

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA
LIPASE ISOLADA DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA
DE TERRA PRETA DE ÍNDIO

EDSON JÚNIOR DO CARMO

MANAUS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EDSON JÚNIOR DO CARMO

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA
LIPASE ISOLADA DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA
DE TERRA PRETA DE ÍNDIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para a obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

ORIENTADOR: PROF. Dr. SPARTACO ASTOLFI FILHO

MANAUS

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Carmo, Edson Júnior do

C287c Clonagem e caracterização enzimática de uma lipase isolada de uma biblioteca metagenômica de terra preta de índio / Edson Júnior do Carmo. 2017
152 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Lipase. 2. *Pichia pastoris*. 3. Biblioteca metagenômica. 4.
Enzimologia. I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

EDSON JÚNIOR DO CARMO

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA
LIPASE ISOLADA DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA
DE TERRA PRETA DE ÍNDIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovação em 05 de abril de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, Presidente (Orientador)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. José Odair Pereira, Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Profª. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza, Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Profª. Dra. Sandra Patrícia Zanotto, Membro
Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA

Profª. Dra. Alessandra Karisa Costa Lima do Nascimento, Membro
Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA

Dedico os frutos deste trabalho a todos que comigo
compartilharam a aspiração desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, ao Instituto de Ciências Biológicas representando a Universidade Federal de Amazonas pelo apoio Institucional. À Divisão de Biotecnologia do Centro de Apoio Multi-Institucional/CAM/UFAM pela oportunidade em desenvolver, não apenas este projeto, mas vários outros em paralelo. À CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudos.

Agradeço imensamente o Professor Spartaco Astolfi Filho, orientador no projeto de mestrado e doutorado, pelos direcionamentos que agora me fazem doutor, pesquisador e docente, pela disponibilização das estruturas laboratoriais, por me mostrar os caminhos da biotecnologia, docência com muito apreço e seriedade.

Ao apoio humano caloroso dos integrantes dos laboratórios do CAM/UFAM por tornar o ambiente de trabalho salubre e amigável.

Aos docentes da Universidade Federal do Amazonas pela transmissão de conhecimentos valiosos e aos queridos alunos pela companhia agradável no laboratório.

Aos professores membros da Banca Avaliadora do exame de qualificação e da defesa da tese.

À minha família e aos amigos pelo carinho, confiança, esperança, pela companhia afável e apoio amoroso que sempre me fortificam.

A todos serei sempre grato, muito obrigado!!!!

... necessário, somente o necessário, o extraordinário é demais...

Mogli

RESUMO

O avanço das tecnologias moleculares no campo científico, possibilitou o desenvolvimento de diversas formas de acesso ao material genético dos organismos, de forma a ser possível localizar, mapear, isolar, caracterizar e decodificar os genes alvo de um indivíduo particular ou de um conjunto de indivíduos coexistentes em um ambiente específico. Estudos metagenômicos são bastante promissores em diversas áreas da biotecnologia, como nas descobertas de novas moléculas de interesse biotecnológico industrial, na investigação de novos antibióticos e fármacos, na biorremediação de ambientes impactados com metais tóxicos e na prospecção de enzimas diversas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar enzimaticamente uma enzima lipase previamente rastreada de uma Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio. A sequência correspondente ao gene de lipase foi isolada da biblioteca metagenômica, clonada e expressada em *Pichia pastoris* sob controle do promotor PGK. A lipase recombinante foi caracterizada pela atividade de hidrólise de substratos lipídicos e capacidade de síntese em solvente orgânico. Análises *in silico* da sequência proteica inferem a identificação de uma lipase extracelular pertencente à família das lipases, superfamília α/β -hidrolase e com função molecular para atividade lipásica. A enzima foi produzida eficientemente em *P. pastoris* e a lipase recombinante apresentou atividade de 374,59 U/mL hidrolisando p-nitrofenil palmitato, $V_{max(ap.)}$ 143,4 U/mL.min⁻¹, $K_{m(ap.)}$ 1,4 mM e $K_{cat(ap.)}$ 103,7 S⁻¹. A enzima possuiu atividade máxima em pH 8,0, temperatura 90 °C e se manteve estável em altas temperaturas. A capacidade de síntese foi avaliada pela formação de laurato de etila pela reação de esterificação do ácido láurico com etanol apresentando rendimento de 70% em 45 minutos de reação. A proteína recombinante se caracteriza como uma enzima alcalina, termotolerante, ativada por cálcio, EDTA e detergentes.

Palavras chave: metagenômica funcional, lipase, termoestabilidade, *P. pastoris*

ABSTRACT

The advancement of molecular technologies in the scientific field has enabled the development of various forms of access to the genetic material of organisms in order to locate, map, isolate, characterize and decode the target genes of a particular individual or a set of individuals coexisting in a specific environment. Metagenomic studies are very promising in several areas of biotechnology, such as the discovery of new molecules of industrial biotechnological interest, the investigation of new antibiotics and drugs, the bioremediation of environments impacted with toxic metals and the prospection of various enzymes. The objective of this work was characterize enzymatically a previously screened lipase enzyme from Metagenomic Library of Terra Preta de Índio. Lipase gene sequence was isolated from the metagenomic library and expressed in *Pichia pastoris* under control of PGK promoter. Recombinant lipase was characterized by hydrolysis activity of lipid substrates and synthesis ability in organic solvent. *In silico* analyzes infer the identification of extracellular lipase belonging to the lipase family, superfamily α/β -hydrolase and lipase activity molecular function. Enzyme was efficiently produced in *P. pastoris* and recombinant lipase showed activity of 374.59 U/mL hydrolyzing p-nitrophenyl palmitate, V_{max} (ap.) 143,4 U/mL.min⁻¹, K_m (ap.) 1,4 mM and K_{cat} (ap.) 103,7 S⁻¹. Enzyme had maximum activity at pH 8.0, temperature 90 °C and remained stable at high temperatures. Synthesis ability was evaluated by the formation of ethyl laurate by esterification reaction of lauric acid with ethanol, yielding 70% conversion in 45 minutes. Recombinant protein is characterized as an alkaline, thermotolerant, activated by calcium, EDTA e detergents.

Key words: functional metagenomic, thermostability, lipase, *P. pastoris*

Lista de acrônimos e significados

TPI= Terra Preta de Índio

ORF = Open Reading Frame

BMP= Braziliam Microbiome Project

EMP=Earth Microbiome Project

α -ARHD = Aromatic Ring-Hydroxylating Dioxygenase

bph = Bifenil dioxigenase

moA= Mono-oxigenase A

DNA= Ácido Desoxirribonucleico

cDNA= DNA complementar

eDNA= DNA ambiental

GDSL= Sequência de aminoácidos conservados em nova família de lipase

GH10= Nova enzima da família de lipase

PHA= Poli Hidroxi Alcanoato

TAG = Triacilglicerol

DAG= Diacilglicerol

MAG= Monoacilglicerol

sn-1, sn-2 e sn-3 = Substituição nucleofílica 1,2 e 3

HSL= Lipase Hormônio Sensível

TLC= Cromatografia em camada delgada

CG= Cromatografia gasosa

HPLC= Cromatografia líquida de alta performance

pH = Potencial hidrogeniônico

IR = Infra vermelho

AOX = Álcool oxidase I

pAOX1= Promotor álcool oxidase I

pFLD1= Formaldeído desidrogenase I

GAP= Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

TEF = Fator 1 de alongação da tradução

MOX = Metanol oxidase