo dos fragmentos para clonagem em vetor fosmídeo</i>	10
2.5.2 <i>Seleção do tamanho dos insertos</i>	11
2.5.3 <i>Reação de ligação dos insertos no vetor fosmídeo</i>	12
2.5.4 <i>Reação de empacotamento</i>	12
2.5.5 <i>Infecção das células EPI300-T1R</i>	12
2.6 Seleção de clones com atividades enzimáticas	13
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4 CONCLUSÃO	17
ABSTRACT	17
REFERÊNCIAS	17

IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE UMA NOVA LIPASE A PARTIR DA COMPOSTAGEM DE ARROZ VERMELHO

Vitória Almeida de Lima*

RESUMO

Lipases apresentam ampla importância na indústria de produção de biodiesel, detergentes e biorremediação de resíduos industriais de origem lipídica. A compostagem de arroz vermelho é promovida pela propagação de atividades microbiológicas, pois esta planta possui celulose, hemicelulose e material lignocelulósico como seus principais constituintes orgânicos. Utilizando-se prospecção metagenômica para identificação de novos genes de amostras ambientais, este estudo tem como escopo identificar e isolar uma nova lipase metagenômica a partir do arroz vermelho coletado em Santana dos Garrotes/PB. O experimento incluiu extração de DNA metagenômico do substrato utilizado com 30 dias de compostagem usando Meta-G-Nome™ Kit e construção de uma biblioteca metagenômica com fragmentos de DNA variando de 2-10 kb usando *Escherichia coli* EPI-300 como hospedeiro. A seleção do clone metagenômico que apresentou atividade lipolítica foi realizada em meio de cultura sólido (LB-agar) contendo 1% de tributirina. O pirosequenciamento do fragmento de DNA metagenômico foi realizado pela Macrogen (sistema 454 GS FLX Titanium). Dos dez mil clones analisados, a triagem funcional da biblioteca metagenômica mostrou um com atividade lipolítica (LipRR01) e a maior identidade proteica (51%) foi observada com uma lipase de biomassa. A comparação desta lipase com outras sequências de lipase depositadas na base de dados da NCBI permitiu a identificação de motivos de aminoácidos conservados na família da lipase V e resultou na sua classificação para uma família lipase/esterase. Em síntese, a prospecção metagenômica a partir da compostagem de arroz vermelho foi eficiente para detecção de uma enzima lipolítica ativa com potencial aplicação biotecnológica.

Palavras-Chave: Bioprospecção. Arroz vermelho. Enzima lipolítica.

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia se baseia na procura e utilização de sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para suprir as necessidades do homem. O interesse na utilização de enzimas e moléculas bioativas na indústria no lugar de catalisadores químicos tem relação à sua biodegradabilidade e a crescente importância da questão ambiental em todos os segmentos (COUTO, 2009).

O ambiente é considerado um importante reservatório da diversidade genética microbiana, entretanto, apenas uma pequena parcela desta diversidade é conhecida (SÁBER, 2015). Os microrganismos são os responsáveis por direcionarem os principais ciclos biogeoquímicos e por isso desempenham funções ecológicas que os tornam indispensáveis, como por exemplo, sua participação no ciclo do carbono (ROBE *et al.*, 2003; SÁBER, 2015).

* Aluna de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – *campus* I.
Email: vitoria.almda@gmail.com

Culturas puras de microrganismos têm sido empregadas há mais de 100 anos em bioprocessos, e mesmo com o passar do tempo sua importância econômica continua a ser enorme. As reações catalisadas por estes organismos possuem um elevado valor agregado na indústria química (≈€ 10 bilhões) sendo que nos próximos 10-15 anos estima-se que 60% do segmento da química fina seja baseada nas conversões microbianas (LYND *et al.*, 2008).

Com o desenvolvimento nas técnicas de cultivo puro, os microrganismos puderam ser estudados individualmente e caracterizados, principalmente, por critérios nutricionais. Entretanto, a utilização da abordagem deste tipo de cultivo, limita as avaliações taxonômicas e filogenéticas de alguns microrganismos, uma vez que, os organismos cultivados representam apenas uma fração pequena da diversidade de espécies em comunidades microbianas (DIMITROV, 2009; GARCIA, 2014; HENNE *et al.*, 2000).

Progressos nos estudos voltados a ecologia microbiana molecular têm proporcionado à base científica, o desenvolvimento de novas abordagens para o conhecimento genético e metabólico dos microrganismos presentes no ambiente sem a necessidade de cultivá-los. Nesta perspectiva, a metagenômica surge como a melhor ferramenta de prospecção para revolucionar o campo da biotecnologia permitindo constituir uma abordagem para o acesso da diversidade microbiana. Esta inovação traz consigo uma ampla possibilidade na descoberta de novos genes, enzimas e compostos químicos (DIMITROV, 2009; FAORO, 2010; LORENZ *et al.*, 2002).

Os microrganismos, além de desempenharem papéis essenciais na natureza, participam de processos, como a compostagem, que proporciona um destino final útil e de forma sustentável aos compostos orgânicos gerados pelas atividades industriais, comerciais e agrícolas.

Restos culturais do arroz, bem como sua palha, são bastante utilizados em processos de compostagem, pois apresentam como principais constituintes orgânicos a celulose, a hemicelulose e a lignina, compostos estes de difícil decomposição, mas que se tornam facilmente degradados por grupos microbianos presentes no solo (MUSSATTO e ROBERTO, 2004; RODRIGUES, 2006).

Desta forma, com a utilização de catalisadores biológicos aliados a técnicas de análise molecular, o presente trabalho buscou caracterizar uma nova lipase com interesse biotecnológico que possa ser aplicada em procedimentos industriais visando a redução de custos e a sustentabilidade ambiental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do substrato para análise

As plantas de arroz vermelho (partes verdes e restos culturais) foram coletadas no município de Santana dos Garrotes – PB.

Após a obtenção do material vegetal para estudo, o experimento de compostagem foi montado no Viveiro Florestal da Universidade Estadual da Paraíba (Campina Grande – PB). A construção de bibliotecas metagenômicas bem como as análises das atividades enzimáticas previstas foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual da Paraíba.

2.2 Avaliação das amostras vegetais

O arroz vermelho foi fragmentado em pedaços de 3,0 cm utilizando-se picadeira mecânica. As pilhas tiveram as seguintes dimensões: 1,5 m de largura, 2,0 m de comprimento e 1,2 m de altura. Foram montadas sobre lona plástica, visando evitar seu contato com o solo.

A coleta de 10 (dez) amostras para análise foi realizada a partir da incubação das pilhas 30 dias após o início do processo (DAIP) de compostagem, tendo como base os resultados obtidos por Leal (2006). As amostras empregadas na construção das bibliotecas metagenômicas foram congeladas em nitrogênio líquido (N₂).

2.3 Extração de DNA metagenômico

O DNA metagenômico foi extraído de compostos coletados pelo método de lise direta com auxílio do kit Meta-G-Nome™, segundo as recomendações do fabricante. Após estes procedimentos, o DNA extraído das 10 amostras foi misturado para se obter apenas um tubo contendo todo material extraído.

2.4 Purificação de DNA metagenômico

A purificação do extrato bruto de DNA foi realizada em uma única etapa empregando colunas CHROMA SPINTM+TE-1000 (BD Biosciences Clontech, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez purificado, o DNA metagenômico foi quantificado por fluorimetria (por meio de Quibit 3.0) e, também, avaliado quanto a sua pureza a partir da razão entre as leituras obtidas em espectrofotômetro a 260 e 280 nm.

2.5 Construção da biblioteca metagenômica

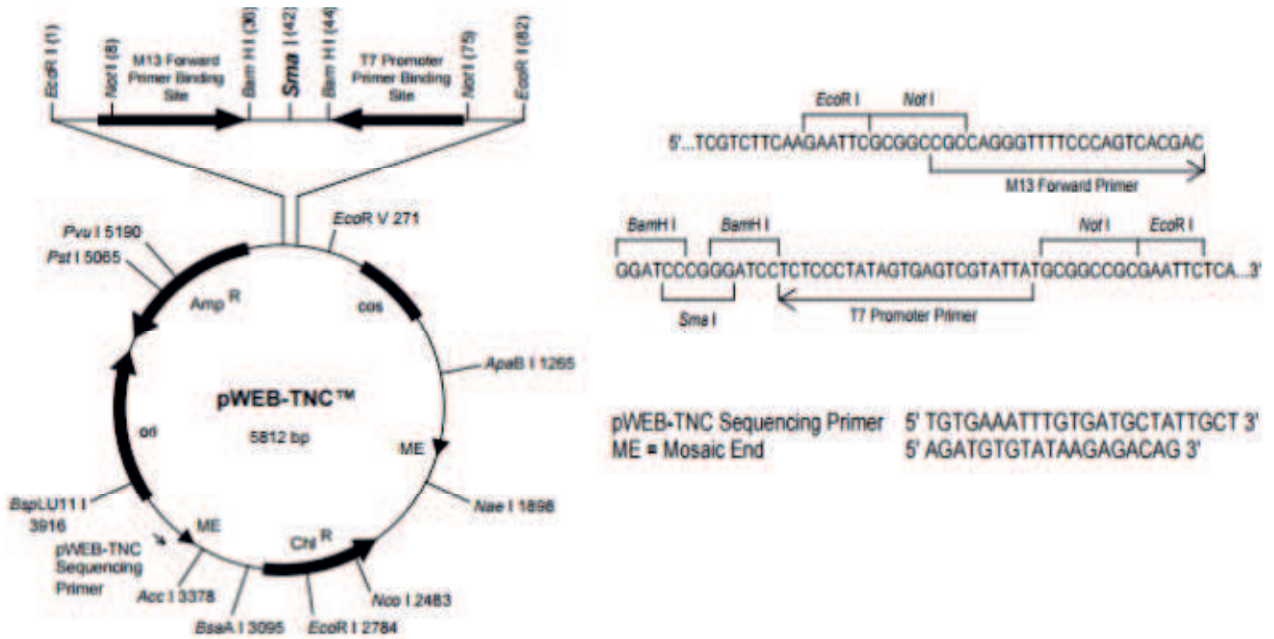
O preparo da biblioteca metagenômica prevista foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual da Paraíba. A mesma foi construída empregando o kit *CopyControl*TM Fosmid Library (Epicentre, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA metagenômico isolado da compostagem de arroz vermelho foi quebrado por passagens sucessivas do mesmo por ponteiros de 200 μ l. Cerca de 20 μ g do DNA quebrado foram reparados.

2.5.1 Reparo dos fragmentos para clonagem em vetor fosmídeo

A reação de reparo das extremidades do DNA metagenômico foi realizada, possibilitando assim a ligação ao vetor fosmídeo pWEB-TNC, que vem aberto no sítio de restrição da enzima *Sma*I, ao DNA metagenômico (Figura 01).

Figura 01. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor.



Fonte: FARIAS, 2016.

O DNA purificado teve suas extremidades reparadas com a enzima T4 DNA polimerase e T4 polinucleótido-quinase para gerar extremidades cegas.

Para tanto, na reação de polimerização foi utilizado: 1,5 μ g de DNA metagenômico, 1x tampão NEB2 (Biolabs), 0,5 mM de dNTPs, 2 U de enzima T4 DNA Polimerase (Biolabs) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 80 μ L. A reação foi mantida a 12 °C por

30 min e logo após a 75 °C por 20 min, em termociclador, para inativação da enzima. Na reação de fosforilação, foi adicionado ao mesmo tubo da reação anterior: 1x tampão da quinase (Biolabs), 2 mM de ATP, 10 U de T4 Polinucleotídeo quinase (Biolabs) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 90 µL. A reação foi incubada por 10 min a 37 °C e, para inativação da enzima, foi mantida a 65 °C por mais 10 min.

Para a ocorrência da ligação inserto/vetor fosmídeo foi utilizado o seguinte protocolo: a reação foi mantida novamente a 12 °C por 30 min e logo após a 75 °C por 20 min, em termociclador, para inativação da enzima. Na reação de fosforilação, foi adicionado ao mesmo tubo da reação anterior: 1x tampão da quinase (Biolabs), 2 mM de ATP, 10 U de T4 Polinucleotídeo quinase (Biolabs) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 90 µL. A reação foi incubada por 10 min a 37 °C e, para inativação da enzima, foi mantida a 65 °C por mais 10 min.

2.5.2 Seleção do tamanho dos insertos

Os fragmentos de DNA metagenômico entre 20 e 10000 bp foram recuperados em gel e posteriormente ligados ao vetor de fosmídeo pWEB::TNC que foi linearizado no sítio único *SmaI* e desfosforilado (com auxílio de enzima rSAP, *Shrimp Alkaline Phosphatase*), procedimento que será descrito mais abaixo.

Para verificação do tamanho dos insertos de interesse contidos nos plasmídeos foi realizada uma reação de polimerização em cadeia (PCR) a partir de iniciadores disponíveis no kit pWEN::TNC: M13- (5'-TGTGAAATTTGTGATGCTATTGCT-3') e T7 (5'-AGATGTGTATAAGAGACAG-3'). As condições empregadas nas reações de PCR foram: 5 min a 95°C, desnaturação; 1 min a 95°C, desnaturação; 1 min a 60°C, anelamento; 2 min a 72°C, polimerização; voltar a segunda etapa 29 vezes; depois, 5 min a 72°C, polimerização e, finalmente, 4°C. A reação foi constituída de 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoribonucleotídeos (dNTP), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, tampão para *Taq* DNA polimerase 1X (1 mM de Tris-HCl, pH 9,0 e 5 mM de KCl) (Invitrogen), 10 µM de cada iniciador e 200 ng de DNA total.

A seleção do tamanho do DNA foi feita através de eletroforese preparativa em gel de agarose 1%, isento de brometo de etídio. A cuba de eletroforese foi previamente descontaminada com exposição à luz UV por 20 minutos. Nos poços do gel, foram aplicados uma alíquota do marcador de tamanho molecular 36Kb "T7 control DNA" (EPICENTRE) bem como as amostras do DNA metagenômico extraído e purificado. A eletroforese foi

conduzida em tampão TAE 1X (40 mM Tris- Acetato, 1 mM EDTA) à voltagem constante de 30 V por 15 horas.

Após a eletroforese, foi realizado um corte vertical no gel de agarose resultando em duas porções de gel, uma contendo os insertos a serem recuperados, e outra com o marcador e a amostra comparativa para corar. A porção do gel que continha o marcador foi corada com brometo de etídio e observada sob luz UV em um transiluminador.

O padrão de bandeamento serviu como guia para obtenção dos insertos na porção não corada do gel, colocando-se as duas partes do gel lado a lado. A região do gel contendo insertos de tamanho desejado, em torno de 2-10 Kb foi marcada e cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositada em tubos de 1,5 mL, com aproximadamente 400 mg de gel/tubo. Os pedaços de agarose que continham o DNA de tamanho selecionado foram armazenados a 4 °C até o momento da eluição.

2.5.3 Reação de ligação dos insertos no vetor fosmídeo

A ligação foi efetuada se mantendo uma relação de concentração entre insertos de DNA metagenômico e vetor, na proporção [1:10], respectivamente. Para o cálculo da razão molar utilizou-se a fórmula a seguir, onde m_i = massa do inserto, T_i = tamanho do inserto, m_v = massa do vetor e T_v = tamanho do vetor.

$$m_i = \frac{T_i \cdot m_v}{10 \cdot T_v}$$

2.5.4 Reação de empacotamento

Foi retirado do freezer (-80 °C) o extrato de empacotamento, mantendo este no gelo por 5 minutos. Ao material ligado foi adicionado 25 µL de extrato de empacotamento. As amostras foram agitadas cuidadosamente e incubadas a 30 °C por 90 minutos. Após esse período, foram adicionados mais 25 µL do extrato de empacotamento e novamente a reação foi incubada a 30 °C por mais 90 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de tampão de diluição de fagos [10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂] e 25 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados por inversão e estocados a 4 °C.

2.5.5 Infecção das células EPI300-T1R

Cada 10 µL da solução com os fosmídeos empacotados foi misturado, em condições estéreis, a uma alíquota de 100 µL de células EPI300-T1R, previamente preparadas. Os tubos foram levemente agitados e incubados em banho-maria a 37 °C, por 20 minutos. Após esse

período, os 110 µL de cada um dos tubos foi aplicado em placa contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani), adicionado de cloranfenicol (12,5 µg/mL). As placas foram incubadas durante 16 horas em uma estufa B.O.D a 37 °C.

Após a incubação das placas que receberam os clones transformantes, as colônias presentes nas placas foram coletadas. Os clones transformados foram repicados para serem adicionados em placas estéreis de poliestireno (96 “well assay plate”, 250 µL) contendo 125 µL de meio LB acrescido de 12,5 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. por 22 horas. Após esse período, foram adicionados 125 µL de solução de glicerol 40% (v/v). As placas foram estocadas à -80 °C.

2.6 Seleção de clones com atividades enzimáticas

Uma seleção inicial foi realizada de modo a avaliar diferentes atividades enzimáticas. Para tal, os clones obtidos da biblioteca metagenômica foram plaqueados com auxílio de replicador de 96 pinos em meios específicos para cada ensaio suplementados com 12,5 mg/L do antibiótico cloranfenicol e, incubados à 30 °C por um período de 2 a 5 dias de acordo com o ensaio em questão.

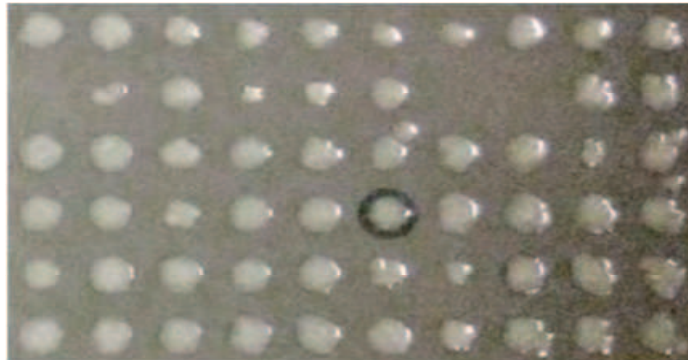
Para a determinação da atividade lipolítica, os clones da biblioteca metagenômica foram cultivados em meio LB sólido contendo Tributirina. Após o crescimento, durante 5 dias, as placas foram analisadas para a detecção da atividade lipolítica. A atividade lipolítica foi evidente com o aparecimento de halo translúcido circundado uma das culturas microbianas.

As ferramentas InterProScan (análise para reconhecimento de domínios proteicos conservados) (JONES *et al.*, 2014) e Pfam (banco de dados com ampla coleção de famílias proteicas) (FINN *et al.*, 2016) foram utilizadas na identificação de domínios conservados nas sequências proteicas estudadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos dez mil clones analisados, a triagem funcional da biblioteca metagenômica revelou uma enzima com atividade lipolítica (LipRR01) (Figura 02), e sua sequência foi depositada no GenBank do NCBI com número provisório de acesso LP552382 (Figura 03).

Figura 02. Placa de Tributirina. Enzima com atividade lipolítica LipRR01.



Fonte: Vitoria Almeida de Lima

Figura 03. Sequência da enzima LipRR01 caracterizada

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5          15          25          35          45          55
MTWPLILCHC LAKFEAINE CIEVENNEEP ELDNLHYFKG IRTMLKQKGY IVYHSNVAWA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      65          75          85          95          105         115
AGVEKRAEEL KENIILKILNE TKTEKVNLLA HSMGGLDARH MMFNDNRNDDD IHQRIASLTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     125         135         145         155         165         175
ISTPHEGSPF CDWALENLTP LHVVLQRICI ELNCIREIHT EAAHVFTMYA EITDYRACTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     185         195         205         215         225         235
AHHMNPYAG RTCAIFHCGA TNFSNEFMFE IIRKAEGEND GMVSVRSATW RDEYFKGTLD

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     245         255         265         275
KTDHLNEMGW WAPDQLLAAE SPDELLARIH SFYAGIAEQL P

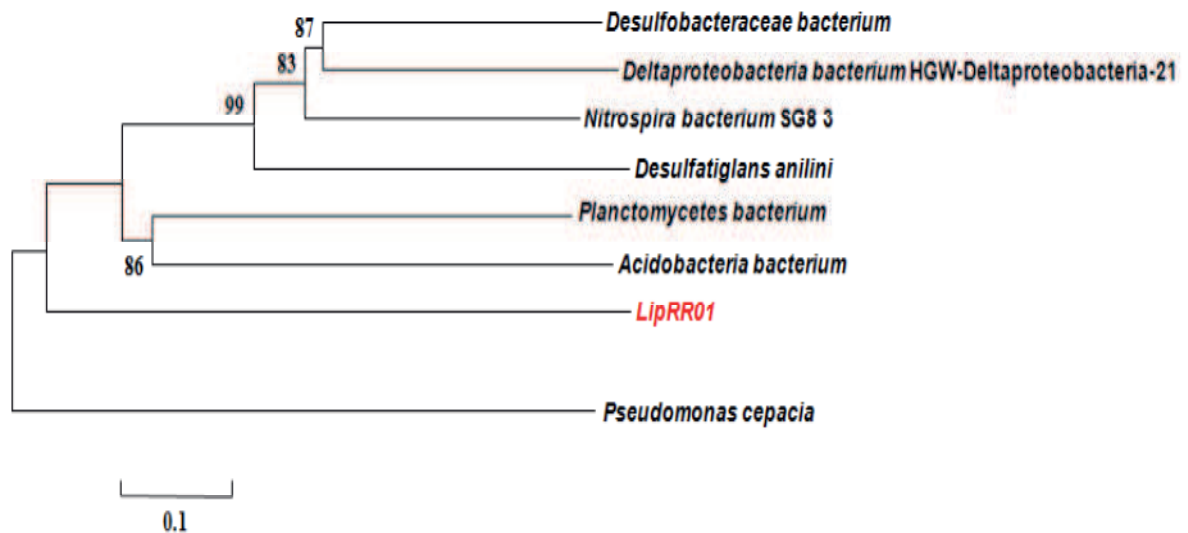
```

Fonte: Vitoria Almeida de Lima

Essa enzima lipolítica apresentou a maior identidade proteica com 51% dentre os analisados. Isto se confirmou pela análise filogenética que a caracterizou como uma lipase de biomassa (Figura 04). LipRR01 não se relaciona com *Pseudomonas cepacia*, bactéria utilizada como controle negativo para esta análise, embora se aproxime filogeneticamente de outros grupos bacterianos que apresentam atividade lipolítica. A comparação desta lipase com outras sequências de lipase depositadas na base de dados da NCBI permitiu a identificação de

motivos de aminoácidos conservados na família da lipase V e resultou na sua classificação para uma família lipase/esterase.

Figura 04. Árvore filogenética que caracteriza a lipase em uma lipase de biomassa.



Fonte: Vitoria Almeida de Lima

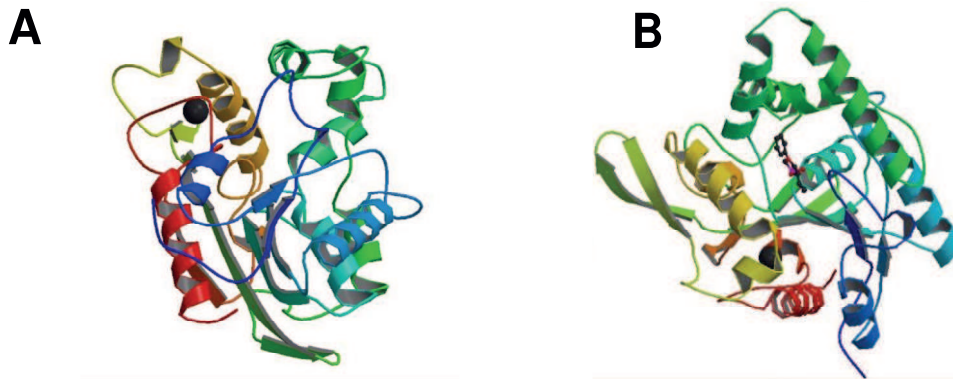
As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas lipolíticas encontradas em animais, plantas e microrganismos, incluindo fungos e bactérias. São capazes de produzir compostos como ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol através da quebra de triglicerídeos. Além disso, apresentam papel importante na transferência de lipídeos entre organismos e na deposição e mobilização de ácidos graxos como reserva energética (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Definidas como enzimas que catalisam a hidrólise ou síntese de acilgliceróis de cadeia longa (acima de 14 átomos de carbono), as lipases também podem hidrolisar gliceróis ésteres de cadeia curta (menor que 10 átomos de carbono) dependendo das condições, sendo a hidrólise destes substratos uma atividade característica de esterases (JENSEN, 1983).

As lipases extracelulares desempenham vários papéis importantes aos microrganismos que as secretam, entre eles as interações sinérgicas com outras enzimas, adesão às células e tecidos hospedeiros, iniciação do processo inflamatório, defesa através da lise da microflora no processo competitivo, dentre outras funções (SCHALLER *et al.*, 2005).

Dada sua importância, foi realizada a modelagem tridimensional por homologia desta sequência usando o molde 1CVL depositado no PDB da bactéria *Chromobacterium viscosum* (Figura 05A) (LANG *et al.*, 1996; BERMAN *et al.*, 2000).

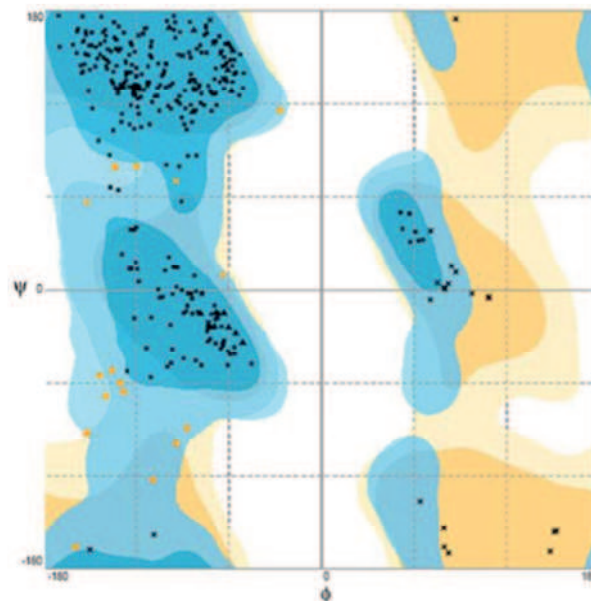
Figura 05. Modelagem por homologia – A) molde 1CVL de *Chromobacterium viscosum*; B) modelo construído por homologia para LlpRR01



Fonte: Vitoria Almeida de Lima; LANG et al, 1996 e BERMAN et al, 2000

O modelo acima foi analisado de acordo com gráfico de Ramachandran (Figura 06) (RAMACHANDRAN e SASISEKHARAN, 1968) mostrando assim que a visualização tridimensional da enzima lipolítica construída melhor representa sua funcionalidade. O gráfico de Ramachandran é particularmente útil porque ele define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis e orienta a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas.

Figura 06. Gráfico de Ramachandran. A região mais favorável está expressa em azul, a região permitida está em amarelo, a região generosamente permitida em amarelo claro e a não permitida em branco. As regiões azuis no canto superior esquerdo, no centro esquerdo e no centro direito representam as formações de folhas β paralelas e anti-paralelas, hélices- α à direita e hélices- α à esquerda respectivamente.



Fonte: RAMACHANDRAN e SASISEKHARAN, 1968.

4 CONCLUSÃO

A utilização de uma biblioteca metagenômica para rastrear enzimas, sendo a mesma construída a partir de amostras de DNA isolados de restos de arroz vermelho, mostrou uma eficiente abordagem funcional. Em conclusão, a prospecção metagenômica demonstrou a presença de uma enzima lipolítica ativa com potencial de aplicação biotecnológica na compostagem de arroz vermelho.

IDENTIFICATION AND ISOLATION OF A NEW LIPASE FROM RED RICE COMPOSTING

Vitória Almeida de Lima

ABSTRACT

Lipases are of great importance in the production of biodiesel, detergents and bioremediation of industrial residues of lipid origin. Red rice composting acts on the propagation of microbiological activities, as this plant has cellulose, hemicellulose and lignocellulosic material as its main organic constituents. Using metagenomic prospecting to identify new genes from environmental samples, this study aims to identify and isolate a new metagenomic lipase from the red rice collected in Santana dos Garrotes/PB. The experiment included extraction of metagenomic DNA from the used substrate with 30 days of composting using Meta-G-Name™ Kit and construction of a metagenomic library with DNA fragments ranging from 2-10 kb using *Escherichia coli* EPI-300 as host. The selection of the metagenomic clone that presented lipolytic activity was performed in solid culture medium (LB-agar) containing 1% tributyrin. The pyrosequencing of the metagenomic DNA fragment with lipolytic activity was performed by Macrogen (454 GS FLX Titanium system). From the ten thousand clones analyzed, functional screening of the metagenomic library showed a lipolytic activity (LipRR01) and the highest protein identity (51%) was observed with a biomass lipase. Comparison of this lipase with other lipase sequences deposited in the NCBI's database allowed the identification of conserved amino acid motifs in the lipase V family and resulted in its classification into a lipase/esterase family. In summary, metagenomic prospecting from red rice composting was efficient for the detection of an active lipolytic enzyme with potential biotechnological application.

Keywords: Bioprospecting. Red rice. Lipolytic enzyme.

REFERÊNCIAS

BERMAN, H.M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, 28: 235-242, 2000

COUTO, G.H. **Caracterização de uma nova lipase isolada de uma biblioteca metagenômica do solo de mangue do Pontal do Sul – PR**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DIMITROV, M. R. **Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidrocalcanoatos**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FAORO, H. **Prospecção metagenômica de biocatalisadores da microbiota de solos da Floresta Atlântica Paranaense**. 2010. 234 f. Tese (Doutor em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

FARIAS, N.C. **Identificação de uma nova fitase bacteriana através de prospecção metagenômica**. 2016. 70f. Dissertação (Mestre em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

FINN, R.D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. 279-285, 2016.

GARCIA, A. M. **Expressão heteróloga e modelagem de uma enzima lipolítica utilizando a abordagem metagenômica**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

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

JENSEN, R. G. **Detection and determination of lipase (acylglycerol hidrolase) activity from various sources**. *Lipids*. v.18, p.650-657. 1983.

JONES, P. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, 2014.

LANG, D. et al. Crystal structure of a bacterial lipase from Chromobacterium viscosum ATCC 6918 refined at 1.6 angstroms resolution. **J.Mol.Biol.** v. 259, p. 704-717, 1996.

LEAL, M.A.A. **Produção e eficiência agrônômica de compostos obtidos com palhada de gramínea e leguminosa para o cultivo de hortaliças orgânicas**. 2006. 133 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

LORENZ, P. e SCHLPER, C. Metagenome – a challenging source of enzyme discovery. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 19-20, p. 13-19, 2002.

LYND, L. R. et al. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 169-172, 2008.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.1, p.94-100, 2004.

RAMACHANDRAN, G. N. SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Adv. Prot. Chem**, v.23, p.283-300, 1968.

ROBE, P. et al. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, p. 183-190, 2003.

RODRIGUES, K. **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos**. 2006. 129 f. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SÁBER, M. L. **Expressão heteróloga de celulases por biblioteca metagenômica do solo da Caatinga**. 2015. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v.48, n.6, p.365-377, 2005.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v.9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.