

MAÍRA POMPEU MARTINS

**Prospecção de enzimas de interesse biotecnológico de
Vibrios associados a corais endêmicos brasileiros.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Ricardo Henrique Krüger

**Brasília
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

M389p Martins, Maira Pompeu

Prospecção de enzimas de interesse biotecnológico de *vibrios* associados a corais endêmicos brasileiros. / Maira Pompeu Martins. – 2010.

80f.; il.: 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2010.

Orientação: Ricardo Henrique Krüger



Monografia de autoria de Maíra Pompeu Martins intitulada PROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO DE *VIBRIOS* ASSOCIADOS A CORAIS ENDÊMICOS BRASILEIROS apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em 12 de agosto de 2010, definida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Professor Dr. Ricardo Henrique Krüger
Orientador

Professora Dra. Betânia Ferraz Quirino
Examinadora interna - UCB

Professora Dra. Eliane Ferreira Noronha
Examinadora externa - UnB

Brasília
2010

AGRADECIMENTO

A Deus, pelo dom da vida. *Tudo posso n'Aquele que me fortalece (Fil 4:13);*

A meu paizinho Mauro, base, porto seguro. Teu amor incondicional me permite sempre ir mais longe. A meus irmãos Mauro, Marília e Márcia pelo apoio. Família, amo vocês;

Ao meu orientador pela confiança ao me aceitar em seu laboratório, e pela generosidade em compartilhar o conhecimento abrindo para mim as portas da ciência. Meu eterno agradecimento;

À professora Cristine Barreto pelas sugestões, incentivo e, principalmente, pela sincera disponibilidade para ensinar;

Às professoras Betânia Quirino e Eliane Noronha pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pela participação na banca;

Aos colegas de bancada Lucas, Janaina, Alessandra, Rodrigo, Jéssica, Nídia, Débora Farage, Isabel, Virgilio, Alinne, Flávia, Ohana, Raquel, Aline Melro (me perdoem se esqueci de alguém). Em especial à Débora Magalhães e Daniel;

À Thais Lemos, por fazer parte do desenvolvimento deste projeto. Essa conquista se deve em especial a você;

Ao Samuel, anjo da guarda, menino lindo que nunca mede esforços em ajudar, apoiar... Tenho muita sorte por ter sua amizade. Samuca gosto de você de graça!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o êxito deste trabalho.

“Se consegui enxergar mais longe é porque me apoiei em ombros de gigantes.”
(Isaac Newton)

RESUMO

Partindo da análise do DNA genômico de duas espécies de *Vibrios*, *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus*, isolados de corais endêmicos na costa brasileira, bibliotecas de clones (Genômica Funcional) que possibilitam a expressão e caracterização de genes de importância na área de pesquisa e na área aplicada foram construídas. Duas bibliotecas de pequenos fragmentos de DNA (menores que 15 kb) foram construídas, uma com *V. harveyi* e outra com *V. alginolyticus*, e uma biblioteca de grandes fragmentos de DNA (maiores que 30 kb) foi construída com *V. harveyi*. Para a construção das bibliotecas, o DNA genômico foi fragmentado por ação de enzimas de restrição e ligado em vetores de expressão, formando assim uma coleção com vários clones representativos de cada fragmento de DNA. Estes clones foram então utilizados na busca por diferentes atividades enzimáticas. Um clone positivo para atividade lipolítica foi isolado da biblioteca de pequenos insertos de *V. alginolyticus* e expresso em sistema procariótico, em *Escherichia coli*, utilizando o vetor de expressão pET21a(+) para produção heteróloga desta proteína, denominada Lip_1. A ORF (*open reading frame*) correspondente possui 618pb, e codifica uma proteína contendo 205 resíduos de aminoácidos com massa molecular estimada em 25kDa e alta identidade com lipases verdadeiras derivadas de outro microrganismos. Resultado de experimentos usando gel de eletroforese de sódio dodecil sulfato poliacrilamida demonstram a superexpressão desta enzima. A determinação de condições ótimas para sua atividade e relevância podem levar a análises bioquímicas mais aprofundadas no intuito de desenvolver um produto para aplicações industriais visando o melhoramento de processos produtivos.

Palavras-chave: *Vibrios*, Lipases, Genômica Funcional, DNA recombinante.

ABSTRACT

Based on the analysis of genomic DNA of two species of *Vibrios*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus* isolated from endemic corals from the Brazilian coast, clone library (Functional Genomics) that enable the expression and characterization of genes with importance in research and in the applied area were constructed. Two libraries of small DNA fragments (less than 15 kb) were constructed; one with *Vibrio harveyi* and one with *Vibrio alginolyticus*, and a library of large DNA fragments (larger than 30 kb) was constructed with *Vibrio harveyi*. For the construction of the libraries, genomic DNA was fragmented by the action of restriction enzymes and linked into expression vectors, thus forming a collection with several representative clones of each DNA fragment. These clones were then used to search for different enzymatic activities. A clone positive for lipolytic activity was isolated from the library of small fragments of *V. alginolyticus* and expressed in prokaryotic system in *Escherichia coli* using the expression vector pET21a (+), for production of an heterologous protein, named Lip_1. The corresponding ORF (*open reading frame*) has 618pb and encodes a protein containing 205 amino acid residues with estimated molecular weight of 25kDa and strong identity with true lipases derived from other microorganisms. Results of experiments using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis demonstrates the overexpression of this enzyme. The determination of its optimal activity conditions and relevance can lead to more detailed biochemical analysis, in order to develop a product for industrial applications, with the focus on improvement of production processes.

Keywords: *Vibrios*, Lipases, Functional genomics, Recombinant DNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Reações catalisadas por lipases.	12
Figura 2. Mapa do vetor pCF430 utilizado na clonagem dos fragmentos resultante da digestão do DNA genômico com a endonuclease de restrição <i>Pst</i> I.....	24
Figura 3. Mapa do vetor pCC1FOS™ utilizado na clonagem dos fragmentos resultante da digestão do DNA genômico com a endonuclease de restrição <i>Not</i> I.....	27
Figura 4. Mapa físico do vetor de expressão pET-21a(+).	31
Figura 5. Região de múltipla clonagem do vetor pET-21a(+). O gene <i>Lip_1</i> foi clonado entre os sítios de <i>Nde</i> I e <i>Xho</i> I (Promega, EUA) do vetor pET21a(+). Em verde, a sequência da cauda de histidinas em C-terminal.....	32
Figura 6. Parâmetros de temperatura e tempo da reação de PCR utilizando os primers específicos para a região codificante do gene de lipase de <i>Lip_alg1</i>	34
Figura 7. Gel de agarose com 12 clones da biblioteca de pequenos insertos de DNA de <i>Vibrio harveyi</i> . M. Marcador molecular <i>ladder1kb plus</i> (Invitrogen). 1. Plasmídeo linearizado com a enzima <i>Pst</i> I. 2 a 13. Clones com diferentes insertos de tamanho médio 4.958kb.....	42
Figura 8. Gel de agarose com 12 clones da biblioteca de pequenos insertos de DNA de <i>Vibrio alginolyticus</i> . M. Marcador molecular <i>ladder1kb plus</i> (Invitrogen). 1. Plasmídeo linearizado com a enzima <i>Pst</i> I. 2 a 13. Clones com diferentes insertos de tamanho médio 6.041kb.	42
Figura 9. Gel de agarose com 10 clones da biblioteca de grandes insertos de DNA do <i>Vibrio harveyi</i> utilizando fosmídeos. M. Marcador molecular Mid range 5kb. m. Marcador molecular <i>ladder 1kb plus</i> (Invitrogen). 1 a 10. Clones com diferentes insertos com tamanho médio de 30 kb.....	43
Figura 10. Clone 5, placa apresentando clones com e sem halo de degradação da tributirina contida no meio de cultura LB-ágar.....	45
Figura 11. Gel de agarose com resultado da digestão usando endonuclease de restrição <i>Pst</i> I, dos produtos da extração plasmidial dos clones 1, 2 e 5, da biblioteca de pequenos insertos de DNA de <i>Vibrio alginolyticus</i> . M. Marcador molecular <i>ladder1kb plus</i> (Invitrogen). 1. Digestão do clone 1, de colônia que apresentava halo. 2. Digestão do clone 1, de colônia que não apresentou halo após transformação em <i>E. coli</i> . 3. Digestão do clone 2, de colônia apresentando halo. 4. Digestão do clone 2, de colônia que não apresentou halo após transformação em <i>E. coli</i> . 5. Digestão do clone 5, colônia apresentando halo. 6. Digestão do clone 5, colônia não apresentando halo após transformação em <i>E. coli</i>	45
Figura 12. Placas com meio LB suplementada com tributirina 1% (v/v). A. Estriamento da cepa <i>E. coli</i> EPI 300 contendo o plasmídeo pCF430. B1. Estriamento do clone 1 de lipase do <i>Vibrio</i>	

- alginoliticus*, B2. Estriamento do clone 2 de lipase do *Vibrio alginolyticus*, B3. Estriamento do clone 5 de lipase do *Vibrio alginolyticus*. 46
- Figura 13. Placas com meio LB-ágar contendo tributirina 1% (v/v). a. Estriamento de colônias obtidas a partir de transformação do clone Lip_1*alg1*. b. Nova transformação a partir da extração plasmidial da colônia “a”. c. Nova transformação a partir da extração plasmidial da colônia “b”..... 47
- Figura 14. Inseto liberado após tratamento com endonuclease de restrição *Pst*I. M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Extração do DNA plasmidial em larga escala do clone Lip_1*alg1* intacto. 2. Resultado da digestão do produto da extração plasmidial em larga escala do clone Lip_1*alg1*..... 47
- Figura 15. Inseto do clone Lip_1*alg1* eluído de gel de agarose low-melting. M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Inseto Lip_1*alg1* liberado e eluído. 48
- Figura 16. Representação esquemática das cinco ORFs identificadas no inseto de Lip_1*alg1*. 49
- Figura 17. Árvore comparativa correlacionando deferentes famílias de lipases e esterases de microrganismos. A família I se divide em 6 subgrupos, de 1 a 6 (na árvore, identificados como FamI (“família I”), e sub indicando “subgrupo”, de 1 a 6). Ressaltada em vermelho posição de Lip_1 e em verde lipase isolada de *Vibrio cholerae* 52
- Figura 18. Gel de agarose de oito colônias que apresentaram ou não halo de degradação da tributirina presente no meio de cultura. M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1 a 8. Clones apresentando insertos confirmando a ligação no vetor pET21a (+) e clonagem em célula BL21(DE3). 54
- Figura 19. PCR utilizando primer específico para a região da lipase putativa Lip_1: M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Controle negativo da amplificação. 2 a 8. Produto de PCR do clone n°1, escolhido aleatoriamente: plasmídeo diluído 500 vezes; aplicados 2µL dos 20µL total da reação de PCR. 54
- Figura 20. Reações de digestão utilizando a enzima de restrição *Pst*I (Promega, EUA) com o vetor de escolha pET21a (+) e Lip_1. PCR utilizando primer específico para a região da lipase putativa Lip_1: M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Vetor de escolha pET21a (+); 2. pET21a (+) digerido; 3. Lip_1; 4. Lip_1 digerido; 5. Produto de PCR de Lip_1 utilizando primers específicos para a lipase e 6. Controle negativo da amplificação. 55
- Figura 21. Placas com meio LB-ágar suplementado com tributirina 1% (v/v). Na placa à esquerda, clone Lip_1 transformado em célula competente da cepa de *E. coli* BL21 (DE3), apresentando atividade degradativa da tributirina contida no meio de cultura. Na placa à direita, vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3) não apresentando atividade hidrolítica, indicando ser da porção do gene Lip_1 a atividade lipolítica. 55

Figura 22. À esquerda, perfil de gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com Coomassie G-250. Resultado do crescimento do clone Lip_1 e do vetor pET21a (+) induzidos com IPTG. 1. Clone Lip_1 crescido até OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,4, antes da indução por IPTG. 2. Clone induzido por uma hora sob agitação (240 rpm), a 37°C. 3. Duas horas de indução. 4. Três horas de indução. Proteína de aproximadamente 25kDa. 5. Vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3) crescido até OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,4, antes da indução por IPTG. 6. Após uma hora sob agitação (240 rpm), a 37°C, adicionado de 1mM de IPTG. 7. Após duas horas da adição de IPTG. 8. Após três horas da adição de IPTG. À direita, perfil de gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com Coomassie G-250 contendo as mesmas amostras de crescimento do clone Lip_1, com indicação da massa molecular com ajuda do marcador comercial Fermentas (*Unstained Protein*, Fermentas): M. Marcador de massa molecular Fermentas (*Unstained Protein*, Fermentas). 1. Clone Lip_1 crescido até OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,4, antes da indução por IPTG. 2. Clone induzido por uma hora com adição de IPTG concentração final 1mM sob agitação (240 rpm), a 37°C. 3. Duas horas de indução. 4. Três horas de indução. Proteína de aproximadamente 25kDa..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo IUBMB.....	9
Tabela 2. Famílias das enzimas lipolíticas, (Arpigny e Jaeger, 1999).....	13
Tabela 3. Reações de transesterificação enzimática usando diferentes tipos de óleos e lipases (Fukuda, Kondo <i>et al.</i> , 2001).	16
Tabela 4. A) Teste em meio com amido 0,5% (m/v) para detecção da atividade de amilase, B) Teste em meio contendo Skim Milk 1% (m/v) para detecção da atividade de protease, C) Teste em meio com tributirina 1% (v/v) para detecção da atividade de lipase, D) Teste em meio com ácido fítico para detecção da atividade de fitase. O crescimento da colônia é indicativo de atividade do organismo neste meio.	40
Tabela 5. Relação de clones plaqueados e clones positivos para diferentes testes de atividade enzimática.....	44
Tabela 6. Tabela relacionando a homologia das ORFs do clone Lip_alg1.....	50
Tabela 7. Alinhamento utilizando as sequencias mais intimamente relacionadas à sequencia de Lip_alg1. Todas são pertencentes ao gênero <i>Vibrio</i> . Resíduos diferentes estão indicados em cores na sequência. Sítio catalítico indicado com asteriscos.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
BSA	Albumina de Soro Bovino
cm	Centímetro
CTAB	Cetiltrimetilamonio Bromido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxirribonucleosídeo Trifosfato
EDTA	Etileno Diamino Acetato Dissódico
g	Força centrífuga
g	Gramma
IPTG	Isopropil-beta-D-Tiogalactopiranosideo
Kb	Kilobase
Kv	Kilovolt
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligrama
mM	Micromolar
OD	Densidade óptica
PB	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
UV	Radiação Ultravioleta
V	Volts
Λ	Lâmbda
µF	Micro-Faraday
µm	Micrometro
Ω	Ohm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1 CORAIS E DIVERSIDADE BACTERIANA	1
2.2 VIBRIOS.....	4
2.2.1 <i>Vibrio harveyi</i>	5
2.2.2 <i>Vibrio alginolyticus</i>	6
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA COMO FOCO DE ESTUDOS	7
2.4 EXPLORAÇÃO BIOTECNOLÓGICA	8
2.5 ENZIMAS.....	9
2.6 ENZIMAS LIPOLÍTICAS	10
2.7 LIPASES DE ORIGEM MICROBIANA	12
2.7.1 <i>Classificação das lipases microbianas</i>	13
2.8 APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE LIPASES.....	15
2.8.1 <i>Produção de detergentes</i>	15
2.8.2 <i>Biodiesel</i>	16
2.8.3 <i>Indústria farmacêutica e química fina</i>	17
2.8.4 <i>Indústria alimentícia</i>	17
2.8.5 <i>Indústria de papel</i>	18
2.8.6 <i>Outras aplicações</i>	18
2.9 PROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO DE VIBRIOS ASSOCIADOS A CORAIS ENDÊMICOS BRASILEIROS	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 GERAL	20
3.2 ESPECÍFICOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	21
4.2 SELEÇÃO PARA ATIVIDADES.....	21
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA	22
4.4 BIBLIOTECAS GENÔMICAS	23
4.4.1 <i>Biblioteca de pequenos insertos de DNA</i>	23
4.4.1.1 <i>Preparo de células eletrocompetentes</i>	26
4.4.2 <i>Biblioteca de grandes insertos de DNA</i>	27

4.5 TRIAGEM FUNCIONAL DE CLONES COM ATIVIDADE	29
4.6 CLONE LIP_ALG1E GENE LIP_1.....	30
4.6.1 <i>Análise de Sequências</i>	30
4.6.2 <i>Vetor de expressão em E. coli pET21a(+)</i>	31
4.6.3 <i>Desenho de primers e reação em cadeia da polimerase PCR da região específica</i>	32
4.6.4 <i>Digestão do plasmídeo e gene</i>	35
4.6.5 <i>Reações de ligação</i>	35
4.6.6 <i>Preparo de células eletrocompetentes</i>	36
4.6.7 <i>Transformação em BL21 (DE3)</i>	36
4.6.8 <i>Verificação da presença do inserto</i>	37
4.7 INDUÇÃO E EXPRESSÃO	38
4.8 ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR POR SDS-PAGE	38
5. RESULTADOS	40
5.1 SELEÇÃO PARA ATIVIDADES.....	40
5.2 BIBLIOTECA DE PEQUENOS INSERTOS DE DNA	41
5.3 BIBLIOTECA DE GRANDES INSERTOS DE DNA	42
5.4 TRIAGEM FUNCIONAL PARA ATIVIDADE.....	43
5.5 CLONE LIP_ALG1 E GENE LIP_1.....	48
5.6 INDUÇÃO E EXPRESSÃO	56
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO	63
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	64
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	65
10. APÊNDICE	73
10.1 MEIOS DE CULTURA.....	73
10.1.1 <i>TSA_ Tryptic Soy Ágar</i>	73
10.1.2 <i>LB_ Luria Bertani</i>	73
10.1.3 <i>Meio M2</i>	73
10.1.4 <i>Meio SOB</i>	74
10.2 ANTIBIÓTICOS, SOLUÇÕES UTILIZADAS E REAGENTES.....	74
10.3 SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DE LIP_ALG1.....	76
10.4 SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ORFS EM LIP_ALG1	78

1. INTRODUÇÃO

Vibrios são bactérias gram-negativas abundantemente encontradas no ambiente marinho. Algumas espécies destes organismos têm sido relacionadas com doenças em corais e seus fatores de virulência protéicos, incluindo hemolisinas (Wang, Zhang *et al.*, 2007), quitinases (Kadokura, Rokutani *et al.*, 2007), proteases (Zhang, Yu *et al.*, 2007) e serino-proteases alcalinas (Lee, Yu *et al.*, 1997) associados à patogenia de vibrios.

A produção destas moléculas demonstra a importância ecológica e biotecnológica deste grupo. Neste sentido, pesquisas têm se voltado para o isolamento de genes que detenham algum potencial econômico, como por exemplo, lipases (Teo, Zhang *et al.*, 2003).

A clonagem em vetores de expressão, recurso utilizado na prospecção de novos produtos biotecnológicos, permite sequenciar genes codificadores de biocatalizadores que poderão ser então comparados a sequências depositadas em bancos de dados de domínio público (Rondon, Raffel *et al.*, 1999; Courtois, Cappellano *et al.*, 2003).

Partindo da análise do DNA genômico de dois vibrios - *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus*, isolados de espécies de corais formadoras de arrecifes no Brasil, bibliotecas de clones foram construídas, possibilitando o estudo de expressão e caracterização de genes de interesse biotecnológico. Especificamente, a atividade lipolítica de clone obtido partindo da biblioteca de pequenos fragmentos de DNA do *Vibrio alginolyticus* foi priorizada, em virtude da facilidade de obtenção deste clone e relevante aplicabilidade de enzimas lipolíticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CORAIS E DIVERSIDADE BACTERIANA

Corais são organismos marinhos que vivem associados a uma grande e diversificada comunidade de bactérias e em relação simbiótica com algas dinoflageladas

do gênero *Symbiodinium* comumente denominadas zooxantelas (Rosenberg, Koren *et al.*, 2007; Alves Jr, Maia Neto *et al.*, 2009). Participam na transferência de matéria e energia na cadeia trófica, são fontes de compostos bioativos como antimicrobianos (Cortés, 2003) e, em sua maioria, constroem esqueletos calcários. Tais esqueletos são responsáveis pela estrutura rochosa chamada arrecifes de corais (Knowlton, 2001).

Os arrecifes de corais são ecossistemas extremamente importantes para a economia dos países pesqueiros do mundo, vez que são habitat de diversos peixes e de outros organismos, sendo também importantes para proteção de zonas costeiras contra ressacas, erosão e alagamento, e apresentam significativa importância para o turismo (Knowlton, 2001). Além disso, arrecifes de corais são conhecidos pela grande diversidade microbiana que vive em sua superfície e na água que os circunda (Rohwer, Rohwer *et al.*, 2001; Rohwer, Seguritan *et al.*, 2002; Efrony, Atad *et al.*, 2009)

Essa grande variedade de microrganismos associada aos corais existe em decorrência de uma camada de mucopolissacarídeo ou muco que se estende por poucos milímetros acima da superfície de seus tecidos (Sharon e Rosenberg, 2008). Esse muco resulta de uma combinação de produtos do próprio coral e das zooxantelas, contendo altas concentrações de proteínas, polissacarídeos e lipídeos, que torna o ambiente propício ao crescimento de microrganismos (Wild, Huettel *et al.*, 2004; Shnit-Orland e Kushmaro, 2009).

Segundo (Rosenberg e Ben-Haim, 2002)), mudanças na população de bactérias presentes no muco ocorrem quando corais estão sob estresse. Essa alteração na população microbiana gera um desequilíbrio que pode implicar na ocorrência de doenças infecciosas como o branqueamento, perda da coloração do coral resultante do rompimento da relação simbiótica entre o coral e as zooxantelas (Koren e Rosenberg, 2008).

Doenças infecciosas vêm causando sérios danos a recifes distribuídos por todo o mundo. Relatos de doenças em corais causadas por microrganismos têm aumentado de forma significativa nas últimas décadas (Ben-Haim, Thompson *et al.*, 2003; Santavy, Summers *et al.*, 2005; Rosenberg, Koren *et al.*, 2007) e fatores ambientais, especialmente o aumento da temperatura dos oceanos e a poluição, têm contribuído para o desenvolvimento das doenças (Ainsworth, Fine *et al.*, 2008; Bourne, Iida *et al.*, 2008).

Mudanças no ambiente em que vivem os microrganismos são por estes sentidas, e refletem em respostas, cruciais para sua sobrevivência e permanência naquele ambiente. Geralmente os microrganismos não respondem a estresse ou a um déficit nutricional por

redução em sua atividade metabólica ou diminuindo o crescimento: eles tendem a promover a produção de enzimas degradativas, como lipases ou proteases, que suprirão o déficit nutricional, assim como também passam a produzir enzimas captadoras de substratos como glutaminosintetases ou alcalinofosfatases. Tais organismos, em situações extremas, tendem a se tornar mais resistentes assegurando, destarte, sua sobrevivência (Abdallah, Kallel *et al.*, 2009).

Membros do gênero *Vibrio* são bactérias marinhas comumente encontradas associadas a corais, inclusive naqueles apresentando sinais de doenças; várias espécies, patogênicas ou não, tem sido isoladas destes nichos (Rosenberg e Ben-Haim, 2002; Ben-Haim, Thompson *et al.*, 2003; Weil, Smith *et al.*, 2006; Sussman, Mieog *et al.*, 2009) e, à produção de diferentes fatores de virulência incluindo enterotoxinas, hemolisinas, citotoxinas, proteases, fosfolipases e lipases, dentre outros, pode-se associar a ocorrência das patogenias nos corais (Zhang e Austin, 2005).

Como exemplo, estudos realizados entre o coral *Oculina patagônica* e a bactéria *Vibrio shiloi* (Kushmaro, Loya *et al.*, 1996; Rosenberg e Ben-Haim, 2002) indicam aumento da população destes *Vibrios* durante o branqueamento, população esta que, quando não tem seu crescimento controlado, pode levar o coral à morte (Glynn e Wh, 1991).

Também a presença lesiva de quatro espécies de *Vibrios*: *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus* foi estudada em corais apresentando a doença da Banda-amarela (“Yellow band disease”), uma das patologias mais comumente observada em corais que vivem na região dos trópicos (Cervino, Thompson *et al.*, 2008). O estudo mostrou que estes *Vibrios* agridem diretamente as zooxantelas presentes no tecido gastrodermal de corais de recifes caribenhos e indo-pacíficos, tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro*.

A diversidade de vibrios associados a corais apresentando branqueamento, observada em *Davies Reef* e *Magnetic Island* (na grande barreira de corais da Austrália) e em *Kaneohe Bay* (Havaí) indicam que várias espécies, como *Enterovibrio coralii*, *V. fortis*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. mediterranei* e *V. rotiferianus* podem estar também envolvidas no processo de branqueamento de corais (Thompson, Thompson *et al.*, 2005).

Também no Brasil têm-se observado a ocorrência de patologias em corais decorrente da ação de microrganismos. Os recifes do Brasil são compostos por uma fauna pouco diversa (cerca de 20 corais da espécie *escleractínea*) com uma proporção

relativamente alta de espécies endêmicas concentradas em áreas restritas e altamente ameaçadas (Leão, Kikuchi *et al.*, 2003; Leao e Kikuchi, 2005; Dutra, Allen *et al.*, 2006). A ocorrência de branqueamento associado à presença de *Vibrios* foi relatada por (Alves Jr, Maia Neto *et al.*, 2009)), fato que indica a necessidade de buscar soluções que evitem as infecções ou que promovam a saúde dos corais uma vez infectados: sendo endêmicas as espécies de corais da costa brasileira, mais facilmente tendem à extinção (Francini-Filho, Moura *et al.*, 2008).

Todos estes estudos enaltecem a relevância de se investigar os fatores responsáveis por alterar a relação entre corais e os microrganismos que associados a estes vivem, considerando-se, de forma especial, as bactérias do gênero *Vibrio*, conhecidamente responsáveis pela ocorrência de patologias em corais.

2.2 VIBRIOS

Dentre os vários organismos do ambiente marinho, membros do gênero *Vibrio*, da família *Vibrionaceae*, vêm sendo amplamente estudados em virtude da alta densidade associadas a organismos doentes, como camarões (Gomez-Gil, Herrera-Vega *et al.*, 1998), moluscos (Faury, Saulnier *et al.*, 2004; Sawabe, Hayashi *et al.*, 2004), humanos (Zanetti, Deriu *et al.*, 1999; Thompson, Thompson *et al.*, 2003) e corais (Rosenberg, Koren *et al.*, 2007).

Mesmo tendo algumas espécies sido associadas a doenças, aqui, de modo relevante, em corais (Kushmaro, Banin *et al.*, 2001; Ben-Haim, Thompson *et al.*, 2003; Sussman, Willis *et al.*, 2008), os mecanismos de patogenicidade destas bactérias ainda não estão totalmente elucidados. Produtos extracelulares como lipases, proteases e hemolisinas são considerados determinantes na virulência das cepas de *Vibrio sp.* (Austin e Zhang, 2006).

As espécies que constituem o gênero *Vibrio* são anaeróbicas facultativas, gram-negativas, bastonetes curvos ou retos, medem entre 0,5 a 0,8µm de diâmetro e 1,4 a 2,4µm de comprimento. Possuem espécies patogênicas ou não, sendo que a maioria das espécies patogênicas é móvel, possuindo flagelo único e polar. Todas as espécies de vibrios são capazes de sobreviver e se multiplicar em águas contaminadas, com elevada salinidade e

temperatura variando de 10 a 30°C (Thompson, Iida *et al.*, 2004; Thompson, Gevers *et al.*, 2005).

Abundantes particularmente em ambientes eutróficos (Eilers, Pernthaler *et al.*, 2000) e estuarinos, onde a salinidade varia entre 0,5 e 2,5‰ (Nishiguchi e Nair, 2003), necessitam da disponibilidade de cloreto de sódio - NaCl (2 a 3%) em meios de cultura para que sejam isolados.

Diversas espécies são relatadas como patogênicas, como o *Vibrio coralliilyticus* (Ben-Haim, Thompson *et al.*, 2003), *Vibrio hispanicus* (Gomez-Gil, Thompson *et al.*, 2004), *Vibrio harveyi* (Austin e Zhang, 2006), *Vibrio alginolyticus* (Lee, Yu *et al.*, 1997; Balebona, Andreu *et al.*, 1998) dentre outras, afetando significativamente os organismos aos quais estão associados (Gomez-Gil, Soto-Rodriguez *et al.*, 2004; Cai, Wu *et al.*, 2007). São também encontrados em organismos saudáveis, caracterizando muitas espécies como oportunistas (Sussman, Mieog *et al.*, 2009).

As patologias, comumente denominadas *vibrioses*, decorrem do desequilíbrio populacional das bactérias e de substâncias secretadas por esses organismos na tentativa de se estabelecerem naquele ambiente. Tais fatores, as exotoxinas, geralmente letais, já foram identificadas partindo de várias espécies de *Vibrios*, como *Vibrio alginolyticus* (Lee, Yu *et al.*, 1997; Balebona, Andreu *et al.*, 1998), *Vibrio harveyi* (Teo, Zhang *et al.*, 2003) ou *Vibrio parahaemolyticus* (Kadokura, Rokutani *et al.*, 2007).

Estes fatores, mesmo que degradativos, representam uma potencial fonte de produtos com relevante valor em biotecnologia, fator que atribui ainda maior importância aos estudos de identificação e isolamento destas exotoxinas.

2.2.1 *Vibrio harveyi*

Organismos amplamente distribuídos no ambiente marinho, gram-negativos, luminosos, necessitam de cloreto de sódio em abundância para seu desenvolvimento, crescendo entre 21 e 40°C (Austin e Zhang, 2006; Zhang, Sun *et al.*, 2008). Tais vibrios têm sido associados a doenças em diversos organismos, provocando lesões em tecidos (Teo, Zhang *et al.*, 2003) ou mortalidade em peixes, ostras, camarões e outros organismos

(Hedreyda e Ranoa, 2007; Shivu, Rajeeva *et al.*, 2007); pouco se sabe, no entanto, a respeito dos seus mecanismos de patogenicidade (Zhong, Zhang *et al.*, 2006).

Conhecidamente uma das principais espécies do gênero (Dorsch, Lane *et al.*, 1992), foi primeiramente denominado *Achromobacter harveyi*, e diversas vezes descrito como *Lucibacterium harveyi* e *Beneckeia harveyi*, até sua denominação atual, *V. harveyi*, decorrente de análise do rDNA 16S (Austin e Zhang, 2006). Resultado de estudos fenotípicos e genotípicos, incluindo análise do rDNA 16S determinou se tratarem da mesma espécie *V. harveyi* e *V. carchariae* (Gauger e Gomez-Chiarri, 2002). Possui genoma de 5Mb (*Taxonomy ID: 673519*), depositado em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_ACZC000000000.1.

Estudos têm buscado a identificação de exotoxinas provenientes desta espécie de vibrios, relacionado-as à patogenicidade em organismos marinhos: uma cisteino-protease isolada de camarões (Liu e Lee, 1999), uma serino-protease relatada como patógena de peixes (Zhang, Sun *et al.*, 2008) e uma hemolisina isolada de peixes doentes (Zhong, Zhang *et al.*, 2006) indicam a capacidade de virulência destes vibrios.

2.2.2 *Vibrio alginolyticus*

Bactéria gram-negativa halofílica, foi primeiramente identificada como patógena oportunista de animais marinhos causando sinais típicos de vibrioses como escurecimento, ulcerações no tecido e septicemia (Balebona, Andreu *et al.*, 1998; Rui, Liu *et al.*, 2008); está associada a doenças em peixes (Balebona, Andreu *et al.*, 1998) camarões (Gomez-Gil, Herrera-Vega *et al.*, 1998) e humanos (Hornstrup e Gahrn-Hansen, 1993), crescendo preferencialmente em temperaturas entre 17 e 35°C, e salinidade entre 5-25‰ (Hornstrup e Gahrn-Hansen, 1993).

O genoma da linhagem 40B, disponível em banco de dados de domínio público possui 5.1Mb (*Taxonomy ID: 674977*), depositado em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_ACZB000000000.1.

Fatores de virulência, contribuidores da patogenicidade desta espécie vêm sendo identificados; porém, pouco se sabe a respeito dos mecanismos regulatórios envolvidos na biossíntese e secreção de tais fatores (Ye, Ma *et al.*, 2008). Foi proposto em 1996 por

Kushamaro et al. ser o *Vibrio alginolyticus* responsável por causar o branqueamento e morte de corais; os fatores responsáveis pelo aparecimento das patologias, no entanto, permanecem desconhecidos (*Kushamaro et al* apud (*Hormansdorfer, Wentges et al.*, 2000).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA COMO FOCO DE ESTUDOS

Pouco se sabe a respeito dos sinais de controle de expressão *in vivo* determinantes na virulência bacteriana. Os efeitos dos parâmetros nutricionais e físicos na produção de fatores de virulência em laboratório refletem a existência de mecanismos reguladores que podem estimular o microrganismo a expressar essas características especializadas. Esse mecanismo de regulação permite ao organismo a controlar a liberação de toxinas, antibióticos e outras proteínas para o ambientes quando não há necessidade. Compreender os sinais e mecanismos que estão envolvidos no controle da expressão de genes de virulência contribui para o entendimento dos mecanismos de infecção bacteriana (*Miller e Mekalanos, 1988*).

Para promover a invasão dos tecidos do hospedeiro, células microbianas secretam enzimas hidrolíticas constitutivas e induzíveis, que destroem ou causam danos à membrana celular do hospedeiro, levando a uma disfunção e/ou ruptura física (*Ghannoum, 2000*). As membranas são formadas por lipídeos e proteínas, constituintes que podem servir como um alvo para o ataque das enzimas microbianas (*Jaeger e Eggert, 2004*).

Enzimas hidrolíticas comumente secretadas por microrganismos, como as lipases, podem atuar como fatores de virulência (*Teo, Zhang et al.*, 2003). Uma gama de exotoxinas, que inclui uma variedade de enzimas, já foi foco de estudos indicando a expressão de fatores de virulência em vibrios (*Nakayama, Nomura et al.*, 2007; *Bai, Pang et al.*, 2008; *Defoirdt, Verstraete et al.*, 2008; *Ye, Ma et al.*, 2008) e, não apenas importantes para a determinação da patogenia destes organismos, o estudo da atividade enzimática extracelular provenientes de vibrios apresenta grandes perspectivas em exploração biotecnológica.

2.4 EXPLORAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Com o intuito de aumentar o rendimento no setor industrial a biotecnologia, ramo da tecnologia que busca transferir os resultados de estudos em ciências biológicas para os setores produtivos tem se voltado para a obtenção de novas enzimas. Os estudos visam à obtenção de produtos que tornem os processos de produção em larga escala mais eficiente e menos dispendiosos, proporcionando obtenção de produtos com qualidade, partindo de diversas fontes tais como vegetais, animais e microrganismos (Bornscheuer, 2005).

Há anos a diversidade metabólica de microrganismos tem sido explorada para a produção de antibióticos como a penicilina, para a produção de bebidas alcoólicas como vinhos, ou no processamento de alimentos, como no caso da produção de pães.

Uma comunidade bacteriana altamente diversa potencialmente reflete uma alta diversidade de enzimas. De uma perspectiva biotecnológica estas enzimas, e o conhecimento derivado de sua estrutura e função, podem ser valiosos para aplicações industriais ou terapêuticas. Tal fato faz do meio marinho ambiente de considerável relevância na descoberta de enzimas (Hardeman e Sjoling, 2007).

O meio marinho é extremamente heterogêneo e os microrganismos que ali habitam estão expostos a condições extremas de pressão, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes. Enzimas isoladas destes microrganismos tendem a possuir características bioquímicas e fisiológicas distintas, que os permitiram adaptar e desenvolver nestas condições (Kennedy, Marchesi *et al.*, 2008).

Em busca de encontrar novos biocatalisadores, é crescente a necessidade de desenvolver novas abordagens experimentais para identificar e isolar genes codificadores de biomoléculas com ação catalítica. Para tanto, análises do DNA genômico de organismos abundantes, como bactérias, têm sido realizadas.

Estudos de prospecção desenvolvidos com bactérias do gênero *Vibrio* têm como finalidade utilizar exotoxinas, causadoras de doenças em organismos como o branqueamento em corais, no desenvolvimento de produtos com aplicação em biotecnologia.

A clonagem em vetores de expressão, recurso utilizado na prospecção de novos produtos biotecnológicos, é uma ferramenta utilizada na busca de genes codificadores de biocatalisadores (Rondon, Raffel *et al.*, 1999; Courtois, Cappellano *et al.*, 2003). Com o intuito de buscar fragmentos de genes com função catalítica, bibliotecas de fragmentos de

DNA vêm sendo estudadas na busca por novas biomoléculas, resultando na caracterização de clones com as mais diversas atividades enzimáticas.

2.5 ENZIMAS

Enzimas são biocatalisadores capazes de aumentar a velocidade de reações na rota metabólica dos seres vivos, sob condições ideais sem, no entanto, participar da mesma como reagente ou produto; elas permitem atingir rapidamente o estado de equilíbrio da reação sem modificá-lo. A capacidade catalítica das enzimas as torna adequadas para aplicações industriais, sendo peças-chaves na biotecnologia e na bioindústria (Kirk, Borchert *et al.*, 2002).

As enzimas são obtidas de três grandes fontes: vegetais, animais ou microrganismos (Bornscheuer, 2005). Grande parte das enzimas utilizadas em processos industriais são de origem microbiana: por conseguirem se desenvolver em ambientes extremos, sua produção escalonada pode ser obtida com certa facilidade e, por meio de engenharia genética, a produção de tais fatores pode vir a ser aprimorada (Kirk, Borchert *et al.*, 2002; Van Beilen e Li, 2002; Bornscheuer, 2005).

A classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) divide as reações catalisadas por enzimas em seis grupos principais, os quais estão divididos em subclasses, de acordo com o tipo de reação catalisada (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo IUBMB.

Classes	Função catalítica	Subclasses
1 – Oxidorredutases	Catalisam reações de oxidação-redução envolvendo oxigenações e remoção ou adição de átomos de hidrogênio.	Desidrogenases Oxidases Hidrogenases Peroxidases
2 - Transferases	Enzimas que mediam a transferência de grupos tais como aldeídos, cetonas, etc.	Metiltransferases Transaminases
3 – Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise e formação de glicosídeos, anidridos e ésteres, bem como amidas, peptídeos e outras funções contendo a ligação C-N.	Carboidrases Esterases Lipases Fosfatases Proteases

4 - Liases	Catalisam reações de adição, usualmente de HX, a duplas ligações como: C=C, C=N e C=O, e também os processos reversos.	Descarboxilases Cetoácidolises Hidratases
5 - Isomerases	Catalisam processos de isomerização, tais como racemização.	Racemases Isomerases Mutases
6 - Ligases	Mediam a formação ou clivagem de ligações C-C, C-O, C-S, C-N e ésteres de fosfato.	Sintetases

Dentre as enzimas com potencial aplicação em processos industriais, as hidrolases têm considerável relevância, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias (Kirk, Borchert *et al.*, 2002; Gupta, Gupta *et al.*, 2004) como proteases, amilases, esterases e lipases (Jaeger e Eggert, 2002; Kirk, Borchert *et al.*, 2002; Haki e Rakshit, 2003).

As lipases apresentam destacada importância, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é restrito. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente a diferentes temperatura, condições de pH e solventes orgânicos e sua quimio-regio e enantiosseletividade (Gupta, Gupta *et al.*, 2004).

2.6 ENZIMAS LIPOLÍTICAS

O termo enzimas lipolíticas compreende as lipases verdadeiras (*Enzyme Commission number* - EC 3.1.1.3), responsáveis por catalizar a hidrólise de ligações éster de triglicerídeos, acilglicerol de grande cadeia, em diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos com consumo de moléculas de água (Sommer, Bormann *et al.*, 1997; Gupta, Gupta *et al.*, 2004), atuando nas ligações éster carboxil presentes nos acil gliceróis (Jaeger, Ransac *et al.*, 1994); as esterases (EC 3.1.1.1), que hidrolizam ácidos carboxílicos de cadeias menores solúveis em água ou em emulsão (Sommer, Bormann *et al.*, 1997; Kim, Kang *et al.*, 2007), além de fosfolipases (Arpigny e Jaeger, 1999).

Tanto lipases quanto esterases são facilmente isoladas de microrganismos (Kim, Kang *et al.*, 2007). Apresentam grande versatilidade de propriedades tais como resistência a pH extremos, termoestabilidade e estereoespecificidade sendo corriqueiramente utilizadas em processos industriais como na formulação de detergentes, síntese de biosurfactantes, fabricação de papel, dentre outras aplicações (Gupta, Gupta *et al.*, 2004).

As características de estabilidade em solventes orgânicos, que permite adequado contato entre os substratos e o(s) centro(s) ativo(s) da enzima, especificidade a substratos e independência de co-fatores, e a capacidade de reduzir grandes cadeias de ácidos graxos faz das lipases verdadeiras o grupo de biocatalistas orgânicos mais importantes para aplicação biotecnológicas (Koeller e Wong, 2001; Bornscheuer, 2002; Jaeger e Eggert, 2002).

Sua atividade depende principalmente de uma tríade catalítica usualmente formada por resíduos de serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico (Jaeger e Reetz, 1998). Outra característica estrutural das lipases é uma α -helice denominada “tampa” que recobre o sítio ativo na ausência de um substrato e pode se mover quando em presença de interface lipídeo-água, expondo a chamada conformação aberta da enzima, aumentando a atividade enzimática, bem como a agregação das moléculas de substrato (Jaeger e Reetz, 1998; Arpigny e Jaeger, 1999; Saxena, Sheoran *et al.*, 2003) sendo portanto mais ativas em substratos insolúveis do que em solúveis.

Embora sua função natural seja a quebra das ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água, as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster a partir de álcool e ácido carboxílico - síntese de éster (Angkawidjaja e Kanaya, 2006). A Figura 2 ilustra as reações catalisadas por lipases:

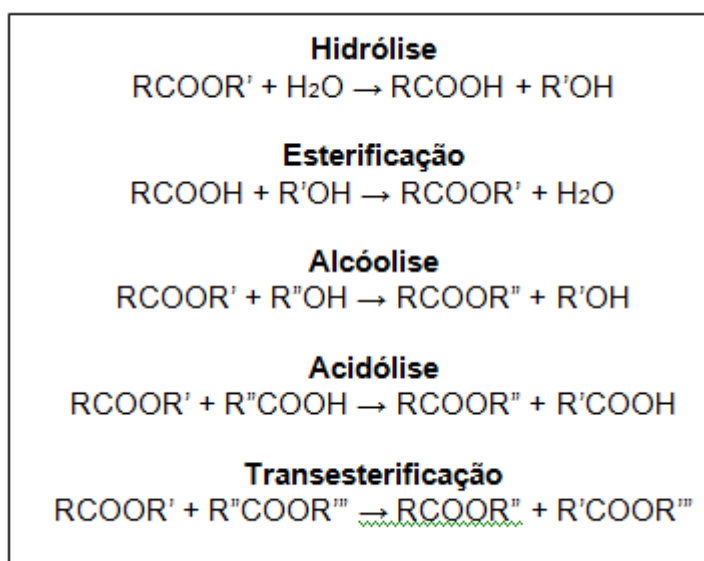


Figura 1. Reações catalisadas por lipases.

2.7 LIPASES DE ORIGEM MICROBIANA

Os microrganismos, dotados de grande versatilidade metabólica, são capazes de produzir uma gama de substâncias bioativas interessantes para estudos em biotecnologia tais como proteases, celulasas, lipases e xilanasas (Jaeger e Reetz, 1998; Lynd, Weimer *et al.*, 2002; Spier, 2005). Tais produtos são catalizadores biológicos presentes em todos os organismos vivos e que, uma vez isolados, passam a substituir muitos produtos químicos nocivos ou até perigosos, com grande eficiência.

Aproximadamente 100 anos atrás o microbiologista C. Eijmann relatou a produção e secreção de lipases por diversas bactérias (Jaeger e Eggert, 2002). Desde então, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para obtenção e utilização de tais enzimas.

Lipases são produzidas por muitos microrganismos e eucariontes superiores, tais como plantas e mamíferos (Taipa, Aires-Barros *et al.*, 1992; Jaeger e Reetz, 1998). A maior parte das lipases comerciais provém de microrganismos, em virtude da facilidade e baixos custos no processo de obtenção, apresentando geralmente grande estabilidade e elevada especificidade quando atuando em processos industriais (Jaeger e Eggert, 2002).

Lipases extracelulares são secretadas em meio de cultura quando as células bacterianas chegam ao fim da fase logarítmica de crescimento (Jaeger, Ransac *et al.*,

1994). Para se obter elevado nível de produção de lipases microbianas, faz-se necessário não somente uma eficiente expressão dos genes correspondentes, mas também análises moleculares para controle de produção e secreção destas enzimas (Jaeger e Eggert, 2002).

Muitos microrganismos são conhecidos por produzirem diferentes tipos de lipases de acordo com condições de cultivo, tais como pH, composição do meio de cultura, tempo de cultivo e temperatura (Gupta, Gupta *et al.*, 2004). O fator nutricional de maior importância na produção de lipases é a fonte de carbono, sendo produzidas na presença de fontes lipídicas como óleos, ácidos graxos, glicerol e ésteres hidrolisáveis (Sharma, Chisti *et al.*, 2001; Gupta, Mehra *et al.*, 2004).

2.7.1 Classificação das lipases microbianas

Como descrito por (Arpigny e Jaeger, 1999)), o conhecimento da estrutura de lipases e esterases vem aumentando atualmente, em decorrência da elucidação de diversos genes e a resolução de muitas estruturas cristalinas. Estes autores propuseram a classificação atual das enzimas lipolíticas em famílias, por análise de sequências conservadas e características biológicas destas enzimas.

Neste estudo foram propostas oito famílias, sendo a classificação determinada como segue:

Tabela 2. Famílias das enzimas lipolíticas, (Arpigny e Jaeger, 1999).

Família	Subfamília	Origem da enzima	Propriedades
I (GDLS)	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lipases verdadeiras
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
		<i>Vibrio cholerae</i>	
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
		<i>Pseudomonas fragi</i>	
	2	<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	
		<i>Proteus vulgaris</i>	
		<i>Burkholderia glumae</i>	
		<i>Chromobacterium viscosum</i>	
3	<i>Burkholderia cepacia</i>		
	<i>Pseudomonas luteola</i>		
	<i>Serratia marcescens</i>		

	4	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i>	
		<i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Bacillus thermocatenulatus</i>	
	5	<i>Staphylococcus hyicus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Fosfolipase
	6	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Streptomyces cinnamoneus</i>	
II		<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Streptomyces scabies</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Photorhabdus luminescens</i>	Aciltransferase secretada Esterase secretada Esterase externa à membrana Esterase externa à membrana Esterase secretada
III		<i>Streptomyces exfoliates</i> <i>Streptomyces albus</i> <i>Moraxella sp.</i>	Lipase extracelular Lipase extracelular Esterase extracelular
IV (HSL)		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Archaeoglobus fulgidus</i> <i>Alcaligenes eutrophus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Moraxella sp.</i>	Esterase Lipase Carboxilesterase Lipase putativa Carboxilesterase Esterase extracelular
V		<i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Psychrobacter immobilis</i> <i>Moraxella sp.</i> <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i>	PHA-depolimerase Esterase putativa Esterase extracelular Esterase extracelular Esterase Esterase
VI		<i>Synechocystis sp.</i> <i>Spirulina platensis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Rickettsia prowazekii</i> <i>Chlamydia trachomatis</i>	Carboxilesterases
VII		<i>Arthrobacter oxydans</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces coelicolor</i>	Carbamato hidrolase <i>p</i> -Nitrobenzil esterase Carboxilesterase Putativa
VIII		<i>Arthrobacter globiform</i> <i>Streptomyces chrysomallus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Esterase estereoseletiva Esterase Esterase

A classificação busca englobar a grande diversidade de enzimas lipolíticas em grupos, relacionando suas propriedades e características de forma a auxiliar na classificação de dada enzima em lipases, esterases ou fosfolipases.

2.8 APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE LIPASES

Lipases são biocatalistas versáteis. Devido à grande variedade de reações que catalisam, as lipases têm inúmeras aplicações industriais (Arpigny e Jaeger, 1999). A maior parte das enzimas lipolíticas utilizadas nas indústrias atualmente são de origem microbiana (Saxena, Sheoran *et al.*, 2003; Kim, Kang *et al.*, 2007).

Os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizem temperatura e pressão ambientes e evitem o uso de compostos químicos com alto potencial poluente. Para tanto, a enzimologia molecular têm buscado em fontes microbianas enzimas com características singulares e de baixo custo a serem utilizadas nos mais diversos ramos da indústria (Gupta, Gupta *et al.*, 2004). Dentre as possíveis utilizações das lipases, se destacam:

2.8.1 Produção de detergentes

Utilização de grande relevância das enzimas lipolíticas, formulações contendo lipases na indústria de detergentes reduz expressivamente o tempo e a temperatura em processos de lavagem, resultando em maior eficiência e menor gasto de energia (Jaeger e Reetz, 1998).

Seu uso em produtos para lavagem de roupas requer da enzima termoestabilidade e que esta permaneça ativa em ambiente alcalino típico de uma máquina de lavar. Estima-se que 1000 toneladas de enzimas com ação lipolítica sejam adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas de produtos com ação detergente todos os anos (Sharma, Chisti *et al.*, 2001).

A ação de limpar e a habilidade de emulsificar de um detergente dependem de sua capacidade de formar partículas de óleo “estáveis” e reduzir a tensão interfacial, facilitando a penetração da água. As lipases utilizadas em detergentes são selecionadas para cumprir com os seguintes requisitos: ter uma baixa especificidade em relação ao substrato, isto é, uma habilidade de hidrolisar gorduras de várias composições, habilidade de suportar as condições de lavagem relativamente severas (pH 10-11, 30-60 °C), habilidade de resistir a

surfactantes e outras enzimas, como por exemplo proteases, que são ingredientes importantes na formulação de detergentes (Sharma, Chisti *et al.*, 2001).

2.8.2 Biodiesel

O biodiesel é produzido por reação química de transesterificação a ésteres de ácidos graxos e glicerina através da reação com alcoóis, podendo ter a presença de um ácido ou uma base forte ou com catálise (Ranganathan, Narasimhan *et al.*, 2008). A presença de catalisadores químicos para a produção em escala industrial é fator determinante, em virtude do preço do catalisador apropriado (Jaeger e Eggert, 2002). Para tanto, a utilização de lipases estáveis de origem microbiana como catalisador na reação de síntese do biodiesel é alternativa viável, vez que reduz os custos e não gera materiais residuais tóxicos (Fukuda, Kondo *et al.*, 2001).

Vários tipos de álcoois podem ser utilizados na transesterificação mediada por lipases e o rendimento final costuma ser consideravelmente alto (tabela 3). A quantidade de bioetanol obtida ao final do processo, as baixas temperaturas ótima de atuação das enzimas (entre 30 e 40°C, quando comparada às temperaturas altas de reações com base ou ácido forte, entre 60 e 70°C) e a maior facilidade de recuperação do glicerol indicam a grande importância de se desenvolver enzimas capazes de catalisar a reação de transesterificação a alta velocidade e baixos custos (Fukuda, Kondo *et al.*, 2001).

Tabela 3. Reações de transesterificação enzimática usando diferentes tipos de óleos e lipases (Fukuda, Kondo *et al.*, 2001).

Óleo	Álcool	Lipase	Conversão %	Solvente
Peixe	Etanol	<i>C. antártica</i>	100	Não usa
Girassol	Etanol	<i>M. miehei</i> (Lipozima)	86.8 - 99.2	Não usa
Amêndoa	Metanol	<i>P. cepacia</i> (Lipase OS-30)	15	Não usa
	Etanol		72	Não usa
Reciclado de restaurante	Etanol	<i>P. cepacia</i> (Lipase OS-30) + <i>C. antártica</i> (SP435)	85.4	Não usa
Soja	Álcool primário	<i>M. miehei</i> (Lipozima IM-60)	94.8 - 98.5	Hexano
	Álcool secundário	<i>C. antártica</i> (SP435)	61.2 - 83.8	Hexano
	Etanol	<i>M. miehei</i> (Lipozima IM-60)	65.5	Não usa
Girassol	Metano	<i>P. fluorescens</i>	79	Éter de petróleo
	Etanol		82	Não usa

2.8.3 Indústria farmacêutica e química fina

Novos processos catalíticos aplicáveis às indústrias farmacêutica e cosmética devem trazer melhorias significantes na quantidade de produto final obtida, partindo de pequenas concentrações de substratos. Tais avanços buscam reduções nos custos e tempo de processo. Pela utilização de enzimas, tal como as lipolíticas, pode-se chegar a tais resultados, com baixos custos e alta eficiência (Van Beilen e Li, 2002).

Também a atividade de fármacos quirais pode ser influenciada pela utilização de enzimas lipolíticas: produtos como a talidomida cuja atividade é encontrada em um de seus enantiômeros, podem ter sua atividade induzida por seleção enzimática de seu diastereoisômero, promovendo apenas a produção do enantiômero desejado (Margolin, 1993).

2.8.4 Indústria alimentícia

Lipases são responsáveis por aprimorar o sabor ou a textura de determinados alimentos, como na indústria de laticínios, onde são amplamente utilizadas na hidrólise do leite (Saxena, Sheoran *et al.*, 2003). A posição, tamanho da cadeia e grau de insaturação dos ácidos graxos influencia não apenas nas propriedades físicas, como também no valor sensorial de um triglicerídeo (Jaeger e Reetz, 1998).

Na panificação a adição de lipases a massas de pães e bolos aumenta a capacidade de retenção de ar e o aroma, aumentando a vida de prateleira (Saxena, Sheoran *et al.*, 2003).

Além da aplicação direta no processamento, a indústria de alimentos se beneficia também da produção de aditivos por lipases. Entre eles estão os óleos e gorduras estruturados e os surfactantes citados acima e também ésteres do aroma produzidos por síntese enzimática (Gandhi, 1997).

2.8.5 Indústria de papel

Lipases são utilizadas para remover triglicerídeos e ceras, componentes hidrofóbicos da madeira, causadores de problemas na produção do papel (Jaeger e Reetz, 1998).

Também são utilizadas na limpeza do produto acabado, gerando menos resíduos resultando em melhorias técnicas no processo de produção. Os resultados tanto ambientais quanto financeiros da utilização de enzimas de origem microbiana no processo de fabricação de papel são significativos (Van Beilen e Li, 2002).

2.8.6 Outras aplicações

A versatilidade catalítica das lipases proporciona a estas enzimas grande diversidade de aplicações: podem ser utilizadas em perfumaria, diagnósticos médicos ou produção de aromas e fragrâncias, dentre outras aplicações (Sharma, Chisti *et al.*, 2001). Na indústria de couro, lipases podem ser empregadas em conjunto com outras hidrolases para a remoção de gordura subcutânea e pelos (Gandhi, 1997).

Atualmente, o tratamento de resíduos também representa um campo de vasta aplicação para estas enzimas, seja na limpeza de produtos gordurosos, seja na biodegradação de plásticos ou no pré-tratamento de efluentes contendo compostos gordurosos como os gerados em atividades zootécnicas (Hasan, 2006)

2.9 PROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO DE VIBRIOS ASSOCIADOS A CORAIS ENDÊMICOS BRASILEIROS

Vibrios desempenham papel-chave na saúde da vida marinha. Notoriamente, os principais patógenos de cnidários, moluscos, crustáceos e peixes pertencem ao grupo dos vibrios (Austin, Austin *et al.*, 2005; Luna, Biavasco *et al.*, 2007; Sun, Zhang *et al.*, 2007).

A aparente habilidade dos vibrios em causarem doença em um amplo espectro da vida marinha está associada às características genômicas e proteômicas destes microrganismos (Austin e Zhang, 2006).

A reduzida diversidade de espécies de corais brasileiros evidentemente vem sofrendo com a ocorrência de infecções por microrganismos e, estando a estes associada uma grande concentração de vibrios, é relevante identificar e caracterizar possíveis exotoxinas às quais se poderia imputar a ocorrência de tais doenças (Leão, Kikuchi *et al.*, 2003; Alves Jr, Maia Neto *et al.*, 2009).

O conhecimento gerado pelos estudos com exotoxinas de corais não apenas têm relevante valor ecológico; estas substâncias também possuem interesse aplicado à área biotecnológica. O presente estudo parte da análise do DNA genômico de duas espécies de vibrios - *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus* - isolados de espécies de corais formadoras de arrecifes no Brasil, com o propósito de construir bibliotecas genômicas para a prospecção de enzimas de interesse biotecnológico. Especificamente a atividade lipolítica de clone obtido a partir da biblioteca genômica de pequenos fragmentos de DNA do *Vibrio alginolyticus* foi priorizada, em virtude da facilidade de obtenção deste clone e relevante aplicabilidade de tais enzimas.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Prospecção de enzimas com potencial biotecnológico partindo da biblioteca genômica de duas espécies de *Vibrios* isolados de corais endêmicos na costa brasileira, *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Construção de bibliotecas genômicas de pequenos e grandes fragmentos de DNA de vibrios associados a corais endêmicos brasileiros;
- Triagem funcional das bibliotecas para seleção de clones das bibliotecas, em busca de genes para atividades enzimáticas;
- Expressão de gene apresentando atividade lipolítica com importância em sistemas biológicos (Genômica Funcional), isolado da biblioteca genômica de pequenos fragmentos de DNA de *Vibrio alginolyticus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Vibrio alginolyticus, linhagem 40B, foi isolado do coral *Mussismilia braziliensis* apresentando branqueamento. O isolamento foi feito em 6 de abril de 2007 na Reserva Extrativista Marinha de Corumbau, Bahia, sítio Roi-Roi, a 26°C e 4 m de profundidade.

Vibrio harveyi, linhagem 1DA3, foi isolado do octocoral *Phyllogorgia dilatata* doente apresentando necrose, caracterizada por exposição esbranquiçada do esqueleto do coral, em 10 de abril de 2007, no Parque Marinho do Recife de Fora, localizado em Porto Seguro, Bahia, a 4 m de profundidade e 28°C.

O isolamento dos microrganismos foi feito por plaqueamento de amostra de muco dos corais em meio TCBS (Himedia Laboratories, cat. #M189), meio seletivo para o isolamento de *Vibrios*, seguido de identificação molecular das espécies (Alves Jr, Maia Neto *et al.*, 2009).

4.2 SELEÇÃO PARA ATIVIDADES

Os vibrios *V. harveyi* e *V. alginolyticus* foram plaqueados em meio LB ágar (Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989) contendo os substratos de interesse:

- 0,5% (m/v) de amido (Vetec Química fina Ltda. - cód. #299) para teste de amilase;
- 1% (m/v) de Skim Milk (Himedia Laboratories - cód #M530) para teste de protease;
- 1% (v/v) de tributirina (Sigma-Aldrich, INC - cód. #113026) para testes de lipase;

Além destes meios, ainda foi realizado teste para fitase em meio M2: (Hill, Kysela *et al.*, 2007). As placas permaneceram em estufa a 37° *overnight* e após serem retiradas, permaneceram a temperatura ambiente por período suficiente para visualização de halos de degradação (entre 5 a 7 dias).

Como controle para a visualização da atividade hidrolítica em meio de cultura, também microrganismos já descritos na literatura como possuidores das atividades degradativas testadas foram plaqueados em meio de cultura com substrato específico. Para testes de degradação do amido e de tributirina foi utilizado *Paenibacillus* e para teste de atividade proteolítica, foi utilizado *Bacillus subtilis* como controles positivos.

Para os testes de amilase as placas precisam ser colocadas em presença de iodo para a visualização do halo de degradação do amido. Depois de retiradas da estufa, as placas ficaram a temperatura ambiente por sete dias, e foram então reveladas em presença de iodo. A cada um dos meios foi adicionado 20µg/ml de tetraciclina.

Desta forma, pela triagem inicial em cultura pura, pôde-se determinar as atividades presentes em cada uma das espécies, restringindo a posterior busca por clones com atividade nas bibliotecas genômicas de DNA: *Vibrio alginolyticus* é positivo para atividades amilolítica, proteolítica, lipolítica e fítica. *Vibrio harveyi* é positivo para atividades amilolítica, proteolítica e lipolítica.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Os vibrios foram cultivados em meio TSA suplementado com 2,5% NaCl a 30°C *overnight*. Para a extração do DNA genômico, os mesmos foram crescidos em meio TSB suplementado com 2,5% NaCl, a 30°C *overnight*, com agitação (240 rpm).

Seguindo protocolo de extração descrito por (Torsvik, 2004), 500 mL de células crescidas em meio TSB suplementado com 2,5% NaCl foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C, 7230 g. O precipitado foi ressuscitado em 5mL de tampão TE (1mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA), adicionando-se em seguida 500µL de lisozima (20µg/mL) com o intuito de promover a lise celular. Agitou-se gentilmente e as células foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Adicionou-se proteinase K para concentração final de 1mg/mL e incubou-se novamente por 30 minutos a 37°C. As células foram congeladas com gelo seco

acrescido de isopropanol por 40 minutos e descongeladas por igual período a 65°C. Adicionou-se SDS 10% para concentração final de 1% e incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se NaCl para 0,7M e CTAB pré-aquecido a 65°C para concentração final de 10%. Incubou-se por 15 minutos a 65°C. Adicionou-se clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1) em quantidade igual ao conteúdo do frasco, misturando gentilmente por 10 minutos e centrifugou-se por 20 minutos a 4°C, 7230 g. Transferido o sobrenadante para novo tubo, adicionou-se isopropanol em volume igual ao contido no frasco. O mesmo foi deixado em repouso a temperatura ambiente por 20 minutos, seguido de centrifugação por 30 minutos a 4°C, 7230 g. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 500µL de TE (Tris-EDTA). Adicionou-se RNase A para concentração final de 0,5mg/mL seguido de incubação por 30 minutos a 37°C. Adicionou-se fenol clorofórmio em volume igual ao conteúdo de frasco. Gentilmente inverter o frasco. Centrifugou-se por 2 minutos a 12.000 g e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Repetir a centrifugação. Adicionou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e seguido de centrifugação por dois minutos a 12.000 g. Repetir a adição de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1) e etapa de centrifugação. Precipitou-se a amostra colocando o frasco em gelo adicionando etanol 100% gelado (2,5 vezes o volume contido no frasco) e 0,3M de acetato de sódio. Aguardar 30 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos, 15.000 g, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, o *pellet* foi lavado por duas vezes com etanol 70% gelado e deixado secar até evaporar todo o etanol. O *pellet* foi ressuspendido em água MilliQ.

O protocolo foi utilizado na extração do DNA de ambos os vibrios: para *Vibrio harveyi*, o DNA resultante foi utilizado na construção de duas bibliotecas, de pequenos e grandes insertos, e com o DNA resultante da extração do *Vibrio alginolyticus*, construiu-se a biblioteca de pequenos insertos. O produto da extração de DNA foi confirmado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

4.4 BIBLIOTECAS GENÔMICAS

4.4.1 Biblioteca de pequenos insertos de DNA

Para a construção da biblioteca de pequenos fragmentos de DNA, foi utilizado o plasmídeo pCF430 (Newman, 1999) presente em múltiplas cópias por célula.

Após extração do DNA, por ação da endonuclease de restrição *Pst*I (Promega, EUA), presente no Múltiplo Sítio de Clonagem de pCF430 (Figura 2), foram realizadas digestões parciais do DNA genômico utilizando 1 μ L de tampão H 10X (Promega, EUA), 1 μ L de enzima *Pst*I 10U/ μ L (Promega, EUA, cat. #R611) e 1 μ L de soroalbumina bovina (BSA) à concentração final de 0.1mg/mL.

Após o período de 3 horas de digestão, a enzima foi inativada por 15 minutos a 70°C.

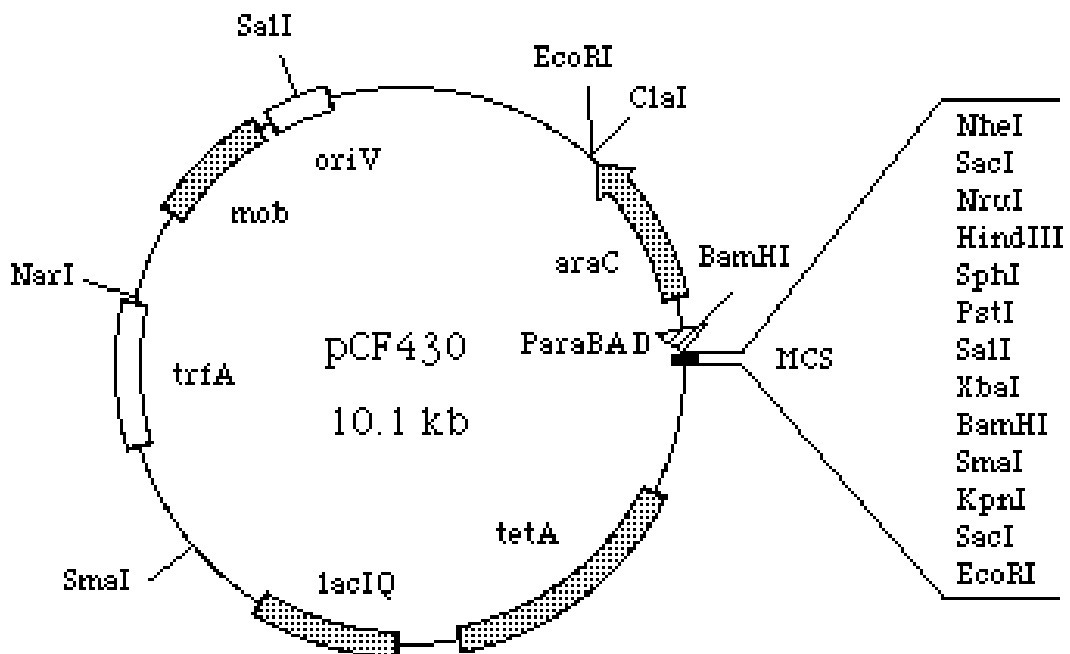


Figura 2. Mapa do vetor pCF430 utilizado na clonagem dos fragmentos resultante da digestão do DNA genômico com a endonuclease de restrição *Pst*I.

Procedeu-se eletroforese em gel de agarose *low melting*, com tampão de corrida TAE 1X (40mM de Tris base; 40mM de ácido acético e 1mM de EDTA) para seleção de tamanho do DNA apropriado a ser clonado no vetor. Os fragmentos com tamanhos entre 2 e 8kb foram excisados e eluídos do gel de agarose utilizando kit UltraCleanTM15 DNA Purification (MoBio Laboratories Inc., cat. #12100-300). Estes posteriormente foram ligados ao vetor pCF430 (Newman, 1999) desfosforilado e linearizado. O sistema de ligação foi feito com 1 μ L de enzima T4 Ligase 1U/ μ L (Promega, EUA), 10ng de DNA,

10ng do vetor pCF430 (Newman, 1999), 1 μ L de tampão H 10X (Promega, EUA), volume final de 20 μ L, de acordo com protocolo dos fabricantes.

O sistema de ligação permaneceu por 16 horas a 16°C. Após a reação, a enzima T4 Ligase foi inativada a 65°C, por 15 minutos.

A amostra foi dializada por meia hora em membrana de nitrocelulose 0,025 μ m (Millipore) e as células transformadas por eletroporação em cuveta Gene Pulse[®] Cuvette (Bio-rad Laboratories, Inc.) previamente resfriada em gelo, utilizando as células competentes da cepa *E. coli* EPI300 (Epicentre Technologies, Madison, WI). Fez-se uso do eletroporador Gene Pulsed[®] (Bio-rad Laboratories, Inc.), ajustado para os seguintes parâmetros: capacitância 25 μ F; resistência 200 Ω e 700 Ω e voltagem 2.5 Kv. Às células eletroporadas foi adicionado 1mL de meio de cultura SOC (Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989) contido em tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e homogeneizada. Após incubar por uma hora a 37°C, as células foram plaqueadas em meio LB ágar (Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989) contendo antibiótico tetraciclina (20 μ g/mL) e as placas deixadas em estufa *overnight* a 37°C.

Para confirmação do tamanho dos insertos, 12 clones foram escolhidos aleatoriamente e destes fez-se extração do DNA plasmidial utilizando protocolo *Best Miniprep Protocol Ever*, desenvolvido pelo Laboratório da Dr^a Jo Handelsman – Universidade de Wisconsin-Madison, E.U.A., seguida de digestão parcial utilizando a endonuclease de restrição *Pst*I, para liberação dos insertos.

Pelo protocolo de miniprep utilizado, os doze clones foram inoculados em 5mL de meio LB cada um, e incubados por 16 horas a 37°C, com agitação (240 rpm). O líquido resultante foi então centrifugado em tubos de 1,5mL por 3 minutos, 10.000 g, para formação de *pellet*. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 250 μ L de tampão P1 (Qiagen, Chatsworth, CA). Inverteu-se os tubos de 4 a 6 vezes e adicionou-se 250 μ L de tampão P2 (Qiagen, Chatsworth, CA). Inverteu-se gentilmente de 4 a 6 vezes os tubos e adicionou-se 350 μ L de tampão N3 (Qiagen, Chatsworth, CA). Novamente inverteu-se os tubos gentilmente, seguido da adição 100 μ L de clorofórmio (Sigma-Aldrich, INC). Inverteu-se os tubos gentilmente, tendo sido os mesmos resfriados em gelo por cinco minutos. Centrifugou-se por 10 minutos a 16.100g. 750 μ L do sobrenadante foi coletado e colocado em novo tubo. Adicionou-se 75 μ L de acetato de sódio 3M, pH 5.2 e 750 μ L de isopropanol gelado, deixando resfriar em gelo por meia hora. Centrifugou-se por 25 minutos a 16.100g. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1mL de etanol 70%.

Centrifugou-se por 5 minutos a 16.100g. Descartado o sobrenadante, a adição de etanol 70% e a etapa de centrifugação foram repetidas. Novamente descartou-se o sobrenadante, eliminando os resquícios de etanol da amostra. Ressuspendido então o *pellet* com água MilliQ.

O DNA foi digerido com endonuclease de restrição *Pst*I utilizando 1µL de tampão H 10X (Promega, EUA), 1µL de enzima *Pst*I 10U/µL (Promega, EUA, cat. #R611), 1µL de soroalbumina bovina (BSA) à concentração final de 0.1mg/mL e 10ng de DNA, com volume final de 10µL.

A reação permaneceu por 16 horas a 37°. Após o período de digestão, a enzima foi inativada por 15 minutos a 70°C. A digestão foi confirmada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

4.4.1.1 *Preparo de células eletrocompetentes*

As células eletrocompetentes utilizadas na construção das bibliotecas de pequenos insertos, EPI300, foram feitas de acordo com protocolo desenvolvido pelo Laboratório da Dr^a Jo Handelsman – Universidade de Wisconsin-Madison, E.U.A.: uma colônia da cepa de *Escherichia coli* EPI300 foi inoculada em 5mL de meio LB sob agitação (240 rpm) a 37°C, por 16 horas. Inocular os 5mL em 500mL de meio SOB e cultivar sob agitação (240 rpm) a 37°C, até atingir $Abs_{600} = 0,5$. As células foram então transferidas para tubos previamente resfriados e centrifugadas a 7230 g por 10 minutos a 2°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano ressuspendido em 5mL de glicerol 10% estéril, atentando para o fato de que as células devem ser mantidas sempre no gelo até o final do processo. Depois de ressuspendidas, as células foram novamente centrifugadas (7230 g por 10 minutos a 2°C), o sobrenadante novamente descartado e a lavagem com glicerol 10% estéril repetida. As células foram novamente centrifugadas e o sedimento ressuspendido em 2mL de glicerol 10% estéril. Estas foram então divididas em alíquotas de 50µL, e congeladas a -80°C.

A eficiência da transformação das células foi estimada em 10^8 transformantes por µg de DNA.

4.4.2 Biblioteca de grandes insertos de DNA

O DNA de *Vibrio harveyi* foi purificado em eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, Bio-rad Laboratories, Inc.) em agarose *low melting* e tampão TAE a 0,5%. O tamanho do fragmento de DNA a ser clonado, maior que 30kb, foi identificado com auxílio do marcador MidRang II (New England Bio Labs). Os parâmetros para a corrida do gel foram ângulo de 120°, voltagem de 9V/cm, temperatura de 14°C, com evolução dos pulsos inicial e final 0,5 segundos, por 5 horas.

O DNA foi recuperado do gel utilizando o kit GELase (Epicentre Technologies, Madison, WI, cat. #G09200) de acordo com protocolo dos fabricantes e posteriormente clonado no vetor de escolha pCC1FOS™. O processo de clonagem foi realizado com kit comercial CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (Epicentre Technologies, Madison, WI, cat. #CCFOS059).

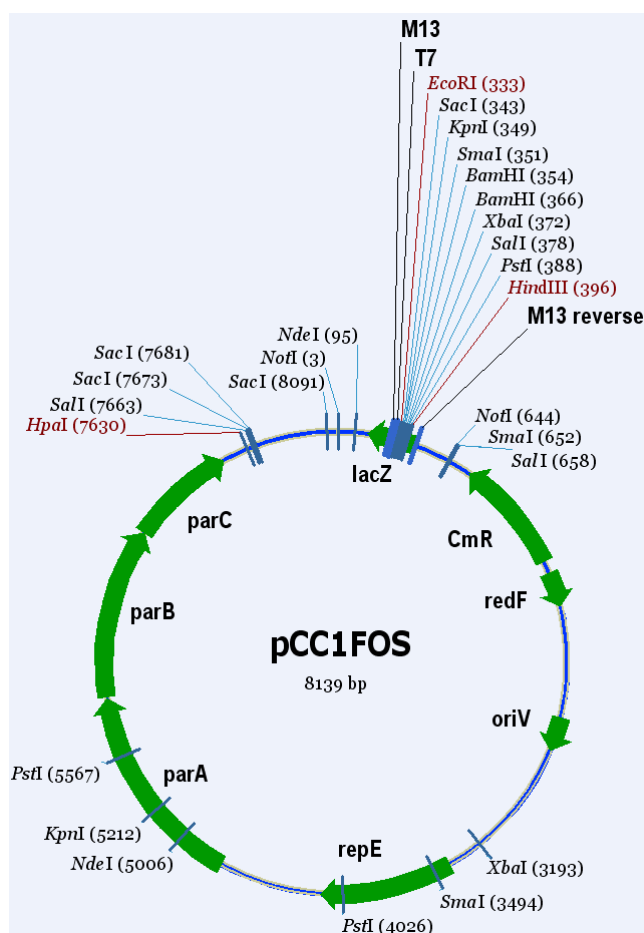


Figura 3. Mapa do vetor pCC1FOS™ utilizado na clonagem dos fragmentos resultante da digestão do DNA genômico com a endonuclease de restrição *NotI*.

Para o processo de clonagem, o DNA teve suas pontas polidas com *End-Repair Enzime Mix*, cuja reação continha 4 μ L de enzima *End-Repair*, 8 μ L 10mM ATP, 8 μ L 2,5mM dNTP mix, 8 μ L Tampão *End-Repair* 10X, 52 μ L de DNA (aproximadamente 1 μ g/ μ L), com volume final de 80 μ L.

O sistema foi incubado por 45 minutos a temperatura ambiente, e a enzima inativada por 15 minutos a 70°C. Este volume foi posteriormente precipitado em gelo com acetato de sódio 3M, pH 7,0, em quantidade igual a 1/10 do volume contido no tubo, e etanol 100% gelado, 2,5 vezes o volume contido no tubo, por duas horas. O material foi então centrifugado por 20 minutos a 15.000 x g e o *pellet* resultante ressuspendido em 6 μ L de água MilliQ.

Uma vez polidas as seqüências finais do DNA, este foi ligado no vetor fosmídeo em sistema contendo 1 μ L de tampão de ligação *Fast-Link* 10X, 1 μ L de 10mM ATP, 1 μ L do vetor *CopyControl pCC1FOSTM*, 1 μ L de *Fast-Link* DNA Ligase e 6 μ L de DNA. A ligação foi feita a temperatura ambiente por 2 horas e a enzima posteriormente inativada a 70°C por 15 minutos.

As células competentes a serem utilizadas foram preparadas partindo da cepa de *E. coli* EPI300. Primeiramente foi plaqueada alíquota de *E. coli* EPI300 armazenada a -80°C, em meio LB-ágar por 16 horas a 37°C. Uma colônia isolada foi transferida para 5mL de meio LB contendo 10mM de MgSO₄ e crescida por 16 horas a 37°C, com agitação (240 rpm). Este inóculo foi adicionado a 50mL de LB contendo 10mM de MgSO₄, colocado sob agitação a 37°C e o crescimento das células foi acompanhado até atingir densidade óptica (OD₆₀₀) de aproximadamente 0.8.

Aos 10 μ L do sistema de ligação foram adicionados 50 μ L de *MaxPlax Lambda Packing Extract* em duas etapas: primeiramente 25 μ L que, após gentil agitação, deverão ser incubado a 30°C por 90 minutos, seguindo da adição dos 25 μ L restantes, e de nova etapa de incubação nos mesmos padrões anteriores de tempo e temperatura. Terminado o segundo período de incubação, completar o volume no tubo para 1mL com tampão *Phage Dilution* e adicionar posteriormente 25 μ L de clorofórmio.

Cada 10 μ L da reação foi misturado a 100 μ L de células competentes e incubadas por 40 minutos a 37°C, para que ocorresse a infecção. As células infectadas foram então plaqueadas em meio LB-ágar contendo 12,5 μ g/mL de antibiótico cloranfenicol e permaneceram em estufa por 16 horas a 37°.

Foram estimadas 19.849 colônias e, destas, 10 foram selecionadas aleatoriamente para fazer extração do DNA plasmidial, tendo sido utilizado o protocolo *Best Miniprep Protocol Ever*. Destes clones foi feita então uma digestão utilizando 1µL de endonuclease de restrição *NotI* (New England Biolabs), 2µL de tampão D 10X, 1µL de BSA 10X e 15µL de DNA, incubada a 37°C por 16 horas. Estes foram então aplicados em gel PFGE, agarose 1% em tampão TBE. Os parâmetros da corrida foram ângulo de 120°, voltagem de 6V/cm; evolução dos pulsos inicial 0,5 e 1,5 final, temperatura 14°C, por 10 horas. A digestão dos produtos de extração de DNA plasmidial foram confirmados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

4.5 TRIAGEM FUNCIONAL DE CLONES COM ATIVIDADE

Uma triagem embasada na funcionalidade de clones foi realizada. As bibliotecas de pequenos fragmentos de DNA foram utilizadas para seleção de clones com atividade enzimática de lipase, protease e amilase. Diluições das bibliotecas foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo 1% (v/v) de tributirina (Sigma-Aldrich, INC.) para testes de lipase, 1% (m/v) de Skim Milk (Himedia Laboratories) para teste de protease ou 0,5% (m/v) de amido (Vetec Química fina Ltda.) para testes de amilase. Nestes meios ainda adicionou-se 20 µg/mL de tetraciclina e 0,02% do indutor da expressão gênica L(+) arabinose (m/v), polissacarídeo que induz o promotor do plasmídeo de escolha, pCF430. Utilizou-se *Bacillus subtilis* como controle positivo e *E. coli*, cepa EPI300, como controle negativo para validação dos testes enzimáticos.

A biblioteca de grandes fragmentos de DNA foi utilizada para seleção de clones com atividade enzimática de lipase e protease. A biblioteca diluída em meio LB foi plaqueada em meio LB-ágar contendo 1% (v/v) de tributirina (Sigma-Aldrich, INC.) para testes de lipase ou 1% (peso/volume - m/v) de Skim Milk (Himedia Laboratories) para teste de protease. Nestes meios ainda foi acrescentado 12,5µg/mL do antibiótico cloranfenicol.

Testes de diluição em série foram feitos para determinar qual a melhor quantidade a ser plaqueada, para cada uma das bibliotecas. As diluições testadas foram 1:10⁴, 1:10⁵ e 1:10⁶. Os melhores resultados, que corresponderam a uma grande quantidade de colônias

isoladas por placa, foram, para as bibliotecas de pequenos insertos, as diluições 1:10⁵ para *Vibrio harveyi* e 1:10⁶ para *Vibrio alginolyticus*, e a diluição 1:10⁴ para a biblioteca de grandes insertos de *Vibrio harveyi*.

Por placa espalhou-se 20µL da diluição das bibliotecas, com mais 300µL de LB líquido, utilizado para ajudar a distribuir a diluição da biblioteca por toda a superfície da placa de Petri. Foram usadas placas de 150x15 mm, e os clones crescidos *overnight* a 37°C em estufa. Após esse período, as placas foram deixadas em temperatura ambiente até que halos de degradação pudessem ser visualizados. Para a detecção de atividade amilolítica, após sete dias de crescimento em temperatura ambiente, as placas foram reveladas com iodo (Vetec Química fina Ltda.), permitindo a visualização do halo de degradação do amido.

4.6 CLONE Lip_ *alg1* e GENE Lip_1

Um clone positivo para atividade lipolítica, denominado Lip_ *alg1*, isolado da biblioteca de pequenos insertos de *V. alginolyticus* foi selecionado para ser caracterizado quanto a suas propriedades físico-químicas.

4.6.1 Análise de Sequências

As sequências de Lip_ *alg1* foram analisadas usando o software MEGA versão 4.0 (Tamura, Dudley *et al.*, 2007) e as sequências alinhadas usando o programa para múltiplos alinhamentos ClustalW, tendo sido posteriormente ajustados o alinhamento manualmente. A árvore de distância foi construída a partir de dados gerados pelo método Neighbor Joining (NJ), com 1.000 repetições de bootstrap para verificação da topologia das árvores.

Para a região identificada como possível lipase, primers específicos foram desenhados com intuito de amplificar a região específica para atividade lipolítica e ligar a vetor apropriado para expressão de proteína recombinante em *E. coli*.

4.6.2 Vetor de expressão em *E. coli* pET21a(+)

Existem diversas opções de vetores a serem utilizados para expressão induzida de proteínas recombinantes em *E. coli*. Foi utilizado um vetor pET (Plasmid for expression by T7 RNA Polimerase), cuja expressão está sob o controle do promotor de transcrição bacteriófago T7 que é reprimido pela região operadora *lac* onde se liga o repressor *lac*. Para a utilização deste vetor é preciso transformá-lo em uma célula que possua o gene da T7 polimerase no cromossomo, como é o caso da *E. coli* BL21 (DE3).

O vetor pET21a(+) (Novagen[®]) foi utilizado para expressão da proteína em *E. coli*, sendo a indução da expressão feita por IPTG. Contém o promotor T7, terminador T7, múltiplo sítio de clonagem, sequência que codifica uma cauda N-terminal contendo 6 histidinas (6xHisTag), sendo resistente à ampicilina (Amp^R).

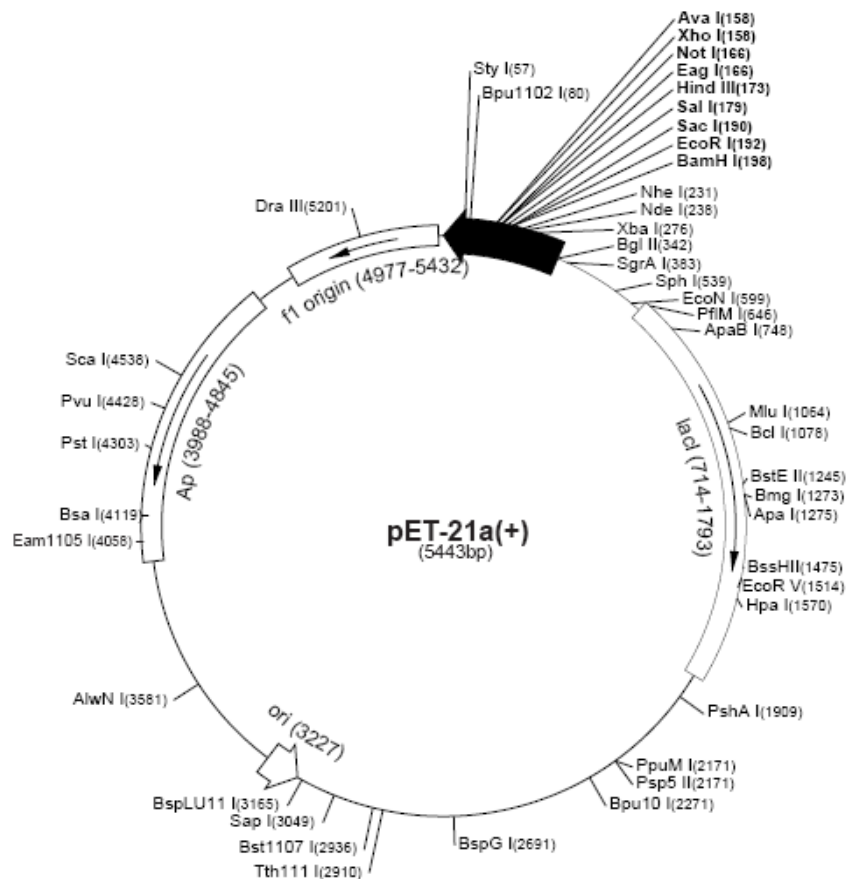


Figura 4. Mapa físico do vetor de expressão pET-21a(+).

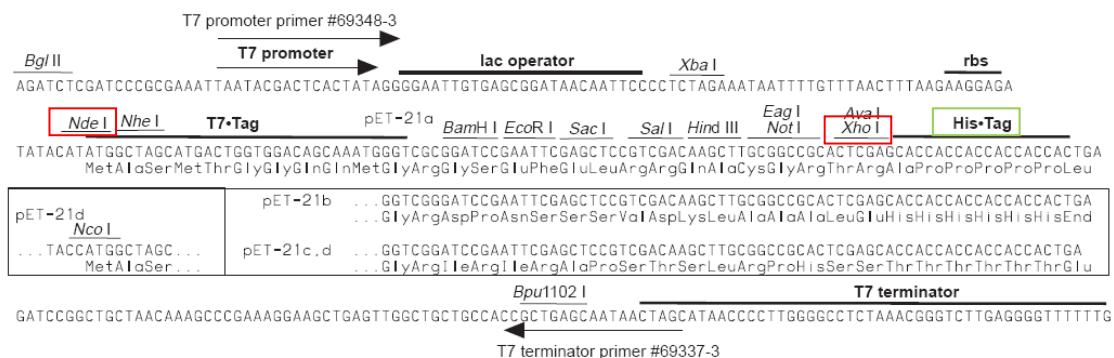


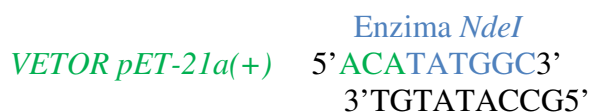
Figura 5. Região de múltipla clonagem do vetor pET-21a(+). O gene Lip_1 foi clonado entre os sítios de *NdeI* e *XhoI* (Promega, EUA) do vetor pET21a(+). Em verde, a sequência da cauda de histidinas em C-terminal.

4.6.3 Desenho de primers e reação em cadeia da polimerase PCR da região específica

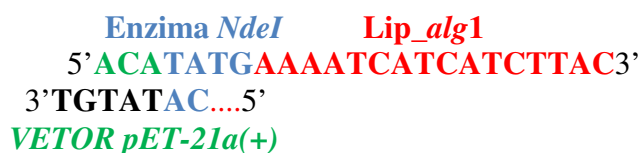
Primers específicos que flanqueiam a região do genoma referente à lipase putativa foram desenhados com adição de sítios de restrição das enzimas *XhoI* (CTCGAG) e *NdeI* (CATATG) (Wei, Bai *et al.*, 2009), para permitir sua posterior ligação ao vetor de escolha pET-21a(+).

Para o desenho do primer **forward**, foram observados:

1. Os sítios de ligação para a enzima *NdeI* no vetor:



2. Região de ligação da sequência do clone no vetor, com adição do sítio de restrição para a enzima *NdeI* em Lip_1:



3. Para tanto, o primer deve possuir a região que flanqueia a porção do genoma referente à lipase putativa deve conter o sítio de restrição para a enzima *NdeI*:

**PRIMER TTTACATATG
AAATGTATAC**

4. O primer forward para o gene *Lip_1*, portanto, possui a seguinte sequência

Primer GeneLip_alg1F 5' TTTACATATG AAAATCATCATCTTAC 3'

Para o desenho do primer **reverse**, foram observados:

1. Os sítios de ligação para a enzima *XhoI* no vetor:

Enzima XhoI
VETOR pET-21a(+) 5' **CACTCGAGCACCACC3'**
3' **GTGAGCTCGTGGTGG5'**

2. Região de ligação da sequência do clone no vetor, com adição do sítio de restrição para a enzima *XhoI* em *Lip_alg1* e cauda N-terminal de histidina (*His+Tag*), tendo em vista proceder a purificação da proteína:

Enzima XhoI His+Tag Códon de terminação
Lip_alg1 **CTCGAGCACCACCACCACCCTGA**
GAGCTCGTGGTGGTGGTGGTGGTACT
Sequência complementar

3. O primer deve possuir a sequência complementar da região que flanqueia a porção do genoma referente à lipase putativa, para promover o anelamento e amplificação no sentido 3' – 5' do gene pretendido. Deve conter a sequência complementar ao sítio de restrição para a enzima *XhoI*:

5'**GATTATTTCCGTCGA** 3' **Lip_alg1**
 3'CTAATAAAGGCAGCTGAGCTCAGAC
 ←

Sequência complementar a Lip_alg1 + Sítio da enzima *XhoI*

Sítio da enzima *XhoI*

5'**CAGACTCGAG**3'
 3'**GTCTGAGCTC**5'

Sequência nucleotídica anterior ao sítio de XhoI no vetor pET-21a(+)

4. O primer **reverse** para o gene Lip_1, portanto, possui a seguinte sequência

Primer GeneLip_alg1R 5'CAGACTCGAGTCGACGGAAATAATC3'

Por PCR, utilizando os primers específicos para a região codificante do gene de lipase de Lip_alg1, a região de interesse foi amplificada. A reação de PCR foi feita com 2µL de tampão 10X *Taq* polimerase; 2µL de 2,5mM de dNTPs; 1µL de Primer GeneLip_alg1R e GeneLip_alg1 5pmol/µL, 10ng de DNA, 1µL de BSA 10X, 5 U de *Taq* polimerase, em um volume final de 20µL, tendo-se confirmado o resultado da amplificação em gel de agarose 1%.

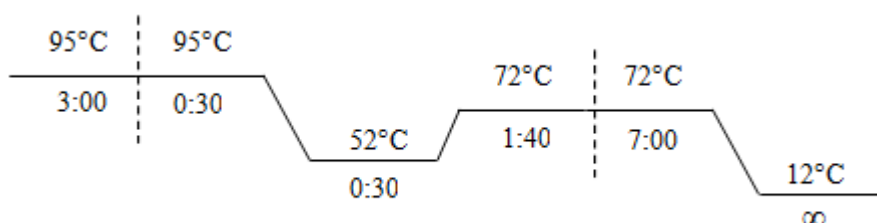


Figura 6. Parâmetros de temperatura e tempo da reação de PCR utilizando os primers específicos para a região codificante do gene de lipase de Lip_alg1.

O produto da amplificação, denominado Lip_1, foi purificado por protocolo caseiro: ao volume final do produto de PCR adicionou-se solução de NaI (Iodeto de Sódio) 6M em quantidade igual a três vezes o volume do produto de PCR. Adicionou-se 15µL de sílica em NaI 3M (protocolo anexo), agitou-se, deixando a temperatura ambiente por 10 minutos, vertendo constantemente para a resina não precipitar. Centrifugou-se por 15

minutos a 16.100g e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendido o *pellet* em solução contendo NaCl 50mM, Tris-HCl 10mM e EDTA 25mM. Centrifugou-se novamente por 15 minutos a 16.100g e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se a lavagem e a centrifugação, descartando novamente o sobrenadante. Ressuspendido o *pellet* em 20μL de TE, incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 1 minuto a 16.100g e separou-se o sobrenadante. Armazenou-se a 20°C. O produto da purificação foi confirmado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

4.6.4 Digestão do plasmídeo e gene

O fragmento amplificado Lip_1 e o plasmídeo de escolha pET21a(+) (Novagen) foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI*, para possibilitar a ligação do gene ao vetor de clonagem. A digestão dupla foi feita de acordo com 2 μL de Tampão D 10X (Promega, EUA), 1μL de enzima *XhoI* 10u/μl (Promega, EUA, cat. #R6161), 1μL de enzima *NdeI* 10u/μl (Promega, EUA, cat. #R6801), 10ng de DNA (produto de PCR ou pET21a(+)), reação com volume final de 20μL, a 37°C, por 16 horas.

As enzimas foram escolhidas pela presença de sítios de clivagem no múltiplo sítio de clonagem do vetor, não estando presentes, no entanto, na sequência do gene em estudo.

Ao término do tempo de digestão, a enzima foi inativada a 65°C por 15 minutos. Vetor e gene digeridos foram confirmados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.6.5 Reações de ligação

A ligação ao vetor de clonagem foi feita em duas reações: 2μL de pET21a(+) (Novagen), 2μL de Tampão Ligase 10X (Promega, EUA), 1μL de enzima T4 Ligase 1U/μL (Promega, EUA), 10ng do produto de PCR digerido com as enzimas *XhoI* e *NdeI*, reação com volume final de 20μL.

As reações de ligação permaneceram a 16°C por 16 horas. A enzima ligase foi inativada por 15 minutos a 65°C. A amostra foi dializada por meia hora em membrana de nitrocelulose 0,025µm (Millipore) antes de ser transformada em células eletrocompetentes de *E. coli* da cepa BL21 (DE3).

4.6.6 Preparo de células eletrocompetentes

As células competentes utilizadas no sistema de expressão, BL21(DE3), foram preparadas de acordo com protocolo desenvolvido no laboratório pelo Laboratório da Dr^a Jo Handelsman – Universidade de Wisconsin-Madison, E.U.A.: uma colônia da cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen) foi inoculada em 5mL de meio LB sob agitação (240 rpm) a 37°C, por 16 horas. Inocular os 5mL em 400mL de meio SOB e cultivar sob agitação (240 rpm) a 37°C, até atingir Abs₆₀₀= 0,5. As células foram então transferidas para tubos previamente resfriados e centrifugadas a 7230 g por 10 minutos a 2°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano ressuspensionado em 5mL de glicerol 10% estéril, atentando para o fato de que as células devem ser mantidas sempre no gelo até o final do processo. Depois de ressuspensionadas, as células foram novamente centrifugadas (7230 g por 10 minutos a 2°C), o sobrenadante novamente descartado e a lavagem com glicerol 10% estéril repetida. As células foram novamente centrifugadas e o sedimento ressuspensionado em 2mL de glicerol 10% estéril. Estas foram então divididas em alíquotas de 50µL, e congeladas a -80°C.

A eficiência da transformação das células foi estimada em 10⁶ transformantes por µg de DNA.

4.6.7 Transformação em BL21 (DE3)

Na transformação foi utilizado 1µL da ligação. O vetor ligado ao inserto foi transformado por eletroporação em células competentes de *E. coli* da cepa BL21 (DE3) (Novagen) em cuveta Gene Pulse[®] Cuvette (Bio-rad Laboratories, Inc.) previamente

resfriada em gelo. Fez-se uso do eletroporador Gene Pulsed[®] (Bio-rad Laboratories, Inc.), ajustado para os seguintes padrões: capacitância 25 μ F; resistência 200 Ω e 700 Ω e voltagem 2.5 kV. Às células eletroporadas foi adicionado 1mL de meio de cultura SOC contido em tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. As células em meio SOC foram coletadas da cuveta, adicionadas em tubo de microcentrifuga de 1,5mL e permaneceram a 37°C por uma hora. Após o período de incubação, as células foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB ágar (Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989) adicionado de antibiótico ampicilina (100 μ g/mL) e 1% (v/v) de tributirina (Sigma-Aldrich, INC - cód. #113026). As placas permaneceram em estufa *overnight* a 37°C.

4.6.8 Verificação da presença do inserto

Oito colônias resultantes da transformação em BL21 (DE3) foram aleatoriamente escolhidas para confirmação da presença de inserto. Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

Com o produto de uma das extrações de DNA plasmidial foi feita nova PCR utilizando os primers específicos para o gene de lipase, com o intuito de confirmar a amplificação da região de interesse. A reação de PCR foi feita com 2 μ L de tampão 10X *Taq* polimerase; 2 μ L de 2,5mM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂; 1 μ L de Primer GeneLip_alg1R e GeneLip_alg1F 5pmol/ μ L, 10ng de DNA, 1 μ L de BSA 10X, 5 U de *Taq* polimerase, em um volume final de 20 μ L. O resultado foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Este clone recombinante foi escolhido para indução e expressão da proteína.

O vetor de escolha pET21a(+) e Lip_1 foram digeridos utilizando a enzima de restrição *Pst*I (Promega, EUA), para confirmar a eficiência da clonagem. Possuindo sítio de restrição para a enzima de escolha, as duas amostras serão linearizadas sendo possível visualizar uma diferença de aproximadamente 1kb entre o produto das duas reações de digestão, indicando a presença do inserto pós clonagem. Também foi amplificado o gene Lip_1 com primers específicos para a região de interesse.

Tanto o vetor intacto quanto Lip_1 foram digeridos de acordo com a seguinte reação: 1 μ L de tampão H 10X (Promega, EUA), 1 μ L de enzima *Pst*I 10U/ μ L (Promega,

EUA, cat. #R611) e 1µL de soroalbumina bovina (BSA) à concentração final de 0.1mg/mL, com volume final de 10µL.

4.7 INDUÇÃO E EXPRESSÃO

O clone Lip_1/pET21a (+) foi inoculado em 5mL de meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina e 2% de glicose, permanecendo sob agitação (240 rpm) a 37°C por 16 horas. Os 5mL foram inoculados em 100mL de meio LB e cultivados sob agitação (240 rpm, 37°C), até atingir OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,4. A expressão da proteína foi induzida por adição de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactospiranosídeo) na concentração final de 1mM. A cultura foi mantida a 37°C com agitação (240 rpm) por 3 horas. Alíquotas de 100µL foram coletadas nos tempos 0 (antes da indução) e após 1 hora, 2 horas e 3 horas da adição de IPTG sendo que a cada coleta de amostras, procedeu-se a quantificação das células crescidas por absorbância 600nm, com o intuito de padronizar a quantidade de celular por poço no gel SDS-PAGE 12%. Estas células foram centrifugadas (3 minutos a 16.100g) e o sobrenadante foi descartado tendo sido então armazenadas a -20°C até a utilização por análise em gel *SDS-PAGE*.

Um inóculo com o vetor pET21a (+) foi feito nas mesmas concentrações e condições de Lip_1/pET21a (+) tendo sido este igualmente cultivado em 100mL de meio LB sob agitação (240 rpm, 37°C) e adicionado mesma concentração final de IPTG, sendo usado como um controle negativo. Foram coletadas alíquotas destas células em crescimento para análise e verificação da indução em gel *SDS-PAGE*.

As amostras foram ressuspensas em 7,5µL de H₂O e 7,5µL de tampão de corrida 5X, aquecidas a 100°C por 10 minutos e aplicadas em gel de acrilamida SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Eletrophoresis*).

4.8 ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR POR SDS-PAGE

O resultado da cinética de indução por análise da massa molecular foi realizada em gel de acrilamida SDS-PAGE a 12.5%, de acordo com o protocolo de (Laemmli, 1970).

Foram feitos mini-géis utilizando o *Mini-Proteome* SDS-PAGE (Bio-rad Laboratories, Inc.). O gel separador foi feito com 2mL de solução de acrilamida/bisacrilamida (29:1) a 30%, 1,23mL de tampão Tris pH 8,8 (1,5M tris-hidroximetil-aminometano, 0,4% SDS, pH corrigido para 8,8 com HCl 1M), 1,70mL de água destilada, 50 μ L de Persulfato de amônio 10% e 3 μ L de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina). O gel de empilhamento foi feito utilizando 0,42mL de solução de acrilamida/bisacrilamida (29:1) a 30%, 0,34mL de tampão Tris pH 6,8 (1M tris-hidroximetil-aminometano, 0,4% SDS, pH corrigido para 6,8 com HCl 1M), 1,75mL de água destilada, 25 μ L de Persulfato de amônio 10% e 3 μ L de TEMED. A corrida foi realizada a 200mV e 70mA por 40 minutos.










Para comparação das massas moleculares, foram aplicados 5 μ L do marcador Fermentas (*Unstained Protein*). Após a corrida, o gel foi corado em solução azul de Coomassie R-250 e descorado em solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial em água destilada.

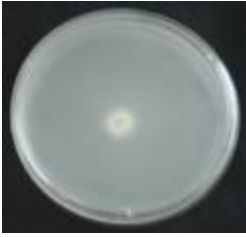

5. RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO PARA ATIVIDADES

Uma triagem inicial com o DNA genômico dos vibrios *V. harveyi* e *V. alginolyticus* foi feita em placas de Petri contendo meio de cultura LB-ágar acrescido dos substratos de escolha para seleção da atividade enzimática. Os resultados para presença de atividade nos meios testados foi resumido na tabela abaixo:

Tabela 4. A) Teste em meio com amido 0,5% (m/v) para detecção da atividade de amilase, B) Teste em meio contendo Skim Milk 1% (m/v) para detecção da atividade de protease, C) Teste em meio com tributirina 1% (v/v) para detecção da atividade de lipase, D) Teste em meio com ácido fítico para detecção da atividade de fitase. O crescimento da colônia é indicativo de atividade do organismo neste meio.

Atividade	Controle positivo	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
A) Amilase	 <i>Paenibacillus</i>		
B) Protease	 <i>Bacillus subtilis</i>		
C) Lipase	 <i>Paenibacillus</i>		

D) Fitase	-	 Positivo	 Negativo
--------------	---	---	--

5.2 BIBLIOTECA DE PEQUENOS INSERTOS DE DNA

O DNA de cada um dos vibrios foi digerido parcialmente, produzindo fragmentos de tamanhos compatíveis com o vetor de clonagem escolhido, pCF430. O produto da digestão foi então corrido em gel de agarose *low melting* 1%, em tampão TAE, a baixa voltagem. Aqueles com tamanho entre 2 e 8 kb foram excisados do gel e purificados utilizando kit UltraClean™15 DNA Purification (MoBio Laboratories Inc., cat. n° 12100-300). Parte do DNA recuperado foi aplicado em gel de agarose 1%, com tampão TBE e corado com brometo de etídeo, para verificar a eficiência da purificação. O restante do DNA purificado foi ligado ao plasmídeo linearizado usando a enzima T4 Ligase (Promega, EUA), de acordo com protocolo dos fabricantes e, posteriormente, transformado em *E. coli* da cepa EPI300.

A biblioteca do *Vibrio alginolyticus* possui 19.849 clones e a biblioteca do *Vibrio harveyi* possui 20.247 clones. Todos os clones foram crescidos em meio LB e posteriormente armazenados a -80°C com 20% de glicerol. Com 12 clones de cada um dos vibrios foi feita extração plasmidial, para verificação da inserção do fragmento no vetor e determinação de seu tamanho (Figura 7 e 8).

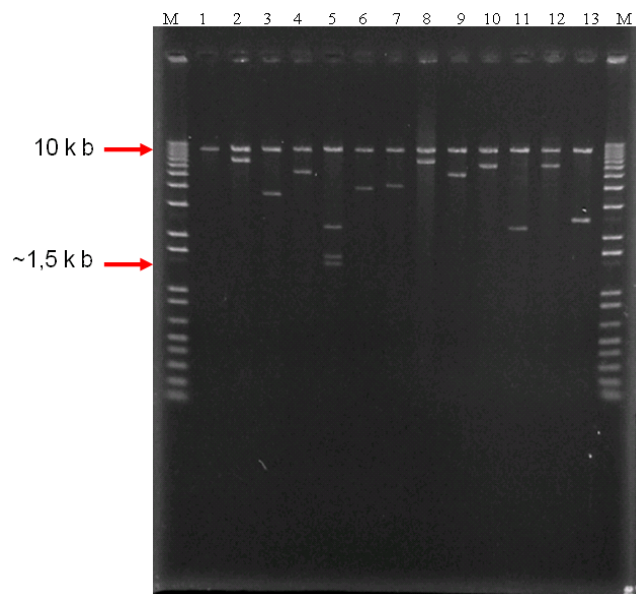


Figura 7. Gel de agarose com 12 clones da biblioteca de pequenos insertos de DNA de *Vibrio harveyi*. M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Plasmídeo linearizado com a enzima *Pst*I. 2 a 13. Clones com diferentes insertos de tamanho médio 4.958kb.

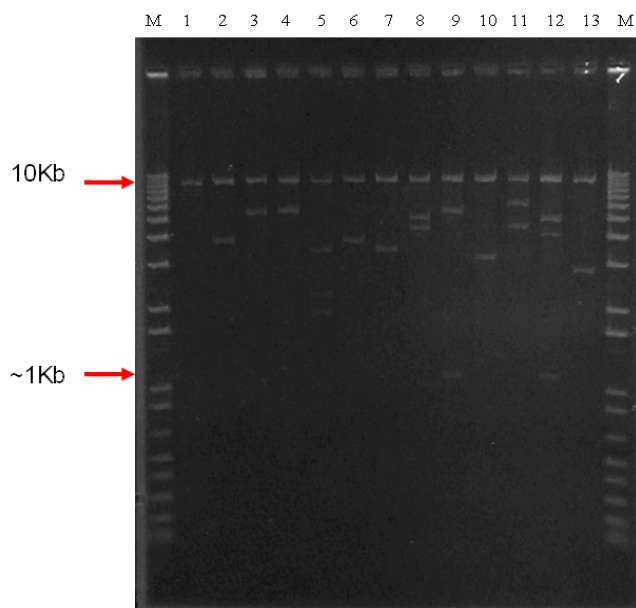


Figura 8. Gel de agarose com 12 clones da biblioteca de pequenos insertos de DNA de *Vibrio alginolyticus*. M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Plasmídeo linearizado com a enzima *Pst*I. 2 a 13. Clones com diferentes insertos de tamanho médio 6.041kb.

5.3 BIBLIOTECA DE GRANDES INSERTOS DE DNA

O DNA de *Vibrio harveyi* sofreu seleção de tamanho médio de 30kb. Estes fragmentos foram clonados em vetor apropriado resultando na biblioteca de grandes fragmentos de DNA que possui cerca de 5.000 clones. Até o momento somente a biblioteca de grandes insertos de DNA do *Vibrio harveyi* foi construída (Figura 9).

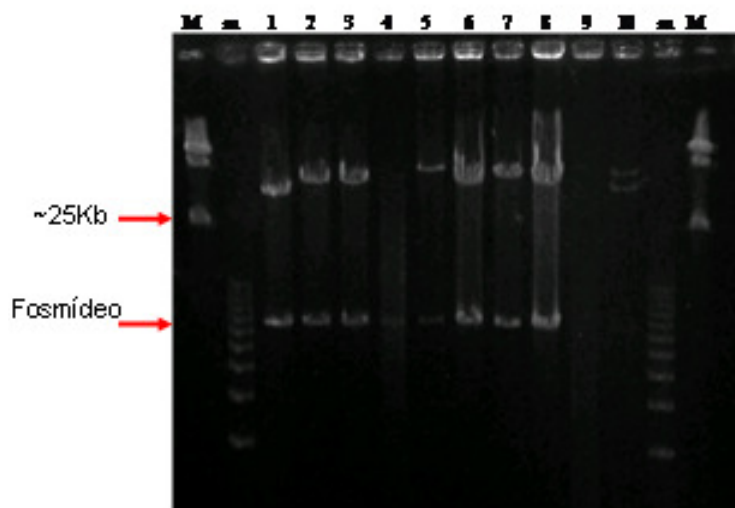


Figura 9. Gel de agarose com 10 clones da biblioteca de grandes insertos de DNA do *Vibrio harveyi* utilizando foscídeos. M. Marcador molecular Mid range 5kb. m. Marcador molecular *ladder 1kb plus* (Invitrogen). 1 a 10. Clones com diferentes insertos com tamanho médio de 30 kb.

Como resultado para os testes enzimáticos, dois clones positivos para atividade proteolítica foram identificados, não tendo sido ainda iniciados estudos mais específicos com os mesmos.

5.4 TRIAGEM FUNCIONAL PARA ATIVIDADE

À medida que a atividade de alguns clones foi sendo observada nas placas com meio de cultura contendo substrato específico para as diferentes atividades enzimáticas, estes foram repicados em novas placas contendo o meio de origem, a fim de confirmar o fenótipo. Uma vez confirmado o fenótipo, foram então cultivados em meio LB líquido e posteriormente armazenados em glicerol 20%, a -80°C .

Tabela 5. Relação de clones plaqueados e clones positivos para diferentes testes de atividade enzimática.

Biblioteca de Pequenos Fragmentos		
Atividade	Quantidade aproximada de clones triados	<i>Vibrio alginolyticus</i> Clones positivos
Proteolítica	13.460	4
Lipolítica	16.580	17
Amilolítica	5.130	-
Biblioteca de Grandes Fragmentos		
		<i>Vibrio harveyi</i>
Proteolítica	11.720	12
Lipolítica	14.600	28
Amilolítica	10.800	26
Biblioteca de Grandes Fragmentos		
		<i>Vibrio harveyi</i>
Proteolítica	3.410	2
Lipolítica	2.300	-

Das bibliotecas de pequenos insertos de DNA dos vibrios, armazenadas em glicerol a 20%, foi feita diluição em meio LB na concentração 1:10⁵ para *Vibrio harveyi* e 1:10⁶ para *Vibrio alginolyticus*.

A análise de atividade foi restringida para três clones de lipase da biblioteca de pequenos insertos de DNA do *Vibrio alginolyticus*; de cada um destes clones foi feita extração do DNA plasmidial e digestão parcial com endonuclease de restrição *Pst*I, para análise do perfil de restrição. Com o DNA resultante da digestão foram feitas transformações em células da cepa *E. coli* EPI300, no intuito de confirmar o fenótipo.

Os transformantes foram então plaqueados em meio LB-ágar contendo 1% (v/v) de tributirina (Sigma-Aldrich, INC) e 20µg/ml de tetraciclina, tendo permanecido em estufa a 37°C por 16 horas para desenvolvimento das colônias. Depois deste período, as placas foram deixadas a temperatura ambiente por mais cinco dias. A atividade lipolítica foi então confirmada pela formação de halo em torno das colônias, resultado da degradação da tributirina contida no meio de cultura.

Após as transformações, em cada uma das placas, para os três clones, foi observado padrão diferente na formação de colônias, sendo que algumas apresentaram halo de degradação da tributirina contida no meio de cultura e de outras que não.

Uma colônia com halo e uma sem halo de cada uma das placas dos clones transformados foi isolada e procedeu-se extração do DNA plasmidial de cada uma delas (Figura 10).

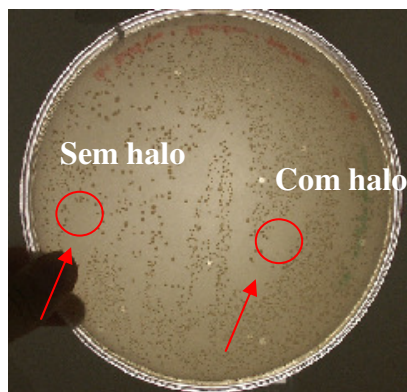


Figura 10. Clone 5, placa apresentando clones com e sem halo de degradação da tributirina contida no meio de cultura LB-ágar.

Do material resultante, nova transformação foi feita e apenas o clone 1 apresentou 100% de colônias formadoras de halo de degradação de tributirina. Todos os clones foram então digeridos com enzima de restrição *PstI* e, confirmando o resultado das transformações observado nas placas de Petri, somente o clone 1 apresentou mesmo padrão de bandas (Figura 11).

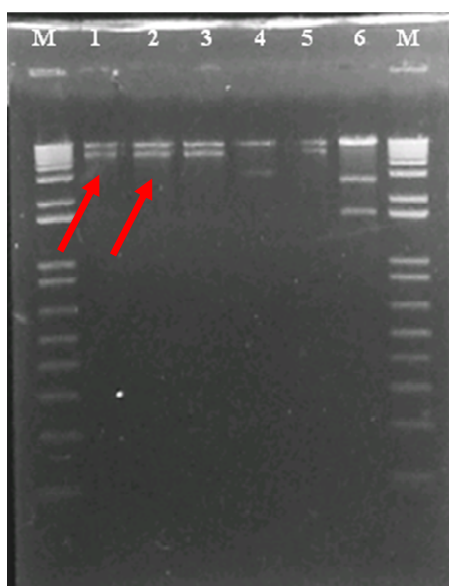


Figura 11. Gel de agarose com resultado da digestão usando endonuclease de restrição *PstI*, dos produtos da extração plasmidial dos clones 1, 2 e 5, da biblioteca de pequenos insertos de DNA de *Vibrio alginolyticus*. M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Digestão do clone 1, de colônia que apresentava halo. 2. Digestão do clone 1, de colônia que não apresentou halo após transformação em *E. coli*. 3. Digestão do clone 2, de colônia apresentando halo. 4. Digestão do clone 2, de colônia que não apresentou halo após transformação em *E. coli*. 5. Digestão do clone 5, colônia apresentando halo. 6. Digestão do clone 5, colônia não apresentando halo após transformação em *E. coli*.

A Figura 12A mostra que a cepa de *E. coli* contendo o plasmídeo pCF430, utilizada nos testes como controle, não apresenta halo de degradação, confirmando ser dos insertos a atividade lipolítica.

Cada um dos clones foi crescido *overnight* a 37°C em meio LB, tendo sido novamente estocados em glicerol 20%, a -80°C.

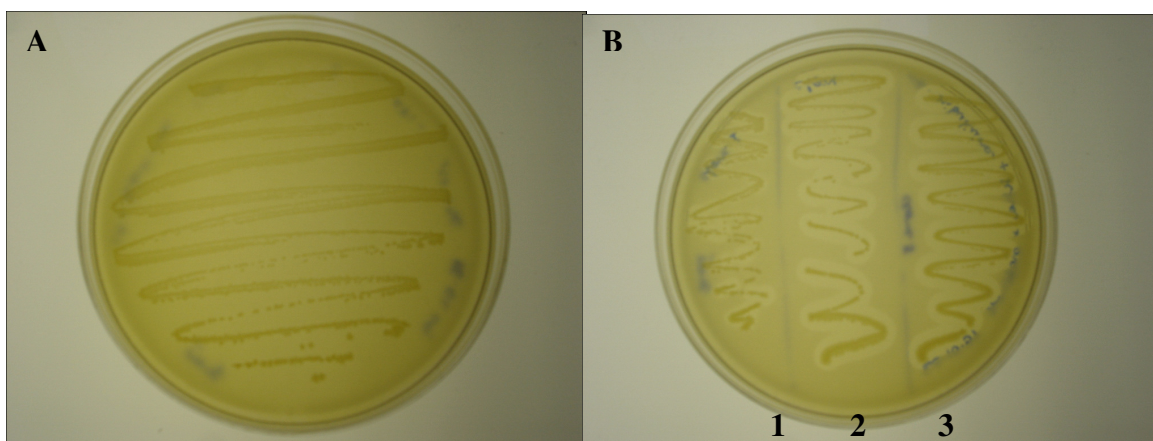


Figura 12. Placas com meio LB suplementada com tributirina 1% (v/v). A. Estriamento da cepa *E. coli* EPI 300 contendo o plasmídeo pCF430. B1. Estriamento do clone 1 de lipase do *Vibrio alginolyticus*, B2. Estriamento do clone 2 de lipase do *Vibrio alginolyticus*, B3. Estriamento do clone 5 de lipase do *Vibrio alginolyticus*.

Confirmado serem iguais os padrões de digestão para os dois transformados do clone 1, e serem diferentes os padrões de digestão para os clones 2 e 5, o clone positivo 1, agora denominado *Lip_algi1*, foi selecionado para ser caracterizado. Este foi repicado em meio LB-ágar contendo 1% (v/v) de tributirina (Sigma-Aldrich, INC) e 20 µg/mL de tetraciclina para confirmar o fenótipo.

Partindo do estoque deste isolado foi feita uma extração do DNA plasmidial em larga escala utilizando o kit *MaxPrep* (Qiagen, Chatsworth, CA, cat. #12162) conforme instruções do fabricante. O produto da extração plasmidial foi transformado em *E. coli* EPI300 (Epicentre Technologies, Madison, WI) e plaqueado em LB-ágar contendo 1% (v/v) de tributirina (Sigma-Aldrich, INC) e 20µg/ml de tetraciclina, para confirmação da atividade enzimática.

Sendo muitas vezes instáveis atividades relacionadas a clones funcionais (perda do fenótipo) decorrente de, por exemplo, perda ou alteração por recombinação do DNA plasmidial, tivemos o cuidado de, a cada passo de manipulação do clone *Lip_algi1*, re-

testarmos sua atividade lipolítica. A figura 14 representa o estriamento de duas colônias isoladas de *Lip_alg1* demonstrando a presença de halo em meio contendo 1% (v/v) de tributirina. O DNA plasmidial destas colônias foi extraído e re-transformado na cepa original EPI 300 (Epicentre Technologies, Madison, WI). Como demonstrado nas figuras 13b e 13c, ambos os plasmídeos originaram 100% de colônias apresentando atividade lipolítica. Com estes resultados confirmamos com segurança que o fenótipo de *Lip_alg1* é estável e reproduzível.

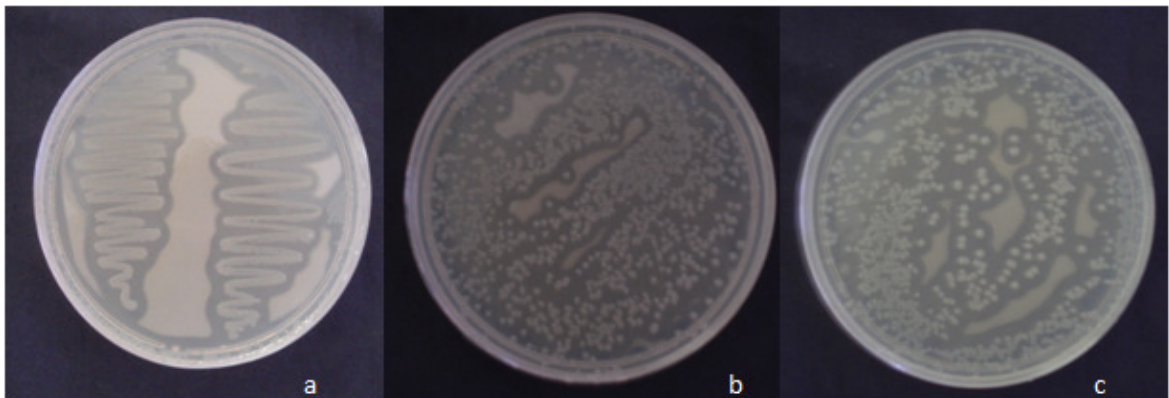


Figura 13. Placas com meio LB-ágar contendo tributirina 1% (v/v). a. Estriamento de colônias obtidas a partir de transformação do clone *Lip_alg1*. b. Nova transformação a partir da extração plasmidial da colônia “a”. c. Nova transformação a partir da extração plasmidial da colônia “b”.

Para obter o padrão de tamanho de inserto, o DNA foi digerido com a enzima de restrição *PstI* (Promega, EUA), utilizando tampão de melhor eficiência (tampão H) 10x (Promega, EUA) tendo sido, então, o inserto liberado (Figura 14).

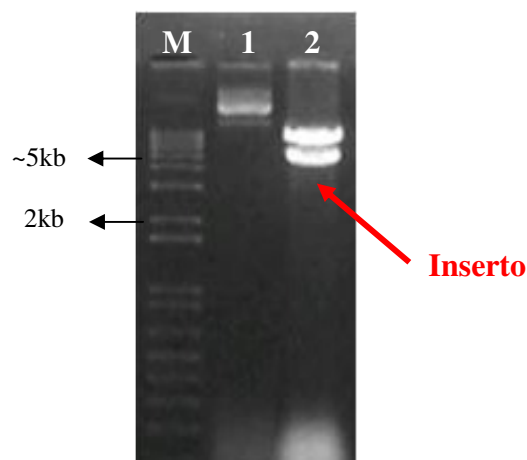


Figura 14. Inseto liberado após tratamento com endonuclease de restrição *PstI*. M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Extração do DNA plasmidial em larga escala do clone *Lip_alg1* intacto. 2. Resultado da digestão do produto da extração plasmidial em larga escala do clone *Lip_alg1*.

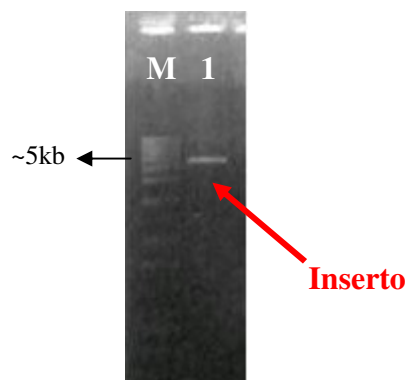


Figura 15. Inserto do clone *Lip_alg1* eluído de gel de agarose low-melting. M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Inserto *Lip_alg1* liberado e eluído.

5.5 CLONE *Lip_alg1* E GENE *Lip_1*

Foram feitas três reações de sequenciamento testes utilizando 1, 2 e 3 μ L de DNA de *Lip_alg1* (diluído 1:5), 5 picomol do oligonucleotídeo *forward* pCF430 (5'CTGTTTCTCCATAACCCGTT3') e *reverse* pCF430 (5'TGCAAGGCGATTAAGTTGG3'); 6, 5 e 4 μ L, respectivamente, de água MilliQ e 2 μ L de Premix Sequencing. Estes oligonucleotídeos foram utilizados pelo fato de terem sido delineados como capazes de anelar na porção terminal do vetor (Newman, 1999).

Os resultados do sequenciamento foram satisfatórios para todas as concentrações, para os dois oligonucleotídeos. Partindo destas sequências iniciais obtidas utilizando os primers do vetor, foi possível encontrar no genoma do *Vibrio alginolyticus* linhagem 40B a sequência completa do clone. O genoma deste vibrio foi sequenciado pelo projeto FINEP_GENOPROT: *Vibrios: Genômica, Proteômica e Prospecção Biotecnológica*, no Laboratório Nacional de Computação Científica – LNCC por pirosequenciamento utilizando o sequenciador 454 (Roche). O genoma foi depositado em DDBJ/EMBL/GenBank sob o número de acesso GenBank:[ACZB000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ACZB000000000) (Thompson, Vicente *et al.*, 2009).

Com a sequência nucleotídica completa do clone, procedeu-se a identificação *in silico* de *ORFs* (*Open reading frames*) contidas nesse segmento de DNA, na intenção de localizar o gene de lipase.

Para a identificação das ORFs, utilizando a sequência nucleotídica do clone Lip_{alg1} foi traduzida em sua sequência de aminoácidos usando ferramenta de bioinformática, banco de dados *ExpASY Proteomic Server*, disponível no site <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>. Os seis quadros de leitura foram analisados à busca de ORFs sendo que, no sentido de leitura 3' – 5', no primeiro quadro de leitura foram identificadas 3 ORFs, e no segundo quadro de leitura, duas ORFs.

Utilizando a ferramenta BLAST (Altschul, Madden *et al.*, 1997) disponível no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi as sequências das ORFs foram comparadas a outras sequências depositadas no banco de dados de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos, em busca por similaridade com sequências já descritas.

A porção correspondente ao clone Lip_{alg1} compreende uma região de 5.732pb, dentro da qual foi possível identificar, por meio de ferramentas de bioinformática, cinco ORFs de interesse, como indicado na figura abaixo:



Figura 16. Representação esquemática das cinco ORFs identificadas no inserto de Lip_{alg1}.

Em comparação com outras sequências disponíveis em banco de dados de domínio público, procedeu-se a busca por identidade das sequências de cada uma das ORFs (foi utilizada a ferramenta BLASTx em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A análise parte de sequências nucleotídicas em busca de homologia com proteínas disponíveis no banco de dados.

A primeira ORF, indicada em rosa na figura 16, apresentou homologia com uma proteína tipo hélice-giro-hélice da família XRE (elemento de resposta à xenobiótico) de *Vibrio sp*. A região está compreendida entre os nucleotídeos 491 e 1249, e codifica uma proteína de 253 aminoácidos.

A segunda ORF, indicada em verde escuro, apresentou homologia com uma proteína transmembrana permease da família das acil transferases de *Vibrio sp*, e está compreendida entre os nucleotídeos 1396 e 3249, correspondendo a uma proteína de 618 aminoácidos.

A ORF representada em verde claro apresentou homologia com uma proteína da família DHBP sintase (3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase), proveniente de *Vibrio sp.*, estando compreendida entre os nucleotídeos 4343 e 4999, e corresponde a uma proteína de 219 aminoácidos.

A última ORF, identificada em azul na figura 16, apresentou homologia com uma proteína putativa de *Vibrio alginolyticus* linhagem 12G01 do tipo transportador ABC ou GSH peroxidase, da super família tioredoxina, e está compreendida entre os nucleotídeos 5104 e 5649, codificando a uma proteína de 182 aminoácidos.

Tabela 6. Tabela relacionando a homologia das ORFs do clone Lip_alg1.

Tabela de homologia das ORFs de Lip_alg1				
ORF	Tamanho (pb)	Tamanho (aminoácidos)	Homologias	BLAST % Identidade
ORF 1	754	253	Proteína tipo hélice-giro-hélice da família XRE (elemento de resposta à xenobiótico)	96%
ORF 2	1853	618	Proteína transmembrana permease da família das acil transferases	98%
ORF 3	618	205	Lipase putativa	99%
ORF 4	656	219	Proteína da família DHBP sintase (3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase)	99%
ORF 5	545	182	Proteína putativa do tipo transportador ABC ou GSH peroxidase, da super família tioredoxina	99%

A ORF de maior importância neste contexto corresponde a uma lipase putativa, que apresenta 99% de homologia com lipase putativa de *Vibrio alginolyticus* linhagem 12G01. A ORF possui 618pb e codifica uma proteína de 205 resíduos de aminoácidos, tendo sido depositada no banco de dados como uma *Predicted acetyltransferases and hydrolases with the alpha/beta hydrolase fold*, (acetiltransferase e hidrolase putativa com conformação α/β hidrolase), denominada no banco de dados como LipA, e correspondendo à região aberta de leitura referente ao gene de lipase em Lip_alg1.

Lipases tipicamente apresentam uma tríade catalítica de Serina-Ácido aspártico-Histidina, responsável para atividade, sendo que o sítio ativo serina está localizado na sequência pentapeptídica Gly-X-Ser-X-Gly. A região conservada de Lip_{alg1} está representada, comparada à sequência nucleotídica do isolado 12G01 de *Vibrio alginolyticus*, à sequência nucleotídica de *Vibrio sp.* e à de *Vibrio parahaemolyticus*, os três organismos que apresentaram maior similaridade com a sequência nucleotídica de Lip_{alg1}.

Tabela 7. Alinhamento utilizando as sequencias mais intimamente relacionadas à sequencia de Lip_{alg1}. Todas são pertencentes ao gênero *Vibrio*. Resíduos diferentes estão indicados em cores na sequência. Sítio catalítico indicado com asteriscos.

	1	
Lip _{alg1}	MKIIILHGLYMHGLVMQPLSQKLRKLG YETQVLSYNTVAIDESSLFDSID	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	MKIIILHGLYMHGLVMQPLSQKLRKLG YETQVLSYNTVAIDESSLFDSID	
<i>Vibrio sp.</i>	MKIIILHGLYMHGLVMQPLSQKLRKLG YETQVLSYNTVAIDESSLFDSID	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	MKIIILHGLYMHGLVMQPLSQKLRKLG YETQVLSYNTVAIDESSLFDSID	
	51	
Lip _{alg1}	HSLNPLT NVLVGHSLGGLMIKRYLANRKPSTNLISHVVAIGSPLKGAS	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	HSLNPLT NVLVGHSLGGLMIKRYLANRKPSTNLISHVVAIGSPLKGAS	
<i>Vibrio sp.</i>	HSLNPLT NVLVGHSLGGLMIKRYLANRKPSTSLISHVVAIGSPLKGAS	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	HSLNPLT ANVLVGHSLGGLMIKRYLANRKPSTSLISHVVAIGSPLKGAS	

	100	
Lip _{alg1}	IVGRIQDLGLGAILGNSPHHGLNKHDDAWDLPQKLGSIAGTMPIGARPL	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	IVGRIQDLGLGAILGNSPHHGLNKHDDAWDFPQKLGSIAGTMPIGARPL	
<i>Vibrio sp.</i>	IVGRIQDLGLGAILGNSPHHGLNRHNDAWAFPQKLGSIAGTMPIGARPL	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	IVGRIQDLGLGTILGNSPHHGLNKHDDAWAFPQKLGSIAGTVPIGARPL	
	149	160
Lip _{alg1}	LIRNDNTMSDGT	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	LIRNDNTMSDGT	
<i>Vibrio sp.</i>	LIRNDNTMSDGT	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	LIRNDNTMSDGT	

A porção do genoma de *Vibrio alginolyticus* linhagem 40B foi comparada com outras sequências de lipases e esterases de diferentes organismos, no intuito de proceder sua classificação em família, de acordo com a separação proposta por Arpigny e Jaeger, 1999.

A relação ente a sequência de resíduos de aminoácidos do gene Lip_1 e outras proteínas foi determinada pelo alinhamento com sequências disponíveis no banco de dados GenBank (www.ncbi.nih.nlm.gov), resultando na árvore comparativa (Figura 17).

Após alinhamento da sequência nucleotídica de Lip_1 com sequências de lipases e esterases de outros microrganismos descritas na literatura, esta ficou agrupada na família I de lipases estando, portanto, classificada como uma lipase verdadeira, permanecendo distante das famílias II, IV e V que agrupam esterases, distante da família III, que agrupa uma classe diferente de lipases e esterases extracelulares, e também distante da família VI, que agrupa as carboxilesterases.

Uma lipase isolada de *Vibrios* (*V. cholerae*) foi utilizada na classificação proposta por Arpigny e Jaeger (1999) sendo que a mesma se encontra na mesma classificação em família; porém, esta não se relaciona proximamente com Lip_1, indicando pertencerem a subfamílias diversas.

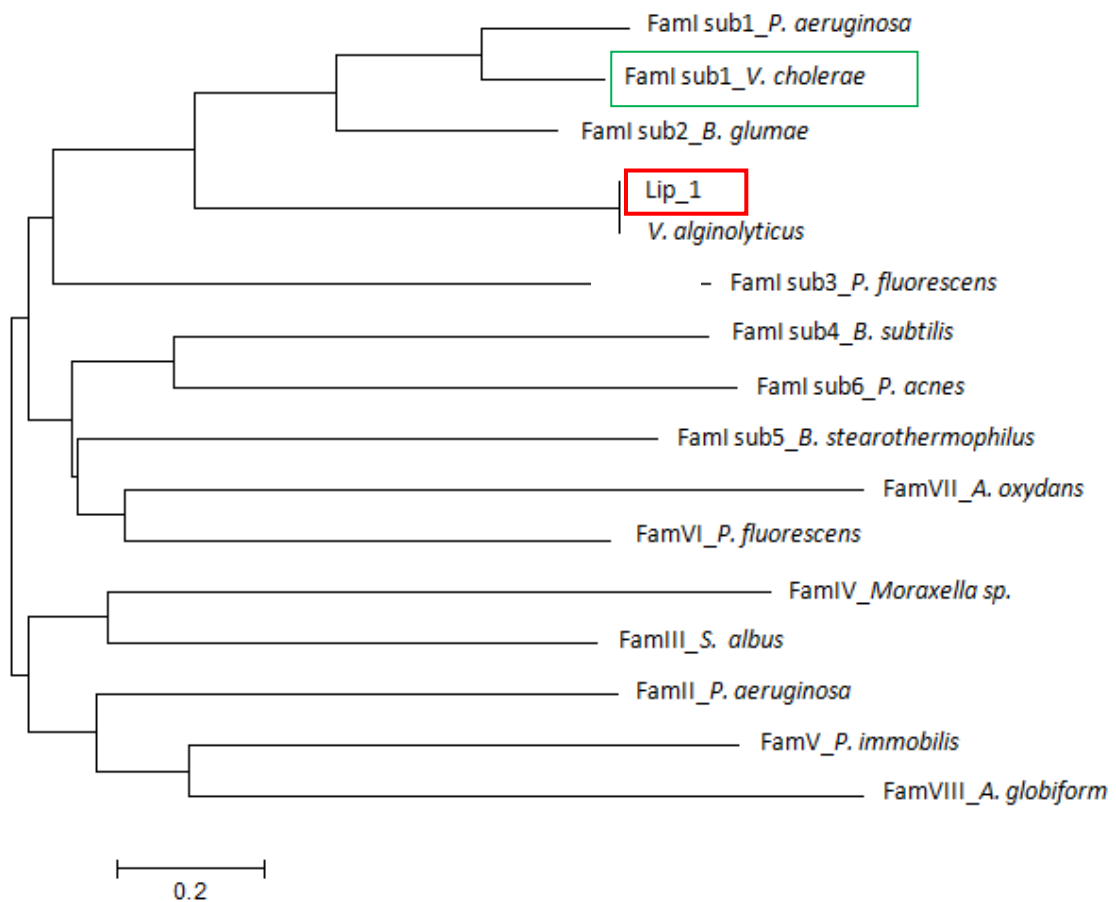


Figura 17. Árvore comparativa correlacionando diferentes famílias de lipases e esterases de microrganismos. A família I se divide em 6 subgrupos, de 1 a 6 (na árvore, identificados como FamI (“família I”), e sub

indicando “subgrupo”, de 1 a 6). Ressaltada em vermelho posição de Lip_1 e em verde lipase isolada de *Vibrio cholerae*

A região correspondente a Lip_1 foi amplificada com primers específicos, clonada em vetor de expressão pET21a(+), e transformada em células da cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Utilizando o par de oligonucleotídeos sintéticos complementares às duas regiões específicas da lipase, a sequência nucleotídica de interesse em Lip_alg1 foi amplificada em seu tamanho esperado para posterior digestão e ligação no vetor de escolha pET21a(+).

Dentre as reações de ligação, aquela utilizando maior quantidade do vetor (4µL) resultou em maior número de colônias por placa de Petri, porém, todas as reações apresentaram colônias, indicando que todas as reações de ligação foram eficientes. Algumas colônias apresentaram o fenótipo positivo para degradação da tributirina contida no meio de cultura em um período curto após o plaqueamento. Após uma semana de crescimento em placa, no entanto, todas as colônias apresentaram fenótipo positivo para degradação da tributirina contida no meio de cultura, indicando conterem todas as colônias a região específica para a atividade lipolítica.

Procedeu-se extração plasmidial em pequena escala partindo de oito colônias obtidas, no intuito de confirmar a presença do inserto. As colônias, apresentando ou não halo de degradação da tributirina contida no meio de cultura foram crescidas em meio LB contendo antibiótico ampicilina (100µg/mL) a 37°C por 16 horas sob agitação (240 rpm). A extração do DNA plasmidial foi feita pelo protocolo *Best Miniprep Protocol Ever*. Observa-se no gel de agarose 1% que todos os clones apresentaram inserto (Figura 18). Os clones enumerados de 1 a 3 apresentaram halo de degradação da tributirina contida no meio sólido no segundo dia de crescimento em bancada. Para as demais, após uma semana de crescimento os halos foram visualizados.

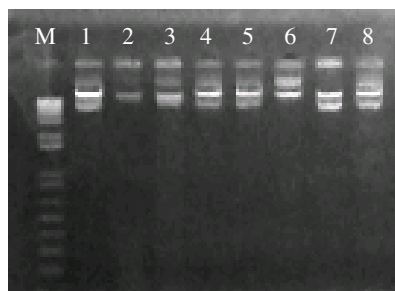


Figura 18. Gel de agarose de oito colônias que apresentaram ou não halo de degradação da tributirina presente no meio de cultura. M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1 a 8. Clones apresentando insertos confirmando a ligação no vetor pET21a (+) e clonagem em célula BL21(DE3).

Com o produto de uma das extrações de DNA plasmidial (colônia número 1, no gel) foi feita nova PCR utilizando os primers específicos para o gene de lipase, com o intuito de confirmar a amplificação da região de interesse (Figura 19). O DNA utilizado na reação de PCR foi diluído 500 vezes e amplificado em 25 ciclos. O resultado foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Este clone recombinante foi escolhido para indução e expressão da proteína.

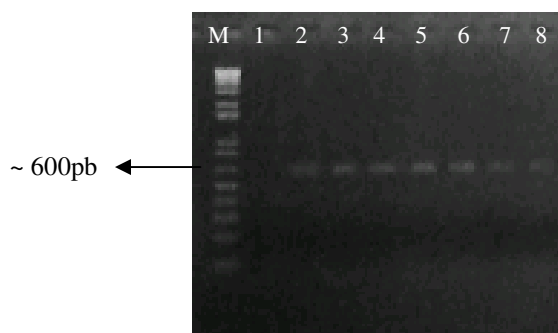


Figura 19. PCR utilizando primer específico para a região da lipase putativa Lip_1: M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Controle negativo da amplificação. 2 a 8. Produto de PCR do clone n°1, escolhido aleatoriamente: plasmídeo diluído 500 vezes; aplicados 2 μ L dos 20 μ L total da reação de PCR.

Para confirmar a eficiência da clonagem, procedeu-se digestão utilizando a enzima de restrição *PstI* (Promega, EUA) com o vetor de escolha pET21a (+) e com Lip_1. Também foi amplificado o gene Lip_1 com primers específicos para a região de interesse. Foi observado fragmento de aproximadamente 600pb correspondente à região codificante do gene Lip_1, resultado da amplificação com os primers da lipase e, pela diferença dos tamanhos dos fragmentos, a eficiência na clonagem do gene utilizando o vetor de escolha.

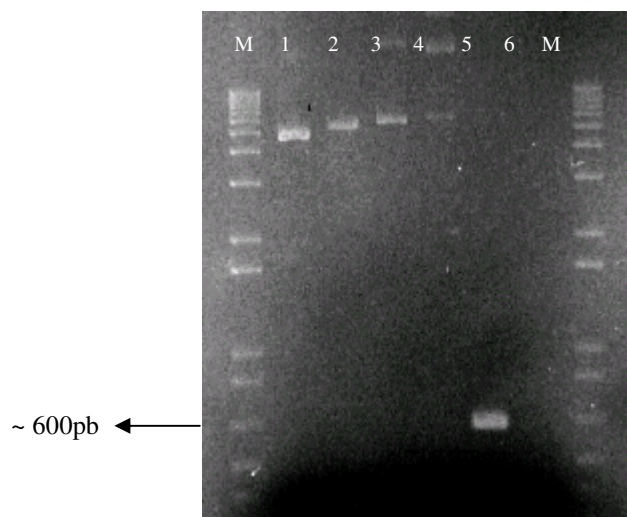


Figura 20. Reações de digestão utilizando a enzima de restrição *Pst*I (Promega, EUA) com o vetor de escolha pET21a (+) e Lip_1. PCR utilizando primer específico para a região da lipase putativa Lip_1: M. Marcador molecular *ladder1kb plus* (Invitrogen). 1. Vetor de escolha pET21a (+); 2. pET21a (+) digerido; 3. Lip_1; 4. Lip_1 digerido; 5. Produto de PCR de Lip_1 utilizando primers específicos para a lipase e 6. Controle negativo da amplificação.

Uma alíquota do resultante da transformação do clone Lip_1 em BL21 (DE3) foi plaqueada em placa de Petri contendo meio LB-ágar acrescido de tributirina 1% (v/v) para verificar a ocorrência de hidrólise da tributirina contida no meio. O vetor pET21a(+) foi transformado em célula da mesma cepa de *E. coli* BL21 (DE3) para ser utilizado como controle negativo, indicando ser a atividade hidrolítica inerente à região de Lip_1, e não do vetor de escolha.



Figura 21. Placas com meio LB-ágar suplementado com tributirina 1% (v/v). Na placa à esquerda, clone Lip_1 transformado em célula competente da cepa de *E. coli* BL21 (DE3), apresentando atividade degradativa da tributirina contida no meio de cultura. Na placa à direita, vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3) não apresentando atividade hidrolítica, indicando ser da porção do gene Lip_1 a atividade lipolítica.

A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi escolhida em virtude de propriedade importante para o processo de expressão: apresenta em seu genoma uma cópia do gene cromossomal T7 RNA polimerase sob repressão do operador *lac*, necessário para a expressão heteróloga de proteínas. Uma vez adicionado o agente indutor IPTG, a expressão da T7 polimerase, assim como no gene heterólogo, são ativados.

O estudo de expressão conduzido com Lip_1 foi realizado após a cultura crescida em meio LB de atingir OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,4. Uma alíquota foi coletada antes da adição de IPTG para observação da ocorrência de alguma taxa expressão basal (sem a adição do indutor).

A indução do promotor T7 foi iniciada com a adição de IPTG à cultura celular a concentração final de 1mM. A taxa de expressão foi verificada em diferentes tempos de indução (de 1 a 3 horas). A melhor expressão da proteína na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi observada após 3 horas sob agitação (240 rpm) a 37°C.

5.6 INDUÇÃO E EXPRESSÃO

A indução das células de *E. coli* BL21 (DE3) portadoras do plasmídeo de interesse levou à produção de uma enzima dotada de uma cauda de seis histidinas em sua porção N-terminal passível de purificação em coluna de afinidade. O perfil de expressão foi observado em gel de eletroforese SDS-PAGE 12%. A cada coleta de amostras, procedeu-se a quantificação das células crescidas por absorbância 600nm, com o intuito de padronizar a quantidade de celular por poço no gel SDS-PAGE 12%. Pode-se observar uma proteína de aproximadamente 25kDa.

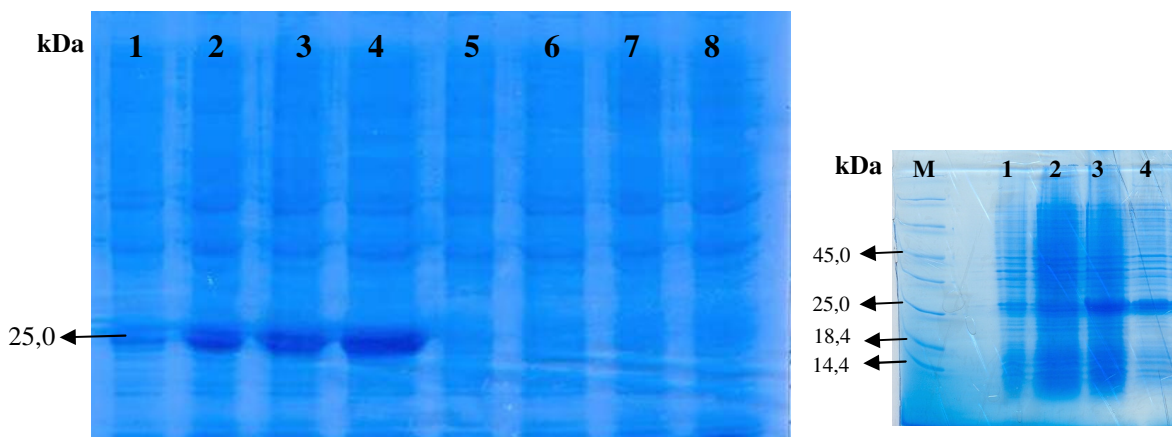


Figura 22. À esquerda, perfil de gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com Coomassie G-250. Resultado do crescimento do clone Lip_1 e do vetor pET21a (+) induzidos com IPTG. 1. Clone Lip_1 crescido até OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,4, antes da indução por IPTG. 2. Clone induzido por uma hora sob agitação (240 rpm), a 37°C. 3. Duas horas de indução. 4. Três horas de indução. Proteína de aproximadamente 25kDa. 5. Vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3) crescido até OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,4, antes da indução por IPTG. 6. Após uma hora sob agitação (240 rpm), a 37°C, adicionado de 1mM de IPTG. 7. Após duas horas da adição de IPTG. 8. Após três horas da adição de IPTG. À direita, perfil de gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com Coomassie G-250 contendo as mesmas amostras de crescimento do clone Lip_1, com indicação da massa molecular com ajuda do marcador comercial Fermentas (*Unstained Protein*, Fermentas): M. Marcador de massa molecular Fermentas (*Unstained Protein*, Fermentas). 1. Clone Lip_1 crescido até OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,4, antes da indução por IPTG. 2. Clone induzido por uma hora com adição de IPTG concentração final 1mM sob agitação (240 rpm), a 37°C. 3. Duas horas de indução. 4. Três horas de indução. Proteína de aproximadamente 25kDa.

É perceptível que, no decorrer da indução, há um crescente aumento na quantidade da proteína expressa com o passar do tempo, atingindo uma concentração considerável após três horas de indução. A adição de 2% de glicose foi feita para minimizar os níveis basais de expressão por repressão catabólica, e que não afeta a expressão da proteína após a indução mas que, segundo (Hannig e Makrides, 1998) devem ser evitados visando evitar uma eventual toxicidade do produto de expressão para a célula, reduzindo a eficiência na produção.

6. DISCUSSÃO

Uma biblioteca genômica deve conter vários clones representativos de cada fragmento de DNA, para aumentar a probabilidade de se conseguir isolar genes. É suposto que uma biblioteca genômica seja representativa de todos os genes do organismo, sendo muito útil quando se pretende isolar um gene específico.

O aspecto principal considerado na construção de uma biblioteca genômica atem-se à obtenção de clones portando fragmentos do genoma, obtidos aleatoriamente, em quantidade suficiente para representar o genoma total do organismo em questão. O tamanho necessário de uma biblioteca genômica, para que um dado fragmento de interesse esteja entre os fragmentos clonados, é determinado pelo tamanho do fragmento clonado e pelo tamanho do genoma.

Basicamente, a construção da biblioteca genômica envolve os seguintes passos:

- a) isolamento de DNA que é posteriormente clivado de modo a produzir fragmentos de tamanho compatível com o vetor de clonagem;
- b) ligação desses fragmentos no vetor e introdução dos recombinantes obtidos nas células hospedeiras.

Para a obtenção de clones, por ação de endonuclease de restrição, o DNA genômico foi clivado em fragmentos com extremidades abruptas, que permitiram a ligação do DNA no vetor de expressão, formando assim uma coleção de fragmentos de DNA. Estes fragmentos foram clonados, após inserção em hospedeiro, para cada um dos vibrios estudados e então utilizados para triagem de diversas atividades enzimáticas.

Dois tipos de bibliotecas foram construídas e, de acordo com a média do tamanho dos fragmentos, classificadas em de grandes fragmentos de DNA (maiores que 30 kb) ou pequenos fragmentos de DNA (menores que 15 kb).

Bibliotecas de pequenos fragmentos possuem grande número de cópias: o pequeno tamanho dos insertos possibilita a obtenção de um maior número de clones e, desta forma, resulta em uma triagem mais abrangente do genoma total do organismo, possibilitando ainda a expressão facilitada dos genes pela ação dos promotores dos vetores, quando testado para diferentes atividades enzimáticas. Por estar mais fragmentado, no entanto, o genoma, mais difícil se torna a tarefa de selecionar, dentre os muitos fragmentos, algum que contenha um gene de interesse: grande número de clones deverão ser analisados para

garantir a cobertura do genoma em análise, e vias metabólicas grandes dificilmente estarão conservadas nesse tipo de biblioteca.

Já as bibliotecas de grandes insertos possibilitam a clonagem de fragmentos maiores, e a análise de um número menor de clones é requerida para que se faça a cobertura completa do genoma. Dessa forma, uma vez encontrado um clone positivo para atividade, mais facilmente pode-se proceder à análise de vias metabólicas completas. Tal fato se deve à possibilidade de conservar-se toda uma ORF (*Open reading frame*), preservando assim a porção do genoma que contém a sequência de bases responsável por codificar uma proteína específica inteira (Rondon, Raffel *et al.*, 1999). Deve-se considerar, no entanto, que sendo reguladas por um único promotor, ocorrendo a oclusão deste, a transcrição não terá início e a proteína não será codificada.

As diferentes abordagens, gerando resultados diversos, demonstram a importância de se realizar a seleção de clones por ambas as técnicas, aumentando a chance de encontrar genes de interesse.

A biblioteca de pequenos fragmentos de DNA de *Vibrio alginolyticus* possui 19.849 clones e a biblioteca de pequenos fragmentos de DNA de *Vibrio harveyi* possui 20.247 clones. Tal número de clones de ambas garante uma cobertura de 20 vezes o genoma dos vibrios. Para a biblioteca de grandes fragmentos de DNA, que possui cerca de 5.000 clones, nos permite uma cobertura de 30 vezes o genoma de *Vibrio harveyi*.

Com tais coberturas nos genomas dos dois *Vibrios*, fica assegurada a busca por genes de interesse em todo o genoma, e que pode ser desenvolvida por técnicas simples de cultivo em laboratório.

A busca por enzimas com atividade ótima em laboratórios parte de estudos simples, como do crescimento dos organismos de escolha em placas de Petri contendo meio de cultura com substratos específicos para a atividade pretendida. No caso da atividade lipolítica, a tributirina é conhecidamente utilizada (Rapp e Olivecrona, 1978), passando por processos de expressão e purificação até a etapa de produção escalonada.

O clone em estudo, Lip_1, possui comprovada atividade lipolítica em meio de cultura, vez que degrada a tributirina contida no meio LB-ágar, utilizado no crescimento. Após comparação da sequência nucleotídica com outras sequências de lipases já caracterizadas, observou-se 99% de homologia entre Lip_1 e uma “lipase putativa” (acetiltransferase e hidrolase putativa com conformação α/β hidrolase) de *Vibrio alginolyticus* linhagem 12G01, denominada LipA.

Por se ter partido da atividade lipolítica confirmada em meio de cultura para só então determinar e analisar a sequência nucleotídica e de aminoácidos, é possível afirmar ser a Lip_1 uma provável enzima lipolítica.

Lipases tipicamente apresentam uma tríade catalítica de Serina-Ácido aspártico-Histidina, responsável pela atividade, sendo que o sítio ativo serina está localizado na sequência pentapeptídica Gly-X-Ser-X-Gly. Lip_1 possui essa sequência nucleotídica conservada, apresentando homologia com as sequências de lipases verdadeiras de organismos indicados na árvore comparativa (Figura 17).

Por análise entre lipases, esterases e carboxilesterases de diferentes famílias (classificação elaborada por Arpigny e Jaeger, 1999), a sequência referente ao gene isolado Lip_1 apresenta íntima relação com lipases verdadeiras, tendo permanecido em um clado próximo às subfamílias 1, 2 e 3, da família I de enzimas lipolíticas, que englobam as lipases verdadeiras. As famílias de esterases permaneceram em um clado mais distante (Famílias V, VIII e II), assim como as carboxilesterases/carboxil hidrolases (Famílias VI e VII, respectivamente). Tal fato aproxima Lip_1 de ser uma lipase verdadeira.

Algumas lipases de organismos gram-negativos não possuem uma sequência sinal N-terminal típica possuindo, no entanto, um motif C-terminal envolvido no seu mecanismo de enovelamento e secreção (Jaeger e Eggert, 2002). Estas lipases são secretadas por uma via do tipo I, também conhecida como transportador ABC. Esta via é constituída por três proteínas diferentes: (1) uma proteína da membrana interna contendo um ATP-binding cassette (proteína ABC) responsável pela ligação da lipase à membrana interna da célula, incorrendo em especificidade ao substrato deste sistema, (2) uma proteína de fusão à membrana (MFP) que pode estar associada tanto à porção interior quanto exterior membrana, e (3) uma proteína de membrana externa (OMP)(Arpigny e Jaeger, 1999).

Esta região, que possui relevante importância na secreção de lipases associadas, relaciona-se ainda à classificação de lipases em famílias, vez que sua presença é específica em lipases pertencentes à Família I (Arpigny e Jaeger, 1999). O fato de Lip_1 possuir tal região corrobora para sua classificação na Família I, de lipases verdadeiras.

A proteína da família DHBP sintase (3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase), observada em uma das *ORFs* corresponde a uma proteína envolvida na síntese de riboflavina, a vitamina B2. Tal enzima possui, assim como a lipase em estudo, relevante importância em biotecnologia, devendo ser melhor estudada em sistema de clonagem para superexpressão e estudo de cinética enzimática.

A relação de Lip_1 com outras lipases verdadeiras de diferentes organismos e ainda a presença do sistema de transporte tipo ABC, visto exclusivamente em lipases ditas “verdadeiras”, corroboram para a classificação de Lip_1 como uma lipase verdadeira. A similaridade da sequência nucleotídica de Lip_1 com outras lipases verdadeiras não permitiu, no entanto, sua diferenciação em subfamília. Estudos bioquímicos mais pormenorizados devem ser realizados para possibilitar esta separação.

A lipase referida no presente estudo não foi ainda caracterizada quanto à estabilidade em diferentes temperaturas e pH. Tal análise possibilitará identificar o real valor biotecnológico deste produto, possibilitando vislumbrar aplicações específicas, seu ambiente ótimo de atuação e a viabilidade de sua produção em larga escala.

De maneira ideal, espera-se que uma enzima de interesse seja estável, não tóxica para a bactéria, solúvel, expressa em grande quantidade e possa ser facilmente purificada. O sistema usual para expressão de proteínas heterólogas é utilizando um vetor apropriado para super-expressão e bactérias, especialmente *Escherichia coli*. Estas apresentam a vantagem de requerer técnicas e meios de cultura simples, além de apresentarem rápido crescimento em condições controladas (Hannig e Makrides, 1998).

Para a expressão induzida do clone Lip_1 foi utilizando vetor de expressão apropriado pET21a(+), indicado para altos níveis de expressão heteróloga e transformada em células da cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3), linhagem muito utilizada no sistema pET de expressão obtida pela infecção da *E. coli* BL21 com o fago DE3 que contém clonado o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor LacUV5. É capaz de produzir T7 RNA polimerase quando o promotor for induzido com IPTG adicionado ao meio de cultura. A T7 RNA polimerase produzida transcreve o DNA clonado no vetor pET produzindo mRNA em grandes quantidades, que são utilizados pela bactéria na produção da proteína recombinante.

A proteína de interesse apresenta uma região rica em histidinas, denominada "his-tag", cujo intuito é facilitar a purificação da mesma através de cromatografia por afinidade em resinas. Testes iniciais na tentativa de obter o produto purificado já foram realizados, sem sucesso, no entanto. Novos testes devem ser desenvolvidos no intuito de obter a proteína de interesse purificada, possibilitando o desenvolvimento de testes de estabilidade e atividade.

Quantidade significativa de Lip_1 induzida por IPTG foi obtida com baixo tempo de indução (apenas 3 horas), o que nos permite inferir a não ocorrência de efeitos tóxicos decorrentes da produção aumentada do produto, e com baixas concentrações do indutor. Tal fato permite avaliar a viabilidade da produção escalonada da enzima no sistema de expressão proposto, devendo-se avaliar ainda a interferência do tempo na produção da mesma, ou seja, o tempo de crescimento mais propício para que seja obtida grande quantidade da proteína expressa.

A etapa de purificação de produtos biotecnológicos produzido por células microbianas constitui uma etapa complexa do processo, dada as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse. Desta forma, as etapas de purificação são consideravelmente desafiadoras vez que não há processo de purificação de aplicação geral.

O produto extracelular de Lip_1 possui características notáveis: o processo inicial de hidrólise é observado após 16 horas em estufa a 37°C e, após 24 horas a temperatura ambiente, um halo considerável decorrente da degradação da tributirina contida no meio de cultura pode ser observado. A quantidade de produto obtido após curto período de indução também corroboram para concluir ser Lip_1 uma enzima de interesse, cuja etapa de purificação deve ser concluída, seguida de estudos físico-químicos, determinando a relevância de sua utilização em processos produtivos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento com Lip_1 indicam uma potencial importância biotecnológica da amostra em estudo e sendo que, de enzimas isoladas é possível gerar produtos de interessante aplicação industrial, com baixos custos de obtenção e relevante utilização no melhoramento de processos produtivos, a purificação e estudos de caracterização podem levar a resultados economicamente interessantes.

O perfil de indução observado em gel SDS/PAGE já indica o potencial de proteínas expressas no período de três horas de indução. Estudos de cinética enzimática se fazem necessários para a determinação das reais condições de utilização de Lip_1, e a determinação de possíveis aplicações.

Os resultados dos estudos possibilitam afirmar a atividade hidrolítica do clone em estudo, permitindo alterar seu estatus de lipase putativa, como está depositado no banco de dados de domínio público, para uma lipase verdadeira, com atividade comprovada.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Purificar e caracterizar a enzima codificada por Lip_1 para verificação do potencial biotecnológico da amostra.
- Expressão heteróloga da proteína precursora da riboflavina, identificada por análise da sequencia obtida no seqüenciamento de Lip_1. Desenhar primers específicos para a região e expressar em vetor apropriado, para avaliação do potencial biotecnológico.
- Modelagem molecular da proteína e determinação de suas estruturas.
- Identificar e caracterizar outras enzimas provenientes das bibliotecas genômicas de vibrios visando assimilar outros fatores de virulência, como proteases, explorando seu potencial biotecnológico.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdallah, F. B., H. Kallel, *et al.* Enzymatic, outer membrane proteins and plasmid alterations of starved *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* cells in seawater. Arch Microbiol, v.191, n.6, Jun, p.493-500. 2009.
- Ainsworth, T. D., M. Fine, *et al.* Bacteria are not the primary cause of bleaching in the Mediterranean coral *Oculina patagonica*. Isme J, v.2, n.1, Jan, p.67-73. 2008.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, v.25, n.17, Sep 1, p.3389-402. 1997.
- Alves Jr, N., O. S. Maia Neto, *et al.* Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. Environmental Microbiology Reports (2009), v.in press, p.000-000. 2009.
- Angkawidjaja, C. e S. Kanaya. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. Cell Mol Life Sci, v.63, n.23, Dec, p.2804-17. 2006.
- Arpigny, J. L. e K. E. Jaeger. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem J, v.343 Pt 1, Oct 1, p.177-83. 1999.
- Austin, B., D. Austin, *et al.* Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. Environ Microbiol, v.7, n.9, Sep, p.1488-95. 2005.
- Austin, B. e X. H. Zhang. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Lett Appl Microbiol, v.43, n.2, Aug, p.119-24. 2006.
- Bai, F., L. Pang, *et al.* Distribution of five vibrio virulence-related genes among *Vibrio harveyi* isolates. J Gen Appl Microbiol, v.54, n.1, Feb, p.71-8. 2008.
- Balebona, M. C., M. J. Andreu, *et al.* Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Appl Environ Microbiol, v.64, n.11, Nov, p.4269-75. 1998.
- Ben-Haim, Y., F. L. Thompson, *et al.* *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. Int J Syst Evol Microbiol, v.53, n.Pt 1, Jan, p.309-15. 2003.
- Bornscheuer, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiol Rev, v.26, n.1, Mar, p.73-81. 2002.
- _____. Trends and challenges in enzyme technology. Adv Biochem Eng Biotechnol, v.100, p.181-203. 2005.
- Bourne, D., Y. Iida, *et al.* Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. Isme J, v.2, n.4, Apr, p.350-63. 2008.

Cai, S. H., Z. H. Wu, *et al.* Cloning and expression of gene encoding the thermostable direct hemolysin from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis of crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*). J Appl Microbiol, v.103, n.2, Aug, p.289-96. 2007.

Cervino, J. M., F. L. Thompson, *et al.* The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals. J Appl Microbiol, v.105, n.5, Nov, p.1658-71. 2008.

Cortés, J. Latin American coral reefs. Amsterdam; London: Elsevier. 2003

Courtois, S., C. M. Cappellano, *et al.* Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. Appl Environ Microbiol, v.69, n.1, Jan, p.49-55. 2003.

Defoirdt, T., W. Verstraete, *et al.* Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. J Appl Microbiol, v.104, n.5, May, p.1480-7. 2008.

Dorsch, M., D. Lane, *et al.* Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. Int J Syst Bacteriol, v.42, n.1, Jan, p.58-63. 1992.

Dutra, G. F., G. R. Allen, *et al.* A rapid marine biodiversity assessment of the Abrolhos Bank, Bahia, Brazil. RAP Bulletin of Biological Assessment 38. Washington, D.C., 2006.

Efrony, R., I. Atad, *et al.* Phage therapy of coral white plague disease: properties of phage BA3. Curr Microbiol, v.58, n.2, Feb, p.139-45. 2009.

Eilers, H., J. Pernthaler, *et al.* Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. Appl Environ Microbiol, v.66, n.11, Nov, p.4634-40. 2000.

Faury, N., D. Saulnier, *et al.* *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). Int J Syst Evol Microbiol, v.54, n.Pt 6, Nov, p.2137-40. 2004.

Francini-Filho, R. B., R. L. Moura, *et al.* Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). Mar Pollut Bull, Mar 16. 2008.

Fukuda, H., A. Kondo, *et al.* Biodiesel fuel production by transesterification of oils. J Biosci Bioeng, v.92, n.5, p.405-16. 2001.

Gandhi, N. N. Applications of Lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS) v.74, n.6. 1997.

Gauger, E. J. e M. Gomez-Chiarri. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. Dis Aquat Organ, v.52, n.1, Nov 7, p.39-46. 2002.

- Ghannoum, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev, v.13, n.1, Jan, p.122-43, table of contents. 2000.
- Glynn, P. W. e D. E. W. Wh. Elimination of Two Reef-Building Hydrocorals Following the 1982-83 El Nino Warming Event. Science, v.253, n.5015, Jul 5, p.69-71. 1991.
- Gomez-Gil, B., M. A. Herrera-Vega, *et al.* Bioencapsulation of two different vibrio species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). Appl Environ Microbiol, v.64, n.6, Jun, p.2318-22. 1998.
- Gomez-Gil, B., S. Soto-Rodriguez, *et al.* Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. Microbiology, v.150, n.Pt 6, Jun, p.1769-77. 2004.
- Gomez-Gil, B., F. L. Thompson, *et al.* *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. Int J Syst Evol Microbiol, v.54, n.Pt 1, Jan, p.261-5. 2004.
- Gupta, N., G. Mehra, *et al.* A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. Can J Microbiol, v.50, n.5, May, p.361-8. 2004.
- Gupta, R., N. Gupta, *et al.* Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Appl Microbiol Biotechnol, v.64, n.6, Jun, p.763-81. 2004.
- Haki, G. D. e S. K. Rakshit. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresour Technol, v.89, n.1, Aug, p.17-34. 2003.
- Hannig, G. e S. C. Makrides. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol, v.16, n.2, Feb, p.54-60. 1998.
- Hardeman, F. e S. Sjoling. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. FEMS Microbiol Ecol, v.59, n.2, Feb, p.524-34. 2007.
- Hasan, F., Shah A. A., Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology, v.39, p.235-251. 2006.
- Hedreyda, C. T. e D. R. Ranoa. Sequence analysis of the *Vibrio harveyi* ornithine decarboxylase (*odc*) gene and detection of a gene homologue in *Vibrio campbellii*. J Gen Appl Microbiol, v.53, n.6, Dec, p.353-6. 2007.
- Hill, J. E., D. Kysela, *et al.* Isolation and assessment of phytate-hydrolysing bacteria from the DelMarVa Peninsula. Environ Microbiol, v.9, n.12, Dec, p.3100-7. 2007.
- Hormansdorfer, S., H. Wentges, *et al.* Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria. Int J Hyg Environ Health, v.203, n.2, Oct, p.169-75. 2000.

- Hornstrup, M. K. e B. Gahrn-Hansen. Extraintestinal infections caused by *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in a Danish county, 1987-1992. Scand J Infect Dis, v.25, n.6, p.735-40. 1993.
- Jaeger, K. E. e T. Eggert. Lipases for biotechnology. Curr Opin Biotechnol, v.13, n.4, Aug, p.390-7. 2002.
- _____. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. Curr Opin Biotechnol, v.15, n.4, Aug, p.305-13. 2004.
- Jaeger, K. E., S. Ransac, *et al.* Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev, v.15, n.1, Sep, p.29-63. 1994.
- Jaeger, K. E. e M. T. Reetz. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol, v.16, n.9, Sep, p.396-403. 1998.
- Kadokura, K., A. Rokutani, *et al.* Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. Appl Microbiol Biotechnol, v.75, n.2, May, p.357-65. 2007.
- Kennedy, J., J. R. Marchesi, *et al.* Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. Microb Cell Fact, v.7, p.27. 2008.
- Kim, J. T., S. G. Kang, *et al.* Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. Appl Microbiol Biotechnol, v.74, n.4, Mar, p.820-8. 2007.
- Kirk, O., T. V. Borchert, *et al.* Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol, v.13, n.4, Aug, p.345-51. 2002.
- Knowlton, N. The future of coral reefs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.98, n.10, p.5419-5425. 2001.
- Koeller, K. M. e C. H. Wong. Enzymes for chemical synthesis. Nature, v.409, n.6817, Jan 11, p.232-40. 2001.
- Koren, O. e E. Rosenberg. Bacteria associated with the bleached and cave coral *Oculina patagonica*. Microb Ecol, v.55, n.3, Apr, p.523-9. 2008.
- Kushmaro, A., E. Banin, *et al.* *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. Int J Syst Evol Microbiol, v.51, n.Pt 4, Jul, p.1383-8. 2001.
- Kushmaro, A., Y. Loya, *et al.* Bacterial infection and coral bleaching. Nature, v.380, n.6573, p.396-396. 1996.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

- Leao, Z. M. e R. K. Kikuchi. A relic coral fauna threatened by global changes and human activities, Eastern Brazil. Mar Pollut Bull, v.51, n.5-7, p.599-611. 2005.
- Leão, Z. M. A. N., R. K. P. Kikuchi, *et al.* Corals and coral reefs of Brazil. In: J. Cortés. (ed.). Latin American coral reefs. Amsterdam: Elsevier Science. 2003. 5-9 p.
- Lee, K. K., S. R. Yu, *et al.* Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Curr Microbiol, v.34, n.2, Feb, p.110-7. 1997.
- Liu, P. C. e K. K. Lee. Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. Lett Appl Microbiol, v.28, n.6, Jun, p.428-30. 1999.
- Luna, G. M., F. Biavasco, *et al.* Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. Environ Microbiol, v.9, n.7, Jul, p.1851-7. 2007.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol Mol Biol Rev, v.66, n.3, Sep, p.506-77, table of contents. 2002.
- Margolin, A. L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. Enzyme Microb Technol, v.15, n.4, Apr, p.266-80. 1993.
- Miller, V. L. e J. J. Mekalanos. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J Bacteriol, v.170, n.6, Jun, p.2575-83. 1988.
- Nakayama, T., N. Nomura, *et al.* The effect of copper concentration on the virulence of pathogenic *Vibrio harveyi*. J Appl Microbiol, v.102, n.5, May, p.1300-6. 2007.
- Newman, J. R. E. F., C. Broad - host - range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator. Gene, v.227, p.197-203. 1999.
- Nishiguchi, M. K. e V. S. Nair. Evolution of symbiosis in the Vibrionaceae: a combined approach using molecules and physiology. Int J Syst Evol Microbiol, v.53, n.Pt 6, Nov, p.2019-26. 2003.
- Ranganathan, S. V., S. L. Narasimhan, *et al.* An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresour Technol, v.99, n.10, Jul, p.3975-81. 2008.
- Rapp, D. e T. Olivecrona. Kinetics of milk lipoprotein lipase. Studies with tributyrin. Eur J Biochem, v.91, n.2, Nov 15, p.379-85. 1978.
- Rohwer, F. Rohwer, *et al.* Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. Coral Reefs, v.20, n.1, p.85-91. 2001.

Rohwer, F., V. Seguritan, *et al.* Diversity and distribution of coral-associated bacteria. Mar. Ecol. Prog. Ser., v.243, p.1-10. 2002.

Rondon, M. R., S. J. Raffel, *et al.* Toward functional genomics in bacteria: analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.11, May 25, p.6451-5. 1999.

Rosenberg, E. e Y. Ben-Haim. Microbial diseases of corals and global warming. Environmental Microbiology, v.4, n.6, p.318-326. 2002.

Rosenberg, E., O. Koren, *et al.* The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. Nat Rev Microbiol, v.5, n.5, May, p.355-62. 2007.

Rui, H., Q. Liu, *et al.* Roles of LuxR in regulating extracellular alkaline serine protease A, extracellular polysaccharide and mobility of *Vibrio alginolyticus*. FEMS Microbiol Lett, v.285, n.2, Aug, p.155-62. 2008.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989

Santavy, D. L., J. K. Summers, *et al.* The condition of coral reefs in South Florida (2000) using Coral disease and bleaching as indicators. Environ Monit Assess, v.100, n.1-3, Jan, p.129-52. 2005.

Sawabe, T., K. Hayashi, *et al.* *Vibrio gallicus* sp. nov., isolated from the gut of the French abalone *Haliotis tuberculata*. Int J Syst Evol Microbiol, v.54, n.Pt 3, May, p.843-6. 2004.

Saxena, R. K., A. Sheoran, *et al.* Purification strategies for microbial lipases. J Microbiol Methods, v.52, n.1, Jan, p.1-18. 2003.

Sharma, R., Y. Chisti, *et al.* Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnol Adv, v.19, n.8, Dec, p.627-62. 2001.

Sharon, G. e E. Rosenberg. Bacterial growth on coral mucus. Curr Microbiol, v.56, n.5, May, p.481-8. 2008.

Shivu, M. M., B. C. Rajeeva, *et al.* Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. Environ Microbiol, v.9, n.2, Feb, p.322-31. 2007.

Shnit-Orland, M. e A. Kushmaro. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. FEMS Microbiology Ecology, v.67, n.3, p.371-380. 2009.

Sommer, P., C. Bormann, *et al.* Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. Appl Environ Microbiol, v.63, n.9, Sep, p.3553-60. 1997.

- Spier, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná., Curitiba, 2005. 178 p.
- Sun, B., X. H. Zhang, *et al.* A single residue change in *Vibrio harveyi* hemolysin results in the loss of phospholipase and hemolytic activities and pathogenicity for turbot (*Scophthalmus maximus*). J Bacteriol, v.189, n.6, Mar, p.2575-9. 2007.
- Sussman, M., J. C. Mieog, *et al.* *Vibrio* zinc-metalloprotease causes photoinactivation of coral endosymbionts and coral tissue lesions. PLoS ONE, v.4, n.2, p.e4511. 2009.
- Sussman, M., B. L. Willis, *et al.* Coral pathogens identified for White Syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific. PLoS ONE, v.3, n.6, p.e2393. 2008.
- Taipa, M. A., M. R. Aires-Barros, *et al.* Purification of lipases. J Biotechnol, v.26, n.2-3, Nov, p.111-42. 1992.
- Tamura, K., J. Dudley, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, v.24, n.8, Aug, p.1596-9. 2007.
- Teo, J. W., L. H. Zhang, *et al.* Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. Gene, v.312, Jul 17, p.181-8. 2003.
- Thompson, C. C., A. C. Vicente, *et al.* Genomic taxonomy of *Vibrios*. BMC Evol Biol, v.9, p.258. 2009.
- Thompson, F. L., D. Gevers, *et al.* Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. Appl Environ Microbiol, v.71, n.9, Sep, p.5107-15. 2005.
- Thompson, F. L., T. Iida, *et al.* Biodiversity of vibrios. Microbiol Mol Biol Rev, v.68, n.3, Sep, p.403-31, table of contents. 2004.
- Thompson, F. L., C. C. Thompson, *et al.* *Photobacterium rosenbergii* sp. nov. and *Enterovibrio corallii* sp. nov., vibrios associated with coral bleaching. Int J Syst Evol Microbiol, v.55, n.Pt 2, Mar, p.913-7. 2005.
- _____. Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol, v.41, n.5, May, p.1946-50. 2003.
- Torsvik, V. *Molecular Microbial Ecology Manual*: 14 p. 2004.
- Van Beilen, J. B. e Z. Li. Enzyme technology: an overview. Curr Opin Biotechnol, v.13, n.4, Aug, p.338-44. 2002.
- Wang, S. X., X. H. Zhang, *et al.* Genes encoding the *Vibrio harveyi* haemolysin (VHH)/thermolabile haemolysin (TLH) are widespread in vibrios. Wei Sheng Wu Xue Bao, v.47, n.5, Oct, p.874-81. 2007.

- Wei, P., L. Bai, *et al.* Characterization of two soil metagenome-derived lipases with high specificity for p-nitrophenyl palmitate. Arch Microbiol, v.191, n.3, Mar, p.233-40. 2009.
- Weil, E., G. Smith, *et al.* Status and progress in coral reef disease research. Dis Aquat Organ, v.69, n.1, Mar 23, p.1-7. 2006.
- Wild, C., M. Huettel, *et al.* Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. Nature, v.428, n.6978, Mar 4, p.66-70. 2004.
- Ye, J., Y. Ma, *et al.* Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. J Fish Dis, v.31, n.3, Mar, p.161-9. 2008.
- Zanetti, S., A. Deriu, *et al.* Differentiation of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Sardinian waters by ribotyping and a new rapid PCR fingerprinting method. Appl Environ Microbiol, v.65, n.5, May, p.1871-5. 1999.
- Zhang, C., L. Yu, *et al.* Characterization of OmpK, GAPDH and their fusion OmpK-GAPDH derived from *Vibrio harveyi* outer membrane proteins: their immunoprotective ability against vibriosis in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). J Appl Microbiol, v.103, n.5, Nov, p.1587-99. 2007.
- Zhang, W. W., K. Sun, *et al.* Characterization of DegQVh, a serine protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain. Appl Environ Microbiol, v.74, n.20, Oct, p.6254-62. 2008.
- Zhang, X. H. e B. Austin. Haemolysins in *Vibrio* species. J Appl Microbiol, v.98, n.5, p.1011-9. 2005.
- Zhong, Y., X. H. Zhang, *et al.* Overexpression, purification, characterization, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* hemolysin VHH. Infect Immun, v.74, n.10, Oct, p.6001-5. 2006.

10. APÊNDICE

10.1 MEIOS DE CULTURA

10.1.1 TSA_Tryptic Soy Ágar

(Sambrook, Fritsch et al., 1989)

Triptona.....	1,5%
Peptona de soja	0,5%
NaCl	0,5%
Agar bacteriológico.....	1,5%

Obs.: Para Tryptic Soy Broth (TSB), não acrescentar o Ágar bacteriológico ao meio.

10.1.2 LB_Luria Bertani

(Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989)

Triptona.....	1%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	1%
Ajustar o pH para 7. Autoclavar por 20 minutos, 121°C.	

10.1.3 Meio M2

Na ₂ S ₂ O ₃ (5H ₂ O).....	1%
Glicose	0,8%
MgCl ₂	0,1%
NH ₄ Cl ₂	0,03%
FeCl ₃ (6H ₂ O).....	0,004%
Fitato de sódio.....	0,3%
CaCl ₂	0,5%
Biotina.....	0,001%
Solução elementos traço	1%

Solução elementos traço

Ácido cítrico	5g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6H ₂ O.....	1g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	5g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,25g
MnSO ₄	0,05g
H ₃ BO ₃	0,5g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O.....	0,05g
Água	q.s.p 100mL

10.1.4 Meio SOB

(Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989)

Triptona.....	2,0%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	10mM
KCl	2,5mM
MgCL ₂	10mM
MgSO ₄	10mM
Ajustar o pH para 7. Autoclavar por 20 minutos, 121°C.	

Obs.: Para meio SOC, acrescentar após autoclavar:

Glicose	20mM
---------------	------

10.2 ANTIBIÓTICOS, SOLUÇÕES UTILIZADAS E REAGENTES

Ampicilina

Solução estoque: 50mg/mL em água estéril

Estocar protegido da luz a -20°C.

Concentração usual: 100µg/mL.

Tetraciclina

Solução estoque: 10mg/mL em etanol

Concentração usual: 20µg/mL.

Cloranfenicol

Solução estoque: 20mg/mL em etanol

Concentração usual: 12,5µg/mL.

IPTG (Isopropil-beta-D-Tiogalactopiranosideo)

Solução estoque: 200mg/mL em água. Solução esterilizada por filtração em membrana Millipore[®] de 0,2µm. Estocar a -20°C.

Protocolo De Preparação Da Sílica

1. Ressuspender 5g de sílica (Sigma-Aldrich, INC; S-5631) em 50mL de tampão PBS (10X, pH 7,4: NaCl 1,37M; KCl 2,7M; Na₂PO₄ 1,2M; KH₂PO₄ 1,2M; NaN₃ 0,02% (m/v);
2. Deixar a sílica precipitar por 2 horas;
3. Descartar o sobrenadante contendo finas partículas de sílica;
4. Repetir a lavagem da sílica;
5. Precipitar por 2 minutos a 2000g e descartar o sobrenadante;
6. Adicionar NaI 3M para concentração final de 100mg de sílica por mL;
7. Estocar a sílica em suspensão a 4°C.

10.3 SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DE Lip_ *alg1*

ggtgtagtaatgctcaatgccattaccccaaggatccggataaaaaacttaataaacggcgctatatgcgatgaaaaattgctgaccacttaaattgaagagtgagatgacagtgaaaatcagccctaaactaaacacaaatggaaccaggcctaagtaaccgagttgtagcatggtgagcgtggtgcatgctgacacctataattgtgctctatcatattgtaagcgtagtagtctgctggatgaggagcttgaaaaagtagcaataactttacctcagagctaattagaaactgtagaagttccattttggtttatgcctgcttggttagtaactggtggaagactgggttcgatctacacctaactgaagagcagccatcattgaaaagggtaccccgtaatcgagataacagactttcgtgtgtttttcgttctctatcttctcgtcgaagtcattgctcgggaaaccgataaccggtgaagttttgctttgtaagttgatagaggttctaactgttcgaactgaggagtgaagccgactggctgtgtattgacgaccagaagcgtcttccctaaagctttcgcatagactgacttctccgttgagtttaacaacctttgcttacctgaagaatatcagggcactcagatgcaagagcaagcgaattcatggagagaaagctaacgagagcggcgaagttcagtaactctttcatggtgtgttcccctgtttcaataagtataactacttaagtgcaagagatcgatcaaaaaagccgcacaaatgcgcggttttcaagagctgagatctgactatgccagttcaactgaactggttcagtgatcattaccatacttaactgtagtaccggcatggtgtcagggcaccgaatgtacgatctccggtgcctttgccatcgtccatctgattggcacttcacacgtacgccagcgggtgaaagccctgccattgcatcagatcaatcgtaccttctgttgaccacggcgagtcattacaccacctggacgtgcgcgagagggaaatcgtgaccggcgagcaagatctccggttttgcgtgcgggtttgccgcgttttaatggctgttacgcggtctgctgctgaaacaccgttgttaccaactttcgttcaatagaaaccgtaaatgcggtttggtttgcgctgtgtgtttaccaccattggagcagttccagtttctgctgttgaacatctgtaagcacaacaaacgatccgctacattccggatcatcaatgccattgctcgttagtgaggtgctcactgaataaatgatcgccttcgtttcgcgatcttcatcaagaagcagtagccacggccttctttaaagcgataagtgcgtttcaacgcgagtaattgggtcggcgaatcggcaagtagtgactgatcatggttaactcctaaattaccagaatcagggcggtatgagagatcggcgtaaaatacgtacaaaaagagtgaccagcattcttagcgtactgactgctatgctggtgtattcttattcttcttcatccggactataaccgtcggctctggcatcaccagatctgctgactcgcacgaatcgagcgtcgcgggctcactgaaaaagtataaccggcgtggggaatttcgccccgcctgagaacaattaaaaagtgtccacttcaagttgtgaagaagtggagctaggatagtagtgcgaactgaatagcttgaaaagtcgattccatctgtatgtagaaaagtgtctatcgacggaaataatctgtcgaataaagtgatcaatctgctcggcacgaaggtgtgtaaatcaggtcgtatgcgtttgcttcaactcgatgatcttgcataaccgtccagcttctctacggtaacggtaccgtccgacatggtgttgcattacgatcaacaatggcgagcacaatcggcatcgttctgcgatactgccagttttgaggagatcccaagcgtcatcatgtttgtttaatccgtggtgtggcgaattgcctaaaattgcaccaatccgagatcttgaattcggcctacaatggacgcgcctttaaaggcgcaacgatagcgacaacatgagagattaagttagtgctcggtttctgttggcgagatagcgttaatcatcaagcctcccaagctgtgcccacgaggacgtttgtggtcagtggttaagcgaatgatcaatagaatcaaacagtgaagactcatcgatagcaaacgtgttatagctgagtagtctgcttctgatccgagtttctcagcttttggctaagaggctgcatgaccagccatgcatataagaccatgtaagatgatgattttcataactcctagattatgacgtcgaataatcctacttaattgacaagaaactactgtgctttgtggtgcatatttacgttttctgaaaagttttagctgctgtagcaagcactcagcccagtaaatcctgtactgttgttgcaattgatgacgattaaagacgcgagacttaacactcaccgattacaacatccactttgacaaaaacgagtcggctgtttgtgagagcatgtccgcctttgtggctgaaa aaagaaccccaagccctttaaagcctatagggatgacaggaacaggggttacgttctaggatttttcacaccagggcgaaactc acccaattgaccgttagacgttaaacgacctcagggagatacagacaacctaccgtcgttaagtgttcaatctgttcaaat gctcgtcggtaagtgtcggcacacttacgtggagaacagatcgggataaacaccggcatgacggaatacatattaagaacagtgatcgcgtgatggactgtccatcacaaaacgaaccggcgagtagaggttccatcaaatcaatgcatcgacatagctaactggttagccacgattaacgcagcaccctgttcaggaatatgttggcggcctttacggacacacgatacataaatggtgagtaataac tgataaagcgttgtgtaaatccgggtacttggcgatatacatagatgccacgaaaaagttaacctattgcatatggtgcaaacagttc acaatagaaagctctagtagctgagtacaacgatcgaaccaaagcagacaccaccataaacgcattcatgatgttgttagc agcaatggcacgtgcacactccctttgttgaacgcgattggatgaacgcataaagaggaacaataaagacaccgcccttacac caacaaggaacaggtcaatcatgacgcgcagatgtttgaltcagcaacgaagctttgcacatcaaaaagtgcaccggaagtgat ggataacttgggactgccatagcaagtcgacgcaaaagactgtcagaccaaggataccgaatggcaaaaataccaagctcaacg tggttgaaagaaaagttttcacacaaccaagagcctgtcgcgataccaatcgaacaatgccaacagtaaaagaaacgacagtgt atctgcgaacaatgttcgctgcgaaggttagggaattgagttagtaagtcgacccatgaaccagaaccaactgatggcaaga atagacatccagatgcctctctgtttttgccactttaacgtgttctttaaaccagaaatcggttcaaatctcgtttgtcattc gattggc taggcatcgttggaaatcaccgctgctcatgaaccaagcaagacaaggcaatcacggtacaagaagcaatcaaggtaccatta

ggaatggctagcagcaggcctgcgctaagcgtacctataagaatcgaagaaacgtgccattcaaccaagcatttccttaac
aagctcatttggttgagcgcctgtggaacaaggcgtattcacgggacaaaataggccgattgagtgccataaacagcag
aaccagcatcagcatggcacttgggtggcaatagcgggtgctgcgcaagacatgatagccagctc gatgagcttagacgtcg
attaatttgcttgcctcatgctgtcagcgcggcaccagcatgcgctgagaatagaagaaaggtaggatgaataagcctgccgc
caaattaacgaatagattgacggatattgtaggttatcaattggctgtatgcatcacaataacagaacgtttttagatggtgcat
tgagtgcgccaaggcattgcgtcacaagtaaggaaaaagcgtttgagaaaacatacgggccccgattaacaagtcgaat
gagatgggagcactttatgctcaatgaacgattaaccagctttcttcaagtacggttatgccacaaaagtaacgaaatcgt
tacttcattccattcgtttattgagttactaattccgagactctgagcagggtttcttcccatggtcaaacagagggaacgtccaac
gacgcacgcgaataatcagagaggtgccgtgtttcgtccatcgcagagagctatcatttggcaagcctgataaaactcgcgat
gacctttgcagttctgtttagcttctgttgcctgactcagctcgttgcctggagaactttcattccaccagaaaagta
gctttggaaaaggcgtcttgaactgctgttgaagaaccgttgaataggccgccatctgccacttaaatgctggagatatac
caaacgaatttgttattggctgcaagtcgatgatgttcagacgatccaaatgagcaagctttgcaccagttcaaacctcattgaaggt
gtattgctgaacgattgctcaactgatagccattfacaacacagattgccacgagtagcagggtttatcatcaaccaactgcttcc
ttgctcctaacgttagcactctagacctttattgtgcgcagccgcgatctaaacagttccgccatttctaaaccaatcaattggcaaat
gcgttctaagcgttcaagactaatgtgtgacctcagcagtaaacgttgacgcttcctcacttaaatcaaggtgttgcaacatc
ggcataatgcagcccagctaaccttagttggcgttaagctcttaaftaacgtataactctctgacatttacgctgttacctcgtcgtgta
actgctctaggtagcttgcataaagggtttgcgttttgcgcttcgctctgctgactctgtgtcatggttcagcgaatttgaataact
ggtttgaaagtgatccagagtgaattgttatcgtaagttcacgttctcggcaaatatcgcgtgctgtgtaagttgcgcgttaact
gagtgctgacttgaatgcatcgcgtcacgccaattgcgcctaaagcgtccagacggcgcacatctggacgatttggctccaacg
tattggcctgatgttgcgctaaagctgtgtgcctctatcgcgatgagcaatggcatcatgatattgctgc*

*Em amarelo, as porções obtidas pelo sequenciamento utilizando os primers específicos para o vetor pCF430.

10.4 SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ORFS EM Lip_{alg1}

3' - 5' Frame 1

CITGCLFA **Stop** LLYLPERSPKSQRELNHRSQKS
GRIFREYRLSAAIS **Stop** CHCSCDRGTQL **Stop** RK
HQAKYVGSQNRPRCRPSGRFRRNWRDA **Met** H
SSQHSV **Stop** RATLQRQRYICRRT **Stop** T **Stop** R
Stop TIHSGSLSNQVIQNR **Stop** NHEHRVSKTRSA
KTQONLYANVPRAVTRRGNSVNVRELYVN **Stop** R
A **Stop** TPTKVSWAALCRCCTTP **Stop** FK **Stop** RKRQ
TFTR **Stop** RSTH **Stop** S **Stop** TLRTHLPIDWFRNGG
TV **Stop** DRGCAQ **Stop** RSRVANVRARKAVG **Stop**
Stop **Stop** SPATRGNLCCKWLSV **Stop** ANRSAILHLQ
Stop V **Stop** TGAKACSFSGSSEHHRLAAK **Stop** QNSF
AYISDI **Stop** VADGRPYSTVLPTASSRRLFPKLL
FW **Stop** R **Stop** KVLHGNRTDECTKQQEATTETAK
GHR **Stop** VLSGLPK **Stop** **Stop** LSRYGKARHLSDY
CDASLDVPSV **Stop** T **Met** GKKTCEVSELVTQ
Stop TNGNESNEFRYFWWHTTSLERESWFNRS
LSIKCSHLIRLCLIGAR **Met** FFSKRFFPYFVTQC
LGALNDNIYKNVLLL **Met** VTYSQIDNLPISVNLF
VNLAAGLFILPFFLFSAHAGAVADS **Met** DKAKLI
RRLKLIELAI **Met** SCAATAIATQSA **Met** L **Met** LVLL
F **Met** TGTQSAYFGPVKYALLPQALKPNELVKGN
AWVE **Met** GTFLSILIGTLSAGLLAIPNGTLIASC
TVIALSLLGF **Met** SSVNIPT **Met** PSQSNDKAKFEP
ISGLKNTLKVAKKQRGIW **Met** SILAISWFWF **Met**
GATYLTQFPNFAREHLFADSTVVSLLLALFSIG
IATGSWLCEKLSFNHVELGILPFGILGLTVFGV
DLLWAVPSYPVSLPVHFYDVQSFVAESKHLRV
Met IDLFLVGVSGGVFIVPLYAFIQSRSNKGECA
RAIAANNI **Met** NALF **Met** VVSALVSIVVLSVLELSI
VELFA **Met** **Met** AIGNFFVAIYVYRQVPEFTQRFIS
YLLSHC **Met** YRVSVKGRQHIEPQGAALIVANHV
SYVDALIL **Met** GTSTRPVRV **Met** DKSISELPVLK
YVFRHAGVIPICSPRKCADTYRRAFEQIEQAL
NDGEVVCIFPEGRLTSNGQLGEFRPGVEKILE
RNPVPVIP **Met** ALKGLWGSFFSHKGGHALTKRP
TRFW SKVDV VIGEVLSPASLNRHQLQQVQD
LLG **Stop** VACYSSQNFAEKRYAPQSTSSFLSIR
VGYYDVINLGGI **Met** KIIILHGLY **Met** HGLV **Met** QP
LSQKLRKLG YETQVLSYNTVAIDESSLFDSIDH
SLNPLTTNVLVGHSLGGL **Met** IKRYLANRKPST
NLISHVVAIGSPLKGASIVGRIQDLGLGAILGN
SPHHGLNKHDDAWDLPQKLGSIAGT **Met** PIGAR
PLLIRNDNT **Met** SDGTVTVEETRLDG **Met** QDHIE

Proteína
transmembrana
permease da
família das acil
transferases

Lipase putativa

VKQTHTS LIYNTFV PQQIDHFIRTDYFRR **Stop** H
TFPSYRWNRLSKLFS SQYYPSSSTSSQLE **Stop** S
GTFLIVLRAGRNSPPAVYFFK **Stop** ARERSIRRG
QQIW **Stop** DARADGYSPDERE **Stop** EYTSIASQIA
KNAGALLFDRILRRSLIPP **Stop** FW **Stop** NLGVNH
ESVITTCRIRRPNYSR **Stop** KRTRYRFKRRPWRT
AS **Stop** **Stop** **Stop** RSRKRRRYHLFSRAPH **Stop** RAN
GIDDPR **Met** **Stop** RHRLFVLNRCSSRQTGTASNG
GKQQQRKPNRIYGFY **Stop** SESWCNNGCFSSR
PRNDH **Stop** NGGKPARKTGRSCSPGSRIPSART
SRWCNDSPWSHRRYD **Stop** SDANGRASTRWRT
V **Stop** SDQSRWHDGKGTGDRSIRSPAQHAGTD
D **Stop** RYGNVPEPVRVETGIVRSQLLKKPRICAA
FLIDPLCT **Stop** VVILIENKGNNT **Met** KGLLNFAAL
VSFLS **Met** NSLALASECPDILQGKQRLLNSTEE
VDLCESFKGKTLLVVNTASQCGFTPQFEQLET
LYQTYKDQNFTVIGFPSNDFRQDRGSETNTAK
VCYLDYGVTFP **Met** **Met** ARSSVLGVDANPVFNQI
TNQAGIKPKWNFYKFLISSEGGKVIATFPSSTSP
TSTTLTN **Met** IEQQL **Stop** GDDHDNTLNHATTRLL
RPGSICV **Stop** FRADFH **Stop** HLTTLQFKWSAIFHR
I **Stop** RRYIKFFIRHPLG **Stop** WH **Stop** ALLPPP

Proteína
putativa do
tipo
transportador
ABC ou GSH
peroxidase, da
super família
tioredoxina

3' - 5' Frame 2

VLPAAYLHDCFTYPKDH PNRKESSIIAAKKA
VA
FLESIDYLQQYHDAIAHAIEAHSFSANIRPNTL
EAKIVQDADRLDALGAIGVTRCIVSTQFNAQ
LYNDS DIFAEERELNDKQFTLDHFQTKLFKIAE
T **Met** NTESARREAQKRKTF **Met** QTYLEQLHDEV
TA **Stop** **Met** SESYTLIKELKRQLKLAGLHYADVAQ
HLDLSEGSVKRLLAEGQHISLERLERICQLIGL
E **Met** AELFKIAAAHNKGLSLTLEQEKQLVDDK
ALLVAICVVNGYQFEQIVQQYTFNEFELVQKL
AHLDR LNIIDLQPNNKIRLRISPTFKWQ **Met** GGP
IQRFFQQVQDAFFQSYFSGEDEKFS **Met** ATGL
Met SVPSNKKLQKQLQKVIDEFYQACQNDSSLD
Met DEKHG TSLIIA **Met** RRWTFPLFEPWERKPAQ
KSRN **Stop** **Stop** LNK R **Met** E **Met** KVTNFVTFGGIQR
HLKEKAGLIVH **Stop** A **Stop** SAPI SFDV **Stop** SGPV
CFSQNAFFLTL **Stop** RNALAH S **Met** TTSTKTF CY
Stop W **Stop** HTAKLITYQYPSIYSLIWRQAYSSYL
SFYSQR **Met** LVPSLTAWTKPN **Stop** SDV **Stop** SSS
SWLSCLAQQPLLPPKVPC **Stop** CWFCCL **Stop** QA
LNRPI LVP **Stop** NTPCYHKRSNQ **Met** SLLKE **Met** L
GLKWARFFRFL **Stop** VRLAQACC **Stop** PFL **Met** VP
Stop LLLVP **Stop** LPCLCLGS **Stop** AA **Stop** IFQRCLA

Proteína tipo
hélice-giro-
hélice da
família XRE
(elemento de
resposta à
xenobiótico)

NR **Met** T KRNLNRFLV **Stop** RTR **Stop** KWQKNREAS
 GCLFLPSVGSWSVRLT **Stop** LNSLTSHANICS
 QIALSFLYCWHC FRLVSRQALGCVKNFLSTTL
 SLVFCHSVSLV **Stop** QSLASTCYGQSQVIHHFR
 CTF **Met Met** CKASLLNQNICAS **Stop** LTC SLLV **Stop**
 AAVSLLFLF **Met** RSSNRVQTKG SVHVPLLLTTS
Stop Met RCLWWCLLWFRSLYSAY **Stop** SFLLWNC
 LP **Stop** WQ **Stop** VTF SWRS **Met** YIAKYRNLHNALS
 VIYSAIVCIVCP **Stop** RGANIFLNKVLR **Stop** SWLT
Met LA **Met** S **Met** H **Stop** F **Stop** WEPLLARFVL **Stop** WT
 SPSASYLFLN **Met** YSV **Met** PVLRSVVLHVS VPTL
 TDEHLNRLNKHLTTVRLSVSSLRVV **Stop** RLTVN
 WV SFALVWKKS **Stop** NVTFLSSLWR **Stop** KGFG
 VLFSATKAD **Met** LSQNDRLVFGQKW **Met** L **Stop** SV
 KC **Stop** VLRL **Stop** IVINCNNKYRIYWAESLATAV
 KTLQKNVN **Met** HHKAQVVSCQLE **Stop** DITTS **Stop**
 I **Stop** EVL **Stop** KSSSY **Met** VFIC **Met** GWSCSLLAKS
Stop ENSDTKRKYSAITLLLS **Met** SLHCLILLIIRLI
 H **Stop** PQTSSWDTAWEA **Stop Stop** LSAISPTENRA
 LT **Stop** SL **Met** LLSLSVRLKARPL **Stop** AEFKISDW
 VQF **Stop** AIRHTTD **Stop** TN **Met Met** TLGISLKNSAV
 SQERCRLVLAHC **Stop** SV **Met** TTPCRTVPLP **Stop**
 KRQDWTVCKIISK **Stop** SKRIRA **Stop** FTTPSCRS
 RLITLFAQIISVDSTLFHHTDGIDFPSYSVRSTI
 LAPLLHNLNEVAHF **Stop** LFSGRGEIPHRRYTFS
 SEPASARFVEVSRSGE **Met** PEPTVIVR **Met** KENK
 NTPA **Stop** RVRSLR **Met** LVHFFLIVFYGDLSYRPD
 SGEI **Stop** ELT **Met** NQSSLLAEFGDPITRVENALI
 ALKEGRGVLLLDDEDRENEGDIISVEHLTNE
 Q **Met** AL **Met** IRECSGIVCLCLTDVQADKLELPP
Met VVNNNSANQTAFTVSI EAKVGVTTGVSAAD
 RVTTIKTAANPHAKPEDLARPGHVFLRARG
 GV **Met** TRRGHTEGTIDL **Met** Q **Met** AGLQPAGVLC
 EVTNPDGT **Met** AKAPEIVAFGR LHN **Met** PVL TIE
 D **Met** V **Met** YLNQFELKLA **Stop** SDLSS **Stop** KSRAFV
 RLF **Stop** SILFALK **Stop** LYLLKTRGTTP **Stop** KDY
Stop TSPLSLAFSP **Stop** IRLLLHLSALIFFKVS KG
 C **Stop** TQRKKS IYAKALRERRFWSSIQQASAAS
 LLSSNS **Stop** KPSIKLTKTKTSPLSVSRA **Met** TFD
 KIEEAKQTQRKSVISITG **Stop** PFQ **Stop** WLALQY
Stop V **Stop** **Met** RTQSSTRLLTKQA **Stop** NQNGTSTS
 F **Stop** LALKVKLLLLFQAPHHRQVLRLPI **Stop Stop**
 SNNYKVTT **Met** TTRST **Met** LQLGYLGLVPFVFSL
 GLIFTDISLFNLSGQQFFIAYSAVILSFLSGILW
 GNGIEHYHRL

Proteína da
 família DHBP
 sintase (3,4-
 dihidroxi-2-
 butanona 4-
 fosfato sintase

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)