

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ - UNIVALI
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS DA TERRA E DO MAR – CTTMar

Jessica Engel Montemor

Prospecção de proteases codificadas por bactérias marinhas de profundidade e efeito de enzimas na hidrólise de resíduos de pescado

Itajaí-SC
2016

Jessica Engel Montemor

Prospecção de proteases codificadas por bactérias marinhas de profundidade e efeito de enzimas na hidrólise de resíduos de pescado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade do Vale do Itajaí como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental

Orientador: Dr. André Oliveira de Souza Lima

Co-orientador: Dr. Marcos Luiz Pessatti

Itajaí-SC
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos que me orientaram, Dr. André Oliveira de Souza Lima e Dr. Marcos Luiz Pessatti por todo apoio e por me permitirem crescer e aprender com vocês.

A UNIVALI e CNPq por me propiciarem dar seguimento a mais esta etapa através da infraestrutura e apoio científico.

Ao pessoal do LGM por me auxiliarem sempre que precisei, e tornarem meus dias mais divertidos e de extremo conhecimento.

A minha família por todo apoio e compreensão perante minhas escolhas.

Ao meu marido e meu filho pelo companheirismo nos momentos mais difíceis; apoio em todas as minhas decisões e paciência nos momentos que foi necessário alterar nossa rotina familiar para que eu alcançasse mais este objetivo.

Aos amigos que mesmo longe mantiveram-se sempre ao meu lado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE APÊNDICES	ix
LISTA DE ABREVIACES	x
RESUMO.....	xi
Abstract	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ambiente marinho profundo e organismos marinhos de profundidade.....	1
1.2 Enzimas	1
1.3 Aplicação industrial de enzimas proteolticas e cenário brasileiro industrial	3
1.4 Prospecção de dados genômicos e metagenômicos.....	5
1.5 Aplicação de enzimas no hidrolisado proteico de pescado	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo Geral	8
2.2. Objetivos Especficos	8
3. MATERIAIS E MTODOS	9
3.1. Origem das bactrias marinhas de profundidade e extração do DNA genômico.....	9
3.2. Avaliação das protenas e seleção das proteases alvo	10
3.3. Clonagem dos genes alvo	11
3.3.1 Desenho de primers para os genes alvo	11
3.3.2. Amplificação dos genes alvo	12
3.3.3 Digestão e ligação	12
3.3.4. Transformação	14
3.3.5. Avaliação dos transformantes quanto a presena do gene alvo	14
3.4. Avaliação da atividade enzimática.....	15
3.5. Avaliação da hidrólise de pescado	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Avaliação das protenas e seleção das proteases alvo	17
4.2. Clonagem dos genes alvos	20
4.3. Ligação ao vetor pBADMyHisB.....	23
4.3.1. Avaliação de atividade (vetor pBADMyHisB)	25
4.4. Ligação ao vetor pTZ57R/T	27

4.3.2. Avaliação da atividade proteolítica (contaminantes – vetor pTZ57R/T)	28
4.5. Avaliação da hidrólise de pescado	32
5. CONCLUSÃO	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
APÊNDICES	43
Apêndice 1. Coleta e manutenção dos micro-organismos isolados utilizados no trabalho.	43

LISTA DE FIGURA

- Figura 1: Fluxograma metodológico adotado neste trabalho. 9
- Figura 2: Separação por corrida em eletroforese de Gel de Agarose 1% dos produto de PCR A: *B. stratosphericus* - LAMA 585 apresentou amplificação positiva confirmada através da presença de banda para temperatura de 54°C e rastros nas temperaturas de 56°C, 58°C, 60°C, 62°C e 64°C B: *M. excellens* - LAMA 842 com padrão de banda dupla para as temperaturas testadas de 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 60°C, 62°C e 64°C sendo a banda maior (1340pb) correspondente ao tamanho do gene interesse. 22
- Figura 3: Separação por corrida em eletroforese de gel de Agarose 1% dos produtos de PCR para *M. excellens* - LAMA 842 nas concentrações de 10ng/μL, 20ng/μL, 25ng/μL e 100ng/μL, de DNA genômico com padrão duplo de bandas, sendo a indicada de 1.340pb correspondente ao gene interesse. 23
- Figura 4: Colônias da etapa de transformação utilizando vetor pBADMyHisB por meio de choque térmico em *E. coli*. Placa contendo meio de cultura LB e ampicilina. 24
- Figura 5: A: Colônias da placa de transformantes que degradaram o substrato foram repicadas no mesmo meio de cultura, tempo e temperatura de incubação para confirmar atividade. B: Separação por corrida em eletroforese de Gel de Agarose 1% da extração de plasmídeo 1: *B. stratosphericus* - LAMA 585 2: *M. excellens* - LAMA 842 3: *E. citreus* - LAMA915. 24
- Figura 6: Efeito da presença (0,05%) e ausência (0%) do indutor arabinose na atividade da protease recombinante de *B. stratosphericus* - LAMA 585 fig|1236481.4.peg.2243 (#20), *B. stratosphericus* - LAMA 585 fig|1236481.4.peg.3514 (#12) e *M. excellens* - LAMA 842 fig|1306954.5.peg.1305 (#2). A leitura da absorbância das reações foi realizada em espectrofotômetro ($\lambda = 440 \text{ nm}$) (Infinite® 200 PRO NanoQuant – Tecan. 26
- Figura 7: A: Colônias formadas na placa como produto da transformormação do gene ligado ao vetor pTZ57R/T, presença de colônias azuis e brancas. B: Separação por corrida de eletroforese em gel de Agarose 1% do PCR de colônia onde 1: colônia azul – controle negativo; 2: contaminante1 e 3: contaminante2 C: Separação por corrida de eletroforese em gel de Agarose 1% do PCR de colônia onde 2: plasmídeo contendo gene do contaminante1 e 3: plasmídeo contendo gene do contaminante2. 28
- Figura 8: Quantificação de protease recombinante de contaminantes pelo método de Bradford utilizando colônias inoculadas em meio líquido contendo diferentes concentrações de IPTG. O tratamento foi realizado utilizando 10μL do

inóculo misturado com 200µL do reagente de Bradford. As frações foram lidas em espectrofotômetro em incubadas por Avaliação da atividade proteolítica a partir de colônias transformantes em comprimento de onda $\lambda = 595\text{nm}$ 29

Figura 9: Estimativa de dosagem de proteína no processo de hidrólise de pescado em diferentes concentrações de enzima das bactérias contaminantes..... 32

Figura 10: Diferentes tempos de incubação no processo de hidrólise enzimática utilizando proteases contaminantes 2 *M. excellens* (LAMA 842) e 1 *B. stratosphericus* (LAMA 585). 33

Figura 12: Avaliação do efeito da adição de diferentes concentrações de lipase ativa, no processo de hidrolise de proteína. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Volumes utilizados na reação de ligação para a de clonagem em vetor de expressão pBADMyHisB utilizando o produto do PCR das amostras <i>B. stratosphericus</i> - LAMA 585 fig 1236481.4.peg.2243 (#20), <i>B. stratosphericus</i> - LAMA 585 fig 1236481.4.peg.3514 (#12) e <i>M. excellens</i> - LAMA 842 fig 1306954.5.peg.1305 (#2).....	13
Tabela 2: Volumes utilizados na reação de ligação para o vetor de clonagem pTZ57R/T sendo o mesmo volume utilizado para todas amostras.....	13
Tabela 3: Volumes utilizados para o ensaio de concentração enzimática utilizando enzima com potencial proteolítico	16
Tabela 4: Resultado da seleção das sequências de genes de protease no genoma de <i>B. stratosphericus</i> - LAMA 585; <i>M. excellens</i> - LAMA 842; <i>E. citreus</i> - LAMA915 em relação ao nomes alternativos (Protease e Peptidase) através das ferramentas de bioinformática.....	17
Tabela 5: Resultado da seleção de sequencias de genes de endopeptidase de <i>B. stratosphericus</i> - LAMA 585; <i>M. excellens</i> - LAMA 842; <i>E. citreus</i> - LAMA915 quanto ao nome da enzima (BLAST – NCBI e Phyre), tamanho do gene e percentual de identidade com outras proteínas descritas (Blast2Go).....	18
Tabela 6: Resultado da seleção de sequencias de genes de endopeptidase de <i>B. stratosphericus</i> - LAMA 585; <i>M. excellens</i> - LAMA 842; <i>E. citreus</i> - LAMA915 quanto ao domínio conservado (BLASTp NCBI).....	19
Tabela 7: Oligonucleotídeos desenhados a partir dos genes de proteases do genoma de <i>B. stratosphericus</i> - LAMA 585; <i>M. excellens</i> - LAMA 842; <i>E. citreus</i> - LAMA915, temperatura de <i>melting</i> (Tm) e percentual de Citosina e Guanina (%CG). 21	
Tabela 8: Valores de leitura no espectrofotômetro em 440nm para ensaio de atividade com (0,05%) e sem (0%) indução de arabinose para <i>B. stratosphericus</i> - LAMA 585 fig 1236481.4.peg.2243 (#20), <i>B. stratosphericus</i> - LAMA 585 fig 1236481.4.peg.3514 (#12) e <i>M. excellens</i> - LAMA 842 fig 1306954.5.peg.1305 (#2)	25

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Coleta e manutenção dos micro-organismos isolados utilizados no trabalho.....**Erro! Indicador não definido.**

Apêndice 2. Domínio dos 23 genes de protease selecionados a partir dos nomes alternativos.**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIACOES

μg - micrograma

μL - microlitro

AM - gar marinho

B. stratosphericus - *Bacillus stratosphericus*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CM - Caldo Marinho

CMC - Caldo Marinho suplementado com CMC a 0,5%

FPH - *Fish Protein Hydrolysated*

IPTG - Isopropil- β -D - 1 thiogalactopyranoside

LAMA - Laboratório de Microbiologia Aplicada

LB - Luria Bertani

LGM - Laboratório Genética Molecular

MgCl_2 - Cloreto de magnésio

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

nm - Nanmetro

ORFs - *Open Reading Frames*

PCR - *Polymerase Chain Reaction* ou Reação de Polimerase em Cadeia

TCA - cido tricloroacético

X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

RESUMO

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza essencialmente proteica, que participam em várias reações bioquímicas e tem como papel fundamental o controle metabólico. Estas, têm sido usadas em processos industriais, e suas aplicações abrangem desde a produção de alimentos, detergentes, fármacos e couro até a bioconversão de subprodutos. A fim de incrementar a eficiência dos processos industriais, enzimas diferenciadas (mais ativas, específicas, tolerantes, etc.) são prospectadas a partir de ambientes extremos. Neste contexto, nossa hipótese de trabalho era de que bactérias do oceano profundo apresentassem proteases ativas em temperaturas amenas (20-35°C) e fossem mais específicas para atuarem sobre proteína de origem marinha. Para tanto, o objetivo do presente trabalho de prospectar genes codificantes de proteases a partir de bactérias marinhas de profundidade, assim como, avaliar o efeito de lipases e proteases no processo de hidrólise de resíduo de pescado marinho. Para isso foi realizada a seleção de três espécies marinhas, previamente isoladas (3.600 a 5.000m profundidade, Atlântico Sul) por nosso grupo, as quais tiveram seus genomas completos sequenciados e genes de 11.280 proteínas identificados. A partir dos dados genômicos destas três bactérias marinhas profundidade (*Bacillus stratosphericus*, *Marinobacter excellens* e *Erythrobacter citreus*), foram selecionados cinco genes finais, resultado da triagem a partir de nomes alternativos como protease e peptidase, que gerou um conjunto de 238 genes; nestes foram procuradas endopeptidases, o que reduziu para 23 genes que foram avaliados em diferentes critérios como domínio; tamanho; percentual com outros já descritos. Os genes utilizados para etapas de seguintes, foram originados de dois genes da bactéria *B. stratosphericus* (LAMA 585), dois da *M. excellens* (LAMA 842) e um da *E. citreus* (LAMA915), para os quais pares de *primers* específicos foram desenhados e realizada a reação de PCR. Destes cinco selecionados, o gene #20 de *B. stratosphericus* (LAMA 585) e #16 de *M. excellens* (LAMA 842) foram amplificados com sucesso e conduzidos ao processo de clonagem e avaliação da atividade enzimática. Foi verificado uma potencial atividade proteolítica de contaminantes oriundo das etapas de clonagem dos genes alvos. Na utilização de protease a clivagem das ligações peptídicas ocorreu nos primeiros minutos de reação. Não houve aumento ou redução considerável no processo de hidrólise ao longo do tempo, podendo o ensaio ser realizado em condições de tempos menores, sem que a sua eficiência seja afetada. O efeito da adição de lipase no processo de hidrólise de proteína dificulta o mesmo, não sendo vantajosa a utilização desta enzima combinado ao uso de proteases para este fim. Os resultados obtidos no trabalho indicam uma potencial importância biotecnológica das amostras utilizadas no estudo, demonstrando que, a partir de enzimas isoladas é possível gerar produtos de interesse e aplicação industrial. Porém, é necessário um melhor aprofundamento nas metodologias empregadas e conhecimento prévio das condições ótimas para um sucesso garantido e economicamente interessantes.

Palavras-chave: bioprospecção; biotecnologia marinha; enzima recombinante.

Abstract

Enzymes are biological catalysts nature essentially protein participating in several biochemical reactions and metabolic control instrumental role. These have been used in industrial processes and its applications range from the production of food, detergents, pharmaceuticals and leather to the bioconversão of by-products. In order to increase the efficiency of industrial processes, differentiated enzymes (more specific active, tolerant, etc.) are prospected from extreme environments. In this context, our working hypothesis was that deep ocean bacteria present active proteases in mild temperatures (20-35 (C) and were more specific to work on marine protein. To that end, the objective of the present work of prospecting in proteases coding genes from marine bacteria, as well as to evaluate the effect of lipase and proteases in the process of hydrolysis of marine fish residue. To that end, the objective of the present work of prospecting in proteases coding genes from marine bacteria, as well as to evaluate the effect of lipase and proteases in the process of hydrolysis of marine fish residue. For it was held for the selection of three marine species, previously isolated (3600 to 5,000 m depth, South Atlantic) by our group, which had their full genomes sequenced and 11280 genes identified proteins. From genomic data from these three marine bacteria (*Bacillus stratosphericus*, *Marinobacter excellens* and *Erythrobacter citreus*), selected five final genes result from screening from alternate names such as protease and peptidase, which generated a set of 238 genes; These have been searched endopeptidases, which reduced to 23 genes that were evaluated on different criteria such as; size; percentage with other already described. The genes used for the following steps were originated from two genes from the bacterium *b. stratosphericus* (585), two of *m. excellens* (842) and a of *e. citreus* (LAMA915), for which specific primer pairs were designed and carried out the PCR reaction. These five selected, gene # 20 of *b. stratosphericus* (585) and # 16 *m. excellens* (842) were amplified with success and led to the cloning process and evaluation of enzyme activity. It was verified a potential proteolytic activity of contaminants originating from the steps of gene cloning targets. Use of Proteinase cleavage of peptide bonds occur in the first few minutes of reaction. There was no significant increase or decrease in the hydrolysis process over time, and can the test be conducted in conditions of times smaller, without its efficiency is affected. The effect of addition of lipase protein hydrolysis process makes the same, it is not advantageous to use this enzyme combined with the use of proteases. The results obtained in the work indicate a potential biotechnological importance of samples used in the study, demonstrating that from isolated enzymes you can generate interest products and industrial applications. However, it is necessary

to better deepen in the methodologies employed and prior knowledge of the optimum conditions for a guaranteed success and economically interesting.

Keywords: bioprospecting; marine biotechnology; recombinant enzyme.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ambiente marinho profundo e organismos marinhos de profundidade

Os oceanos cobrem aproximadamente 70% da superfície terrestre, incluindo desde águas e sedimentos estuarinos, até os ambientes profundos. Micro-organismos de origem marinha desempenham importantes funções ecológicas, como fruto de sua diversidade metabólica e bioquímica, e podem apresentar características distintas dos organismos terrestres, as quais são fruto de sua adaptação ao ambiente marinho. Como exemplo, o oceano profundo caracteriza-se por apresentar condições extremas como pressão elevada, baixa temperatura, ausência de luz e, em grande parte, carência de nutrientes (RAGUKUMAR, 2005). Devido a essas características, bactérias habitantes destes ambientes, têm suas características físicas; químicas e biológicas adaptadas para estas condições (CARVALHO & FERNANDES, 2010), apresentando potencial biotecnológico de produtos provenientes destes organismos, especialmente enzimas (CANGANELLA & WIEGEL, 2011; HARDEMAN & SJOLING, 2007; KENNEDY *et al.*, 2008).

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. Entretanto, grande parte desta diversidade ainda é desconhecida, devido à dificuldade de acesso aos ambientes marinhos mais afastados e profundos, bem como as restrições quanto ao cultivo microbiano em laboratório. Em estudos, como o realizado em novembro de 2009 no Atlântico Sul, apresentou resultados preliminares de acerca de 9 mil espécimes coletadas, onde foram identificadas, 175 espécies de peixe; 44 espécies de lulas e polvos e 180 invertebrados bentônicos foram identificados, além de aproximadamente 300 bactérias isoladas de sedimento de fundo, 50 deles apresentando potencial para uso biotecnológico (PEREZ, 2010).

1.2 Enzimas

Os microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas devido à sua ampla diversidade bioquímica, susceptibilidade de manipulação genética, variedade catalítica, além de ser mais facilmente produzidas em larga escala via fermentação, com preço relativamente reduzido, possuindo bastante homogeneidade e qualidade. Isto faz com que as enzimas microbianas sejam preferidas que as de animais ou de plantas, por apresentar quase todas as características desejáveis para sua aplicação

biotecnológica, além disso, são mais estáveis que seus homólogos obtidos de plantas e animais e seu processo de produção é mais fácil e seguro (WARD, 1983; Rao *et al.*, 1998; KUMAR & TAKAGI, 1999; WISEMAN, 1985; HAKI & RAKSHIT, 2003).

Assim, os microrganismos surgem como uma alternativa simples e barata para a produção dessas enzimas. Na maioria das vezes, os microrganismos são fáceis de manipular, requerem condições mínimas de nutrição e de manutenção e apresentam alta eficiência na produção de enzimas, que ainda assim pode vir a ser aumentada por meio do uso de técnicas de melhoramento genética (SAJEDI *et al.*, 2005).

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza essencialmente proteica, que participam em várias reações bioquímicas e tem como papel fundamental o controle metabólico. Estas moléculas aceleram reações termodinamicamente viáveis, sendo extremamente versáteis, estereoespecíficas, e de elevada importância nos processos biotecnológicos (AEHLE, 2004). Normalmente os processos enzimáticos têm ação rápida, não apresentam toxicidade nem geram problemas ambientais, ocorrem em condições brandas de temperatura e pH, atuando sobre um substrato específico (AEHLE, 2004; POLAINA & MACCABE, 2007). As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanasas e fitases, (MUSSATTO *et al.*, 2007) e as maiores empresas produtoras líderes do mercado são: a empresa multinacional de biotecnologia Novozymes (Dinamarca), Gist-Brocades (Holanda) e Genencor International Inc (EUA). A primeira é a maior fornecedora e, em 2009, deteve sozinha 47% do mercado de enzimas industriais (FOCUS ON CATALYSTS, 2011).

Dentre as principais, as proteases são classificadas como um subgrupo das hidrolases e sua nomenclatura é feita segundo o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e de acordo com sua estrutura. Dessa maneira, subdividem-se em exopeptidases e endopeptidases, dependendo de seu sítio de ação, ou seja, clivando peptídeos terminais ou aqueles distantes dos terminais dos substratos, respectivamente. Sobre a terminologia, o termo protease é sinônimo de peptídeo hidrolase e inclui todas as enzimas que clivam peptídeos. O termo proteinase é sinônimo para o grupo das endopeptidases, e entre as endopeptidases encontram-se as principais proteases industriais, como a tripsina (TREMACOLDI, 2009). Outro critério utilizado para classificação baseia-se em seus mecanismos catalíticos, agrupando as proteases em seis classes principais: serino proteases, cisteíno proteases, aspartil proteases, metalo proteases, treonino proteases e glutamato proteases (RAWLINGS *et al.*, 2006).

De forma geral, as proteases e amilases podem ser extraídas de diferentes fontes, microrganismos, animais e vegetais. Dentre as mais citadas para a produção

destas enzimas se encontram as bactérias do gênero *Bacillus* (Gupta *et al.*, 2002). Microrganismos de uma mesma linhagem possuem o potencial de produzir enzimas com características completamente ou parcialmente diferenciadas, e por este motivo a busca por novas fontes microbianas continua sendo foco de vários pesquisadores. Dentre as espécies, o gênero *Bacillus* possui atrativo industrial por diversas características vantajosas, tais como: alta taxa de crescimento, levando a um curto tempo para a fermentação, e a capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular (SOUZA, 2013).

1.3 Aplicação industrial de enzimas proteolíticas e cenário brasileiro industrial

As enzimas têm sido usadas em processos industriais, podendo ser utilizadas como catalisadores solúveis – e.g. proteases e algumas lipases de origem animal em fábricas de curtumes ou em produtos lácteos - ou através da utilização de células de microrganismos, principalmente em processos de fermentação, como da cerveja e panificação. Apesar do papel das células microbianas no processo de fermentação ter sido bem estabelecida por Pasteur em 1876, os mecanismos enzimáticos começaram apenas a serem compreendidos entre o final do século XIX e o início do século XX, quando algumas enzimas foram isoladas e produzidos em escala industrial. Hoje em dia, as enzimas são consideradas o núcleo central da biotecnologia, porque elas são as principais ferramentas para a aplicação das técnicas biotecnológicas básicas (como a função do DNA recombinante e celular) e indispensável em todos os processos biotecnológicos (fermentação e cultura celular). Além disso, eles têm um papel fundamental na manutenção da vida de qualquer tipo de organismo, porque a ocorrência de todas as vias metabólicas celulares depende da participação de, pelo menos, uma enzima (VITOLLO, 2009).

As enzimas proteolíticas possuem uma vasta aplicação industrial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por 60% do volume de vendas (GUPTA *et al.*, 2002; VISHWANATHA *et al.*, 2010). Na indústria alimentícia, são usadas no processamento de diversos produtos, incluindo vinhos, cereais, leite e derivados, carne e produtos de peixe, e obtenção de flavorizantes (FURLAN & OETTERER, 2002). Já na indústria farmacêutica, enzimas proteolíticas são empregadas em medicamentos para distúrbios de digestibilidade, tendo também ação anti-inflamatória, antimucolítica e cicatrizante (SAID & PIETRO, 2004). Outra aplicação é a produção de hidrolisado proteico que apresentam propriedades muito interessantes, como maior resistência às enfermidades nos animais domésticos (VINOT *et al.*, 1989), além de representar uma excelente alternativa para o incremento da oferta de proteína animal (KLOMKLAO *et al.*, 2005; CENTENARO, 2009).

Como vantagens da utilização enzimática, destaca-se o fato de ser um produto natural, que apresenta um alto grau de especificidade nas reações, contribuindo para a eficiência do processo. Além disso, por apresentar uma atividade potencialmente regulada, pode atuar em distintas condições, como baixas concentrações e sob condições brandas de pH e temperatura (BON *et al.*, 2008). Conseqüentemente, a demanda por novas hidrolases com características diferenciadas é crescente (MADIGAN *et al.*, 2008; CANGANELLA & WIEGEL, 2011; KASANA & GULATI, 2011; ACHARYA & CHAUDHARY, 2012).

Em decorrência das necessidades e tendências da substituição das múltiplas etapas de processos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes e da substituição de processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis, prevê-se aumento significativo do consumo de enzimas a nível internacional (POLITZER & BON, 2006). A tecnologia enzimática concilia desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental, cenário importante para a inserção do Brasil no mercado internacional (POLITZER & BON, 2006), pois o mercado brasileiro de enzimas, embora ainda pouco representativo (cerca de 2% do total mundial), revela grande potencial. A redução do custo de produção de enzimas é favorecida, no país, pela possibilidade de bioconversão de subprodutos agrícolas como farelo de trigo, farelo de algodão, casca de soja e outros para o aumento do uso destas enzimas em processos industriais (MUSSATTO *et al.*, 2007, FERNANDES & MILAGRES, 2007).

A fábrica brasileira Bioenzima, tem capacidade para produzir 20 toneladas de enzimas por mês, menos de 2% do que o país demanda, e atende às indústrias de ração animal, panificação e às lavanderias de envelhecimento de jeans, essa última responde, em média, por 20% do consumo nacional de enzimas (RAMOS, 2009). Resultado da fusão da empresa brasileira Novo Industri com a dinamarquesa Nordisk Gentoft em 1989, a Novozymes Latin America Ltda possui uma unidade no país, e detém sozinha, cerca de metade do mercado mundial de enzimas industriais, com mais de 700 produtos. Esta última, fornece enzimas para diversas indústrias, como têxtil, alimentícia e cervejeira, além de enzimas para o mercado de combustíveis. A empresa visa um desenvolvimento contínuo de um caminho tecnológico para produzir etanol de segunda geração a partir de celulose no Brasil (KIRIHATA, 2010).

1.4 Prospecção de dados genômicos e metagenômicos

A genômica corresponde à área da ciência que pesquisa e desenvolve tecnologia para a investigação da estrutura e organização dos genes de um determinado organismo, fornecendo um catálogo completo dos genes e das proteínas presentes no mesmo. Atualmente, a análise genômica de microrganismos encontra-se em fase exponencial, uma vez que muitos genomas de bactérias foram sequenciados e depositados nos bancos de dados juntamente com suas informações associadas. Essas informações possibilitam a abertura de novas linhas de pesquisa, que são mais eficientes na compreensão da biologia dos microrganismos e suas relações com o meio ambiente. Metodologias e estratégias por meio da simulação computacional de diferentes *redes* de genes, complexos proteicos e vias metabólicas podem ser aplicáveis no estudo e caracterização de genes diversos, conhecidos ou não, incluindo a prospecção de alvos em genomas de organismos ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo em laboratório. Assim, a genômica estuda a molécula de DNA e a informação nela armazenada sob forma de genes.

Entre os métodos utilizados em estudo de genética de microrganismos não cultivados, a metagenômica tem emergido como uma estratégia eficaz, correspondendo à análise genômica de comunidades microbianas complexas encontradas em *habitats* naturais (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Para tanto, o DNA total é extraído de amostras ambientais e clonado em vetores, como plasmídeo, o que vem permitindo o estudo de genomas de organismos presentes em um determinado ambiente sem a necessidade de cultivo (HANDELSMAN, 2004).

O termo metagenoma é derivado do conceito estatístico de meta-análise (o processo de combinar estatisticamente análises separadas) e genômica (a análise ampla do material genético de um organismo) (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003). A busca por novos conhecimentos sobre a composição das comunidades de microrganismos que habitam diferentes biomas levou ao surgimento da metagenômica como importante método de prospecção biotecnológica, pois representa a possibilidade de avaliação dos genomas da microbiota total encontrada na natureza, valendo-se da acessibilidade também aos microrganismos incultiváveis (HANDELSMAN *et al.*, 1998; KNIGHT *et al.*, 2003). Amostras de DNA microbiano isoladas de uma determinada amostra ambiental podem vir a apresentar todo DNA da comunidade de microrganismos nativos desta área (DANIEL, 2005). Deste modo, a metagenômica possui ferramentas que permitem acesso ao DNA ambiental o armazenamento das sequências e sua posterior análise (LEVEAU, 2007). Aliado à essa tecnologia estão também presentes as ferramentas da bioinformática, que

surgiram como solução para o tratamento de grande quantidade de informação genética obtida por este tipo de avaliação da diversidade biológica.

Esta abordagem tem potencial para a descoberta de novos genes, proteínas e vias metabólicas que podem ser exploradas para processos industriais. Pode funcionar ainda, como um grande catálogo representativo de microrganismos, permitindo compreender e prever o impacto da indústria e de outras atividades na diversidade procariótica, se bactérias potencialmente úteis (TOUSSAINT *et al.*, 2003).

Alguns objetivos da metagenoma incluem identificar genes funcionais, estimar a diversidade microbiana, compreender a dinâmica da população de uma comunidade, montar o genoma de um organismo não cultivado e, identificar biomarcadores úteis para classificar um tipo de processo ocorrido em ambientes específicos (RAJENDHRAN & GUNASEKARAN, 2008).

1.5 Aplicação de enzimas no hidrolisado proteico de pescado

O processo de hidrólise de pescado, também conhecido por *Fish Protein Hydrolysed* (FPH) é catalisado por proteases que clivam as proteínas do peixe. Ao atuarem sobre o substrato proteico, as enzimas modificam as propriedades químicas, funcionais e sensoriais da proteína sem prejudicar o seu valor nutricional. A hidrólise enzimática é um método baseado na adição de enzimas para a clivagem destas proteínas, sendo um processo usado para aperfeiçoar ou modificar suas propriedades sem prejudicar o seu valor nutricional, ocorrendo sob condições brandas (SOARES, 2000). Assim, oferece vantagens por permitir um bom controle do processo e das propriedades dos produtos resultantes (FONKWE & SINGH, 1996, HOLANDA, 2004). O processo de hidrólise resulta na diminuição do peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos. Algumas apresentam especificidade para ligações peptídicas nas quais participam determinados aminoácidos, enquanto outras agem mais amplamente (RAO *et al.*, 1998). Como produto deste processo são gerados peptídeos, os quais podem ser bioativos. Tratam-se de fragmentos de proteína que são inativos na estrutura molecular específica das proteínas, porém depois de ser liberados pela hidrólise enzimática, podem exercer diferentes funções fisiológicas (SARMADI & ISMAIL, 2010).

Várias proteases comerciais são utilizadas para hidrolisar proteínas de pescado. Porém, a alcalase, uma endopeptidase alcalina produzida pela fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformis*, tem sido intensivamente utilizada pela indústria por ser considerada uma das melhores enzimas para o preparo de hidrolisados. As enzimas mais utilizadas neste processo são oriundas das bactérias terrestres *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *Streptomyces griseus*, sendo a temperatura

preferencial de atividade entre 55-70; 45-55 e 37°C, respectivamente (DINIZ & MARTIN, 1999). O seu produto gerado apresenta gosto suave, mesmo quando tem elevado grau de hidrólise (BENJAKUL & MORRISSEY, 1997; KRISTINSSON & RASCO, 2000; CENTENARO *et al.*, 2009).

O hidrolisado de peixe surge como alternativa à uma grande quantidade gerada do que é considerado resíduo sem valor comercial (resquícios de carne, cabeça, pele, ossos, escamas e vísceras). Isso se acontece em razão da instalação de unidades de processamento de filé, esta impulsionada pelo crescimento das exportações de pescado de alto valor comercial (SILVA, 2010). Esta carcaça residual é um material rico em proteína, enquanto as vísceras são fontes de enzimas digestivas, entre elas as proteases, que podem ser utilizadas na indústria de detergentes, farmacêutica, têxtil e de alimentos (MARTONE *et al.*, 2005). A farinha de peixe, uma alternativa à hidrólise, é amplamente empregada na aquicultura, sendo a principal fonte proteica nas rações para a maioria das espécies cultivadas. Esta apresenta bom perfil de aminoácidos, ácidos graxos essenciais, energia digestível, minerais e vitaminas, além de conferir melhor palatabilidade às rações (FARIA *et al.*, 2001).

A fim de incrementar ainda mais o valor agregado de subprodutos de pescado, a produção de hidrolisados é uma alternativa à oferta de proteína animal (KLOMKLAO *et al.*, 2005; CENTENARO *et al.*, 2009). O hidrolisado proteico de peixe é resultado da solubilização das proteínas do pescado. Estas proteínas podem ser obtidas a partir da hidrólise química (hidrólise ácida e alcalina) e por hidrólise enzimática através de enzimas de origem vegetal, animal ou microbianas. Estas macromoléculas, podem ser adicionadas à matéria-prima a ser catalisada ou ainda por enzimas proteolíticas endógenas (KRISTINSSON & RASCO, 2000; MARTONE *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Prospectar genes codificantes de proteases a partir de bactérias marinhas de profundidade, assim como, avaliar o efeito de lipases e proteases no processo de hidrólise de resíduo de pescado marinho.

2.2. Objetivos Específicos

A fim de atingir o objetivo geral proposto, o trabalho foi subdividido nos seguintes objetivos específicos:

1. Identificar e selecionar genes codificantes de protease no genoma de três bactérias marinhas de profundidade;
2. Clonagem dos genes codificantes das proteases alvo em vetor de expressão e de clonagem.
3. Avaliar o efeito da presença de lipases e proteases no processo de hidrólise de resíduo de pescado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada neste trabalho seguiu a sequência ilustrada no fluxograma (Figura 1) e realizada seguindo a descrição dos subitens seguintes.

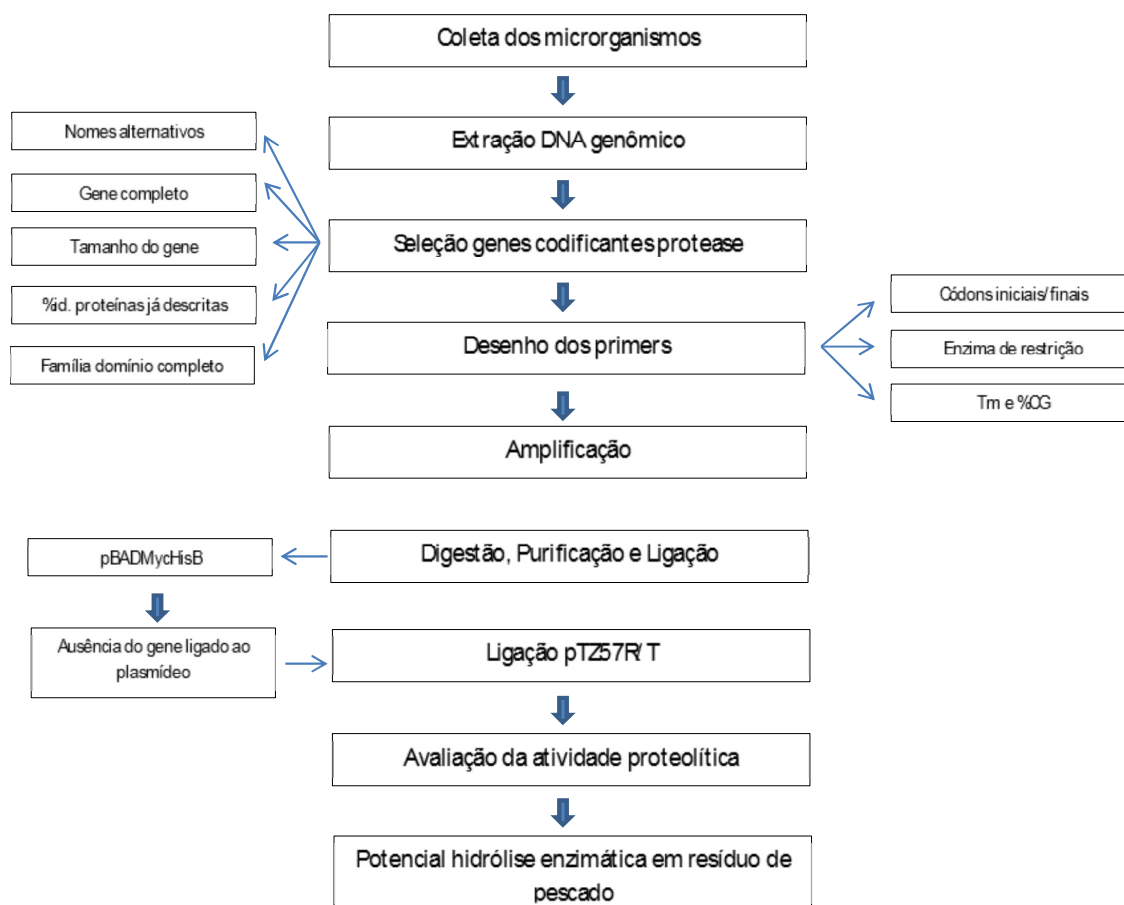


Figura 1: Fluxograma metodológico adotado neste trabalho.

3.1. Origem das bactérias marinhas de profundidade e extração do DNA genômico

As bactérias empregadas no presente trabalho foram obtidas a partir da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMA) da UNIVALI. No que se refere aos organismos *Bacillus stratosphericus* (LAMA 585) e *Marinobacter excellens* (LAMA 842), estes foram previamente isolados a partir de amostras de sedimento da Cordilheira Meso-Oceânica. Na ocasião as amostras foram obtidas entre 5.000-5.500m profundidade, durante expedição oceanográfica a bordo do Navio Akademik Loffe (*Academy of Sciences* – Rússia) em Novembro/2009. Já a linhagem *Erythrobacter citreus* (LAMA 915), foi isolada a partir de amostra da coluna d'água (4.360m profundidade) coletada na Elevação do Rio Grande, durante expedição a bordo do NOc Antares (H-40) da Marinha Brasileira (2011).

Para a extração do DNA genômico (*Erythrobacter citreus* LAMA915), as bactérias foram cultivadas em caldo marinho durante 2 a 7 dias a 15 °C. Após o período de cultivo, as células foram precipitadas e a extração realizada utilizando-se o produto comercial *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante, onde dois tubos de 1,5mL com colônia foram centrifugados por 10min a 5000g (7500rpm), o sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 180µL de tampão ATL, após a ressusensão foi adicionado 20µL da proteinase K e incubado em 56°C por 3 horas. Os outros DNAs utilizados neste trabalho foram extraídos anteriormente pelo grupo dos laboratórios LAMA e LGM, a quantidade e qualidade do DNA foi investigada por meio de eletroforese em gel de agarose (1%), para isso utilizou-se 5µL de marcador com tamanho conhecido (1Kb Plus Invitrogen®), 1µL de corante *gel red* (devido as suas propriedades ópticas, quando expostas à fluorescência sob luz UV), 3µL tampão (10x *loading buffer*) e 5µL da amostra de PCR.

3.2. Avaliação das proteínas e seleção das proteases alvo

A primeira etapa do presente trabalho consistiu na busca de genes codificantes de proteases nos genomas das bactérias alvos. Para tanto, acessou-se as informações relativas aos conjuntos de proteínas descritas nos genomas. No caso dos genomas *B. stratosphericus* (GenBank: APAS000000000.1) e *E. citreus* (GenBank: _JYNE000000000.1) estas informações estavam disponíveis no portal do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Já em relação a linhagem *M. excellens*, a anotação genômica usada estava disponível no Laboratório de Genética Molecular, pois os dados estão em fase final de depósito no NCBI (SUB1208364). Os dados genômicos foram obtidos por meio do sequenciamento empregando a plataforma *Illumina HiSeq2000* (101 nucleotídeos lidos pelo método *paired-end*). Posteriormente, os dados foram processados utilizando o software de bioinformática *CLC Genomics Workbench (CLC GW, v 5.5.2)*. Para a prévia anotação do genes, os pesquisadores haviam empregado ferramentas de anotação (RAST) e comparação (Blast).

Os nomes alternativos da enzima alvo foram recuperados a partir do banco Enzyme (Expasy - <http://enzyme.expasy.org/>), pois muitas enzimas de uso rotineiro são designadas pelo nome alternativo ou trivial, incorporando sufixos *-ase* ao nome do substrato sobre os quais ela atuam (MOTTA, 2011). Utilizou-se para título de pesquisa primeiramente protease e peptidase, posteriormente sendo realizada a triagem nominal também por endopeptidase. Como critérios para a seleção das proteases submetidas a etapa de clonagem e expressão, foi considerado: a) gene completo; b)

tamanho reduzido; c) percentual de identidade das proteínas com outras já descritas; d) presença de famílias de domínios completos (não truncadas).

A pesquisa por domínios conservados dentro das proteína foi realizada utilizando a subdivisão *Conserved Domain* do NCBI, através da qual foi possível analisar a estrutura do gene. Diferentes algoritmos empregam processos estatísticos diversos para se fazer a busca por ORFs ou fases de leitura aberta do código genético, identificadas por um códon iniciador (ATG) e um terminador (TAA, TAG e TGA), que correspondem a sequências de aminoácidos com possíveis regiões codificadoras. A ferramenta utilizada para comparação de sequências de DNA com os bancos de dados genômicos foi o BLAST. Através deste algoritmo foi possível comparar as sequências de proteína com todas sequências genômicas de domínio público, através da identificação no banco de dados com a presença de uma sequência parecida com a pesquisada, esta etapa foi realizada para atualizar e certificar que os genes anotados previamente, comparados aos demais do banco, foram atualizados, em razão de que há uma crescente descobertas de novas sequencias podendo algumas se assemelharem a deste trabalho. O Phyre foi utilizado para uma previsão da estrutura tridimensional das sequência de aminoácidos da proteína, a fim de avaliar e selecionar as proteínas, esta ferramenta utiliza um algoritmo de alinhamento perfil-perfil, através do alinhamento dos modelos ocultos de Markov via HHsearch para melhorar significativamente a precisão da taxa de alinhamento e detecção.

3.3. Clonagem dos genes alvo

3.3.1 Desenho de primers para os genes alvo

Uma vez selecionados os genes das proteases alvo, foi conduzida a etapa de clonagem, conforme descrito por nosso grupo Lima *et al.* (2005). Para tanto, pares de *primers* específicos para cada gene alvo foram desenhados a partir da identificação das sequencias (*CLC Genomics Workbench*), determinação dos códons iniciais e finais (*ORF Finder*), determinação das enzimas de restrição (*NEB cutter*) e %CG (*Oligo Analyzer*). O par de primer, além de viabilizar a amplificação do gene interesse, também permite a incorporação de sítios de restrição distintos em suas extremidades, os quais facilitam a clonagem direcional do gene no vetor de expressão (pBADMyHisB, Invitrogen) e no vetor de clonagem (pTZ57R/T).

3.3.2. Amplificação dos genes alvo

Uma vez desenhados os *primers*, a próxima etapa consistiu na amplificação dos segmentos de DNA contendo os genes alvo por meio da PCR. Neste contexto, a reação de PCR contendo 25 μL foi composta de 13 μL de água ultrapura, 2,5 μL de tampão específico para a enzima (10x PCR MgCl_2), 2,5 μL de dNTP's, 2,5 μL *primers* específicos para cada gene, 0,8 μL de cloreto (50mM MgCl_2), 0,2 μL de *Platinum Taq DNA polimerase* e 1 μL de DNA genômico específico (50ng DNA). Nesta etapa, os DNAs genômicos foram testadas em diferentes concentrações de 10ng/ μL ; 20ng/ μL ; 25ng/ μL ; 33ng/ μL ; 50ng/ μL e 100ng/ μL . As temperaturas para cada alvo também foram avaliadas sendo para *B. stratosphericus* testadas as temperaturas de: 52; 54; 56; 58; 60; 62; 64°C e *M. excellens*: 54; 55; 56; 57; 58; 60; 62; 64°C. Os tempos de anelamento de 30 e 45 segundos foram comparados, a fim de determinar a melhor condição de amplificação para cada gene.

A fim de avaliar a ocorrência ou não, as amostras de PCR foram avaliadas em corrida de eletroforese de gel de Agarose, composto de 1g de agarose diluída em 100mL de tampão TAE, levada ao micro-ondas até que se torna-se uma solução totalmente homogênea, colocada em uma cuba com pentes para aplicação das amostras, após a polimerização. Para avaliar a qualidade e quantidade de DNA amplificado, o mesmo foi comparado a um DNA conhecido através do marcador de peso molecular, como descrito no item 3.1 anteriormente. Após a corrida de eletroforese o gel foi avaliado em luz ultravioleta para a verificação da presença de bandas com tamanho correto (indicando amplificação positiva) ou ausência (indicando a não amplificação), através de câmera fotográfica, foi possível registrar as imagens geradas pela presença de luz ultravioleta no transiluminador e estas eram analisadas diretamente no computador.

3.3.3 Digestão e ligação

Para a construção do vetor de expressão contendo o gene da protease, o produto da amplificação contendo o gene alvo, bem como o plasmídeo foram digeridos com duas enzimas de restrição diferentes. Para tanto, empregou-se o protocolo do produto, no qual a reação de ligação com volume proporcional de 20 μL foi constituído de 12 μL de água ultrapura, 5 μL do plasmídeo, 2 μL do tampão e 0,5 μL de cada enzima de restrição (*XhoI/SaI*). Após a digestão, as amostras de DNA foram limpas (*GFX-PCR DNA and gel band Purification Kit, Amersham Biosciences*) e quantificadas no espectrofotômetro. Na etapa de ligação adotou-se dois protocolos diferentes, devido aos resultados obtidos no primeiro ensaio, fez-se necessário a adaptação desta etapa,

optando-se por um novo protocolo de ligação. Para o protocolo 1, utilizou-se a técnica de clonagem em vetor de expressão pBADMyHisB (Invitrogen) (Tabela 1) e o protocolo 2 utilizado, foi realizado com o vetor de clonagem pTZ57R/T usando kit comercial (Tabela 2), sem as etapas anteriores de digestão.

Tabela 1: Volumes utilizados na reação de ligação para a de clonagem em vetor de expressão pBADMyHisB utilizando o produto do PCR das amostras *B. stratosphericus* - LAMA 585 fig|1236481.4.peg.2243 (#20), *B. stratosphericus* - LAMA 585 fig|1236481.4.peg.3514 (#12) e *M. excellens* - LAMA 842 fig|1306954.5.peg.1305 (#2)

	#2*	#12*	#20*
Plasmídeo	5,0µL	5,0µL	5,0µL
Inserto	1,0µL	1,5µL	2,5µL
Tampão	2,0µL	2,0µL	2,0µL
Ligase	1,0µL	1,0µL	1,0µL
H₂O	11,0µL	10,5µL	9,5µL

*códigos atribuídos às proteínas selecionadas utilizadas ao longo do trabalho.

Tabela 2: Volumes utilizados na reação de ligação para o vetor de clonagem pTZ57R/T sendo o mesmo volume utilizado para todas amostras.

	Volumes
Vetor pTZ57R/T	1,5uL
5x ligation buffer	3,0uL
Produto do PCR *	9,5uL
T4 DNA ligase	1,0uL

3.3.4. Transformação

A técnica conhecida como transformação permite a introdução de um plasmídeo na célula bacteriana. Este DNA exógeno passa a fazer parte do material genético bacteriano que será herdado pelas novas células à medida que a bactéria se multiplica. Nesta fase utilizou-se dois métodos com linhagens distintas de *Escherichia coli*.

Protocolo 1 (vetor de expressão): Foi realizada a transformação das células em sete linhagens diferentes de *E. coli* pelo método de choque-térmico (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) e semeadas em meio de cultura contendo LB ou LB suplementado com leite e ampicilina (100mg/mL – em todas as linhagens) e clorofenicol (100mg/mL – exceto para a linhagem Top10). Para as placas contendo meio de cultura LB+leite, foi utilizado 100mL de meio LB com 100mL de leite integral. Estes foram autoclavados separadamente e unidos antes de verter para as placas, já adicionados os antibióticos descritos. As bactérias recombinantes capazes de secretar proteases ativas degradam o substrato (leite), o que seria evidenciado pela formação de um halo de degradação ao redor da colônia. Estas placas contendo as colônias foram incubadas por 12 horas a 37°C.

Protocolo 2 (vetor de clonagem): Após 20 horas da etapa de ligação, realizou-se a transformação em célula TOP10 de *E. coli*, utilizando o método de choque-térmico e semeados (100uL e 50uL) em placas de LB ou LB suplementado com leite, ampicilina (20µL) e Xgal (20µL) e incubadas 48 horas em duas temperaturas (37°C e 20°C), sendo 24 horas em cada uma destas.

3.3.5. Avaliação dos transformantes quanto a presença do gene alvo

Protocolo 1 (vetor de expressão): Decorrido o tempo de incubação, células de cinco colônias que degradaram o substrato foram repicadas no mesmo meio de cultura para confirmar atividade. Os clones ativos foram submetidos a uma reação de PCR de colônia com *primers* específicos para os genes-alvo. O PCR de colônia é realizado da mesma forma que a metodologia descrita para a amplificação. No entanto, não se utiliza o DNA genômico, mas uma colônia é retirada da placa de transformantes e colocada no micro tubo com os demais reagentes já mencionados, o que permite distinguir qual das colônias contem o plasmídeo recombinante com o gene de interesse. A comprovação da amplificação é observada através da presença de bandas no gel de Agarose (1%), correspondentes ao tamanho do gene. Por fim, para a confirmação da identidade do gene, uma entre as colônias positivas teve seu

plasmídeo extraído, armazenado (-20°C) e uma alíquota sequenciada (método de Sanger, Macrogen – Coréia do Sul).

Protocolo 2 (vetor de clonagem): A observação da presença do gene alvo é realizada de acordo com a coloração das colônias obtidas na placa de transformação. Colônias azuis são aquelas capazes de degradar o substrato x-gal adicionado ao meio. Assim, representam os organismos que não receberam o inserto de interesse. Por outro lado, as colônias brancas tiveram o gene da β -galactosidase presente no vetor interrompido pela inserção do gene de interesse. Portanto, possuem um fragmento recombinante clonado.

3.4. Avaliação da atividade enzimática

Para o teste de atividade proteolítica, utilizou-se diferentes concentrações de IPTG. Utilizou-se colônias resultantes das placas de transformantes e células de Top10 (utilizadas para comparação como branco). Para tanto, células das colônias potencialmente ativas foram inoculadas em 400 μ L de meio LB adicionando de ampicilina e Xgal (20 μ L), além do indutor IPTG (100, 500 e 100 μ M). Após o período de incubação (24h, agitação, 37°C), uma alíquota de 200 μ L da amostra foi transferida para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de substrato azo-caseína (Sigma® 2mM) e incubado por 2h a 40°C. Posteriormente, uma alíquota de 200 μ L foi retirada da reação e o restante permaneceu nas mesmas condições de incubação 18h. Decorrido este período, 400 μ L de TCA 10% foi adicionado, ao produto da incubação da amostra com o substrato, e mantido em banho de gelo por 20 minutos. Em seguida, as proteínas foram precipitadas por centrifugação (10min, a 5.000g), 100 μ L do sobrenadante transferido para uma placa de leitura, adicionado de NaOH e realizado a leitura em 440nm no espectrofotômetro NanoQuant (Tecan®). Utilizou-se como controle negativo *E. coli* com plasmídeo não contendo o gene de interesse, para a comparação das amostras com os valores obtidos da Top10. Foi possível verificar se os valores obtidos de atividade são da enzima alvo ou da própria *E. coli*.

3.5. Avaliação da hidrólise de pescado

Com o intuito de avaliar a capacidade de hidrólise de pescado neste trabalho, foram realizados ensaios com bactérias proteolíticas e lipolíticas. Para o ensaio utilizando a protease resultante deste trabalho, foram avaliados dois parâmetros em paralelo: avaliação do efeito da concentração de enzima e efeito do tempo de incubação. Para a concentração enzimática, determinou-se que o volume final deveria ser de 6mL para todas as amostras, a fim de manter um padrão para comparação dos

resultados. Os volumes e as concentrações finais utilizados para este ensaio estão descritos na Tabela 3. O processo de hidrólise foi conduzido por 90 minutos em 50°C, em seguida a enzima foi inativada a 85°C durante 10 minutos. Para este ensaio foi utilizado víscera de peixe homogenizado com água destilada na proporção de 1:1.

Tabela 3: Volumes utilizados para o ensaio de concentração enzimática utilizando enzima com potencial proteolítico

Concentração	0,08	0,17	0,33	0,67	1,0
	(8%)	(17%)	(33%)	(67%)	(100%)
Enzima	0,5mL	1,0mL	2,0mL	4,0mL	6,0mL
Água	5,5mL	5,0mL	4,0mL	2,0mL	0,0mL

Para verificar o efeito do tempo de incubação, as reações foram compostas de 2mL de enzima e 8mL de peixe, utilizando tubos cônicos de 15mL, os quais foram retirados nos tempos pré-determinados de 15, 30, 45, 90 e 240 minutos após o início da reação.

Para todos os ensaios e parâmetros, as amostras foram centrifugadas (*Eppendorf Centrifuge 5810R* por 15min, a 5.000g) e o sobrenadante retirado para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para tanto, uma alíquota de 10µL do sobrenadante foi adicionada de 200µL do reagente de Bradford e a leitura realizada em espectrofotômetro leitor de microplacas ($\lambda=595\text{nm}$) em quadruplicatas.

Para a hidrólise utilizando lipase, esta não foi utilizada a fim de hidrolisar a proteína do peixe, mas para avaliar se o efeito da presença de uma enzima lipídica no processo de hidrólise de proteínas do resíduo de peixe poderia favorecer o acesso das proteases nas proteínas presentes no peixe e, assim, elevar a eficiência do processo. Para isso, diferentes concentrações da enzima foram utilizadas, a lipase (*Candida rugosa* Sigma®) foi diluída com água ultrapura viabilizando a obtenção de uma série de concentrações (0,4; 0,8; 2,0; 5,0 e 10mg/mL). Posteriormente, 200µL de cada concentração foi incubada com 200µL de víscera *in natura*, durante 60 minutos a 37°C. A enzima lipolítica e comercial (Protamex® Novozymes A/S) foram incubadas separadamente, além de cada concentração utilizada, com as amostras de peixe nas mesmas proporções anteriormente descritas, a fim de utilizarem como controle. O processo de hidrólise foi conduzido por 30 minutos na temperatura 55°C e realizado uma estimativa do grau de hidrólise pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação das proteínas e seleção das proteases alvo

Com o intuito da busca por genes codificantes de proteases, utilizou-se um conjunto de proteínas reconhecidas previamente no genoma de três bactérias marinhas do ambiente marinho profundo (*B. stratosphericus* (LAMA 585), *M. excellens* (LAMA 842) e *E. citreus* (LAMA 915)). Inicialmente a busca consistiu na utilização de ferramentas de bioinformática em bibliotecas genômicas e na identificação das sequências *ORFs* pelo software *CLC Genomics Workbench*, onde também foi realizada a tradução das sequências em proteína. Os bancos de dados contém cópias representativas de fragmentos de DNA, aumentando a probabilidade de isolar a maior parte dos genes codificantes da enzima alvo. As estruturas podem ser determinadas pelos modelos computacionais e experimentalmente, contribuindo para avanços como compreensão da função molecular e o mecanismos das proteínas. (BRENNER, 2001; TAYLOR, 2002; LIU *et al.*, 2002).

Dentre um conjunto total de 11.280 proteínas, reconhecidas e selecionadas de 3 genomas, (4.023 *B. stratosphericus* - LAMA 585, 3.096 *M. excellens* - LAMA 842) e 4.161 *E. citreus* - LAMA915) foram inicialmente reconhecidas 238 sequências triadas por meio de palavras chaves (proteases e peptidases) potencialmente codificantes de protease (Tabela 4). Este conjunto foi então avaliado individualmente a fim de selecionar de acordo com os critérios anteriormente apresentados aquelas mais propícias para serem aplicadas neste trabalho utilizando as ferramentas de bioinformática *Blast* (NCBI); *Blast2Go*; *Phyre*.

Tabela 4: Resultado da seleção das sequências de genes de protease no genoma de *B. stratosphericus* - LAMA 585; *M. excellens* - LAMA 842; *E. citreus* - LAMA915 em relação ao nomes alternativos (Protease e Peptidase) através das ferramentas de bioinformática.

	PROTEASE	PEPTIDASE
<i>B. stratosphericus</i> (LAMA 585)	35	59
<i>M. excellens</i> (LAMA 842)	37	32
<i>E. citreus</i> (LAMA915)	28	47

A prospecção de genes com nomenclatura endopeptidase ocorreu de maneira similar à triagem anterior, resultando em um conjunto de 238 genes de protease. Após o processamento, foi selecionado um total de doze sequências *B. stratosphericus* - LAMA 585; seis de *M. excellens* - LAMA 842 e cinco de *E. citreus* - LAMA915 (Tabela 5).

Tabela 5: Resultado da seleção de sequências de genes de endopeptidase de *B. stratosphericus* - LAMA 585; *M. excellens* - LAMA 842; *E. citreus* - LAMA915 quanto ao nome da enzima (BLAST – NCBI e Phyre), tamanho do gene e percentual de identidade com outras proteínas descritas (Blast2Go).

Organismos	Sequencia	Genes Anotados		Blast2Go*	% id.	
		Blast (NCBI)*	Phyre*			
<i>B. stratosphericus</i> (LAMA 585)	fig 1236481.4.peg.921	Ribonuclease H-like motif	prolyl endopeptidase	137	98,0	
	fig 1236481.4.peg.1927	structural genomics, unknown function	Oligopeptidase	686	99,3	
	fig 1236481.4.peg.2175	viral protein/ translation	trypsin / glutamyl endopeptidase	302	98,5	
	fig 1236481.4.peg.2581	structural genomics, unknown function	Oligoendopeptidas e	597	98,6	
	fig 1236481.4.peg.2588	Hydrolase	peptidase_M23	420	97,2	
	fig 1236481.4.peg.2857	Hydrolase	sporulation-specific l-ala-d-glu endopeptidase / peptidoglycan hydrolase	326	98,3	
	fig 1236481.4.peg.3257	Hydrolase	peptidoglycan hydrolase - cell wall endopeptidase	215	97,9	
	fig 1236481.4.peg.3437	serine protease	gamma-d-glutamyl-l-diamino acid endopeptidase	374	96,8	
	fig 1236481.4.peg.3514	Phosphorylase/hydrolase-like	germination protease	371	97,5	
	fig 1236481.4.peg.777	Ferredoxin-like	peptidase_S8	383	98,7	
	fig 1236481.4.peg.1178	Hydrolase	peptidase_S8	807	98,9	
	fig 1236481.4.peg.2243	Ferredoxin-like	serine protease	441	98,6	
	<i>M. excellens</i> (LAMA 842)	fig 1306954.5.peg.231	Hydrolase	metallopeptidase - membrane protein	149	79,4
		fig 1306954.5.peg.1305	Hydrolase	D-alanyl-Dalanine endopeptidase - serine peptidase	309	83,8
		fig 1306954.5.peg.1603	Hydrolase	metallopeptidase - membrane protein	315	66,9
		fig 1306954.5.peg.1114	Ribonuclease H-like motif	xaa-pro aminopeptidase	439	93,8
fig 1306954.5.peg.3967		transcriptional regulator	hypothetical protein	446	61,8	
fig 1306954.5.peg.4102		viral protein/ translation	hypothetical protein	342	60,0	

*Ferramentas da anotação descritas anteriormente na metodologia.

Continuação Tabela 5

Organismos	Sequencia	Genes Anotados			
		Blast (NCBI)*	Phyre*	Blast2Go* Tamanho	% id.
<i>E. citreus</i> (LAMA915)	fig 1306953.4. peg.1161	Hydrolase	serine protease - prolyl oligopeptidase	705	75
	fig 1306953.4. peg.2160	Hydrolase	prolyl oligopeptidase	705	80,2
	fig 1306953.4. peg.1192	Hydrolase	signal peptide peptidase SppA	626	76,3
	fig 1306953.4. peg.1678	Hydrolase/inhibitor	peptidase_S9	716	84,4
	fig 1306953.4. peg.1698	Membrane protein	membrane protein	304	85,7

*Ferramentas da anotação descritas anteriormente na metodologia.

As seqüências de proteínas selecionadas foram triadas por análises no BLAST CD (*conserved domains*) quanto a presença de gene completo, domínios ativos conservados BLASTp NCBI (Apêndice 2). As enzimas escolhidas apresentaram pelo menos 60% de identidade com outras proteínas já descritas e domínios conservados relacionados à atividade de protease (Tabela 6). Dentre as enzimas selecionadas a que apresentou menor porcentagem de identidade com o BLAST (NCBI) foi a *M. excellens* - LAMA 842 fig|1306954.5.peg.3967 (#16) com 61,8% e a maior *B. stratosphericus* - LAMA 585 fig|1236481.4.peg.2243 (#20).

Tabela 6: Resultado da seleção de sequencias de genes de endopeptidase de *B. stratosphericus* - LAMA 585; *M. excellens* - LAMA 842; *E. citreus* - LAMA915 quanto ao domínio conservado (BLASTp NCBI).

Organismo	Sequencia	Tamanho aa*	Registro (NCBI)	Domínio Conservado
<i>B. stratosphericus</i> (LAMA 585)	fig 1236481.4.peg.2243 (#20)	1.115	WP_007499449.1	GPR endopeptidase [<i>Bacillus stratosphericus</i>]
<i>B. stratosphericus</i> (LAMA 585)	fig 1236481.4.peg.3514 (#12)	1.325	WP_007501339.1	alkaline serine protease [Bacillus <i>stratosphericus</i>]
<i>M. excellens</i> (LAMA 842)	fig 1306954.5.peg.1305 (#2)	464	**	D-alanyl-D-alanine endopeptidase [<i>Marinobacter excellens</i>]
<i>M. excellens</i> (LAMA 842)	fig 1306954.5.peg.3967 (#16)	1.340	**	hypothetical protein [<i>Marinobacter sp.</i> <i>MCTG268</i>]
<i>E. citreus</i>	fig 1306953.4.peg.1192	1.880	WP_050600855.1	serine protease

* tamanho da sequência de aminoácido.

** registro não informado pois o genoma ainda está em fase final de publicação.

A estratégia utilizada para os domínios selecionados foi realizada a partir da presença de domínios com ação já comprovada em outros organismos na degradação de proteínas. Estruturas como as presentes nas estruturas #20 *B. stratosphericus* - LAMA 585 e #16 *M. excellens* - LAMA 842 apresentam o domínio da família Peptidase S8, onde sua região catalítica é semelhante ao encontrado em proteases como a tripsina. Estas enzimas podem estar intra e extracelular, e apresentam função característica de extremas temperaturas e com valores de pH alto ou baixo. A estrutura da *E. citreus* - LAMA915, possui domínios que estão envolvidos na clivagem de peptidos sinal (conservada em todos os membros da família S49) semelhante à de *E. coli* e peptidases. Além da presença da peptidase A (SPPA , protease IV), encontrado em *E. coli*, *Treponema pallidum*, *Mycobacterium leprae*, que pode desempenhar uma ou mais funções como, a degradação de proteínas, péptidos e glicopéptidos.

4.2. Clonagem dos genes alvos

Para a etapa de clonagem é necessário o desenho de pares de *primers* específicos para cada gene (Tabela 7), isto ocorre quando ele se pareia apenas na região específica que foi projetado (*template*), para isso, os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência do *ORF* e tiveram sítios de restrição determinados para as enzimas *XhoI* e *SalI*, em todos os genes selecionados. Estes sítios de restrição foram inseridos de forma a permitir a clonagem nos vetores de expressão. Adicionalmente, a temperatura de anelamento foi calculada a fim de garantir que o par de *primer* apresentasse temperaturas próximas. *Primers* não específicos acarretam a produção (amplificação) de fragmentos de DNA não correspondente à região alvo.

Tabela 7: Oligonucleotídeos desenhados a partir dos genes de proteases do genoma de *B. stratosphericus* - LAMA 585; *M. excellens* - LAMA 842; *E. citreus* - LAMA915, temperatura de *melting* (Tm) e percentual de Citosina e Guanina (%CG).

Sequencia	Primer	Tm	CG %
#12 Forward	5'TTTTcGAgGAAACAGAAACTC ^{3'}	53,0	39,1
#12 Reverso	5'CTGAGTCGACATTATAGGAACC ^{3'}	52,3	45,5
#20 Forward	5'ACATcTcgaGATTTTCCATG ^{3'}	49,9	40,0
#20 Reverso	5'TTATgTcgaCTTGGATTGCTTT ^{3'}	52,6	36,4
#2 Forward	5'AGCTTTctCGAgGCACCAAG ^{3'}	51,5	60,0
#2 Reverso	5'ATTGCGTCAgTCgaCAAGCT ^{3'}	52,9	56,2
#16 Forward	5'GTTTctGAgATTCGATACCACC ^{3'}	55,1	47,8
#16 Reverso	5'GTTTgTcGacATCCAGCAAAC ^{3'}	51,8	44,4
#21 Forward	5'GCATGagcTcTGCTGGTAAG ^{3'}	55,9	55,0
#21 Reverso	5'GCAATCTAGATAGCCGATCACC ^{3'}	55,0	50,0

Cada uma das etapas da reação de PCR (desnaturação, pareamento e extensão) ocorrem sob temperaturas ideais. A desnaturação, responsável por transformar a molécula de DNA de fita dupla em duas moléculas de fita simples ocorre em, aproximadamente, 94°C. A temperatura de pareamento é dependente dos *primers* utilizados e a temperatura de extensão é dependente do tipo de enzima polimerase utilizada. A temperatura de *melting* (TM) é definida como a temperatura a qual metade dos fragmentos de DNA está na forma desnaturada (não pareados), e a outra metade está pareada. A temperatura de anelamento (Ta) é a temperatura na qual ocorre o pareamento entre o *primer* e *template*. Geralmente, a Ta difere de 3 a 5°C da Tm dos *primers*.

Com base nestas temperaturas calculadas e testadas para cada gene, foi possível a amplificação da sequência do *B. stratosphericus* - LAMA 585 em 54°C. Observou-se a formação de rastros presente em todas reações separadas no gel, possivelmente devido à degradação do DNA para as outras temperaturas (SAMBROOK E RUSSELL, 2001). Para *M. excellens* - LAMA 842, houve amplificação nas temperaturas testadas de 54°C; 55°C; 56°C; 57°C e 58°C (Figura 2). Em todas houve a presença de duas bandas, sendo uma delas correspondente ao tamanho real do gene. Para amostra de *E. citreus* - LAMA915 não se obteve sucesso na amplificação. Apesar de diferentes parâmetros utilizados na reação de PCR testados e extrações de DNA genômico.

Os valores de temperatura variam de acordo com o tamanho do *primer*. Diferentes valores de temperatura foram encontrados na literatura, como de 52°C,

47°C e 48°C para *B. thuringiensis* (ALVES *et al.*, 2011); 58°C para *B. sp* (CAMPOS *et al.*, 2013); 48°C, 50°C, 52°C e 54°C *B. thuringiensis* (THULER *et al.*, 2008); 55°C *B. stratosphericus* (MOURA, 2014); 55°C *M. hydrocarbonoclasticus* (AMADOR, 2014); 55°C *Marinobacter sp* (ROSARIO, 2009), variação esta observada em função dos alvos serem diferentes, possuindo então *primers* distintos levando a condições variáveis no processo.

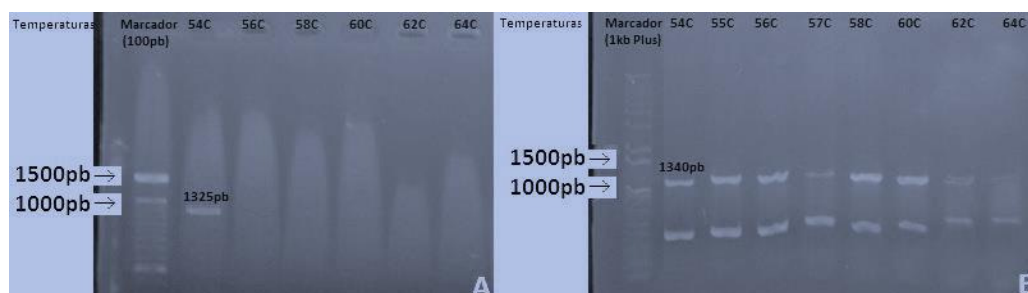


Figura 2: Separação por corrida em eletroforese de Gel de Agarose 1% dos produto de PCR **A:** *B. stratosphericus* - LAMA 585 apresentou amplificação positiva confirmada através da presença de banda para temperatura de 54°C e rastros nas temperaturas de 56°C, 58°C, 60°C, 62°C e 64°C **B:** *M. excellens* - LAMA 842 com padrão de banda dupla para as temperaturas testadas de 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 60°C, 62°C e 64°C sendo a banda maior (1340pb) correspondente ao tamanho do gene interesse.

Para solucionar as duplas bandas presentes no produto do PCR de *M. excellens* - LAMA 842, realizou-se a avaliação da variação na massa de DNA utilizada nas reações (Figura 3). Porém, não verificou-se diferença quanto a massa da DNA presente e o padrão de bandas, mesmo com as variações em grande quantidade.

Autores sugerem que a presença de bandas duplas podem estar atribuídas ao DNA genômico. Quando em excesso pode reduzir ou inibir significativamente a atividade de polimerização da enzima *Taq polimerase* devido a altas concentrações de impurezas. Em contra partida, DNA em concentração muito baixa pode dar origem a padrões de amplificação não reprodutíveis, podendo ocorrer acréscimo ou diminuição de bandas, mesmo entre repetições (FUNGARO, 2000). Eventuais subprodutos também podem ter sido gerados na reação de amplificação, formando as bandas de menor peso molecular, através da complementaridade de bases.

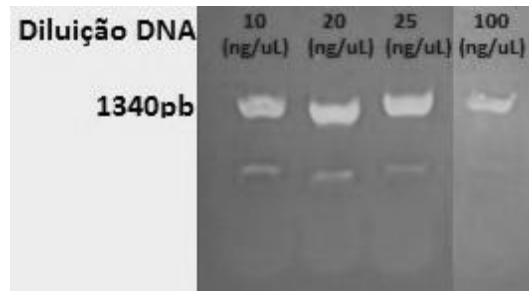


Figura 3: Separação por corrida em eletroforese de gel de Agarose 1% dos produtos de PCR para *M. excellens* - LAMA 842 nas concentrações de 10ng/μL, 20ng/μL, 25ng/μL e 100ng/μL, de DNA genômico com padrão duplo de bandas, sendo a indicada de 1.340pb correspondente ao gene interesse.

Manteve-se a presença de duas bandas, mesmo com variação na temperatura e concentração de DNA. A banda superior apresenta tamanho correspondente ao gene (1.340pb), confirmando a presença deste. Com isso, decidiu-se por dar prosseguimento, mesmo com o risco de clonar o gene da banda inespecífica ao invés do alvo.

4.3. Ligação ao vetor pBADMyHisB

Durante o desenvolvimento deste trabalho, a etapa de obtenção do gene que codifica enzimas proteolíticas mostrou-se um grande desafio. A abordagem inicial foi clonar o gene diretamente no vetor pBADMyHisB utilizando os sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *SalI*. A escolha deste vetor foi baseada nas características como a rápida indução na presença de L-arabinose e rápida repressão na ausência desta molécula, o que tornou o promotor alvo de estudos visando aplicações onde é necessário se ter o controle dos níveis de expressão dos genes estudados. Além, de conferir à proteína a fusão de uma cauda de seis histidinas na região N-terminal, o que facilitaria os ensaios de purificação. As células resultantes da ligação no vetor pBADMyHisB foram transformadas em placas contendo meio de cultura, foi possível observar a presença de células transformantes (Figura 4).

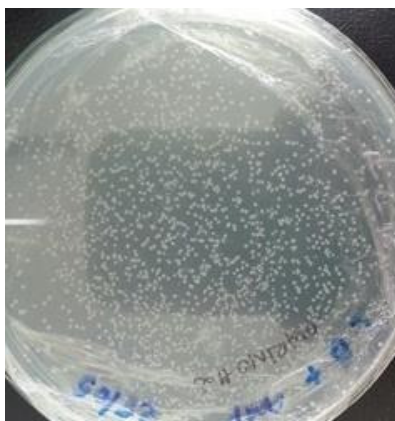


Figura 4: Colônias da etapa de transformação utilizando vetor pBADMyHisB por meio de choque térmico em *E. coli*. Placa contendo meio de cultura LB e ampicilina.

Células de cinco colônias que degradaram o substrato foram repicadas no mesmo meio de cultura para confirmar atividade (Figura 5). Os clones ativos foram submetidos a uma reação de PCR de colônia com *primers* específicos para os genes-alvo. Por fim, para a confirmação da identidade do gene, uma entre as colônias positivas teve seu plasmídeo extraído, armazenado (-20°C) e uma alíquota sequenciada (método de Sanger, MacroGen – Coréia do Sul), o qual demonstrou que o gene não estava no ligado ao plasmídeo, porém enquanto se aguardava o sequenciamento se deu sequencia nas etapas seguintes.

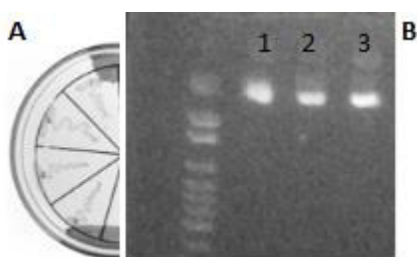


Figura 5: **A:** Colônias da placa de transformantes que degradaram o substrato foram repicadas no mesmo meio de cultura, tempo e temperatura de incubação para confirmar atividade. **B:** Separação por corrida em eletroforese de Gel de Agarose 1% da extração de plasmídeo 1: *B. stratosphericus* - LAMA 585 2: *M. excellens* - LAMA 842 3: *E. citreus* - LAMA915.

Após esta etapas, uma colônias isoladas de cada linhagem foi incubadas em meio de cultura contendo LB e antibióticos específicos. Uma alíquota foi transferido para um tubo contendo somente o mesmo meio de cultura LB e antibióticos e outra alíquota foi transferida para um tubo contendo também arabinose, como indutor de atividade, na concentração de 0,05%. Após 24 horas de cultivo em tubos de ensaio, foi possível detectar uma elevada turbidez nos meios de cultura, indicando o crescimento

das bactérias. Posteriormente, estas bactérias foram submetidas a uma avaliação quanto à atividade de suas protease.

4.3.1. Avaliação de atividade (vetor pBADMyHisB)

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, onde foi adicionado 50µL da amostra e 50µL do substrato (azo-caseína 2mM), incubados durante o período de 5 horas a 40°C, após o período decorrido, foi adicionado 150µL de TCA 10%, levado durante 20 minutos ao gelo e centrifugado. Uma alíquota de 100µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de leitura, onde também foi adicionado uma alíquota de 100µL de NaOH e realizado a leitura no espectrofotometro com comprimento de onda de 440nm (Tabela 8).

Tabela 8: Valores de leitura no espectrofotômetro em 440nm para ensaio de atividade com (0,05%) e sem (0%) indução de arabinose para *B. stratosphericus* - LAMA 585 fig|1236481.4.peg.2243 (#20), *B. stratosphericus* - LAMA 585 fig|1236481.4.peg.3514 (#12) e *M. excellens* - LAMA 842 fig|1306954.5.peg.1305 (#2)

Linhagem	<i>B. stratosphericus</i>		<i>B. stratosphericus</i>		<i>M. excellens</i>	
	- LAMA 585 fig 1236481.4.peg.2243 (#20)		- LAMA 585 fig 1236481.4.peg.3514 (#12)		- LAMA 842 fig 1306954.5.peg.1305 (#2)	
<i>E. coli</i>	0% ara.*	0,05% ara.	0% ara.*	0,05% ara.	0% ara.*	0,05% ara.
Top10	0,0701	0,0702	0,0693	0,0679	0,0690	0,0697
Chaperona1	0,0829	0,0737	0,0744	0,0667	0,0752	0,0675
Chaperona2	0,0742	0,0679	0,0740	0,0702	0,0783	0,0718
Chaperona3	0,0750	0,0678	0,0754	0,0683	0,0724	0,0687
Chaperona4	0,0693	0,0682	0,0722	0,0697	0,0731	0,0748
Chaperona5	0,0797	0,0699	0,0752	0,0709	0,0694	0,0740
Rosetta	0,0724	0,0789	0,0677	0,0712	0,0692	0,0753

*ara: arabinose

Utilizando-se os resultados com e sem indutor de atividade (arabinose), esperava-se que os resultados obtidos com a indução da atividade fossem maiores, porém no gráfico (Figura 6) fica evidente que não se atingiu atividade proteolítica desejada.

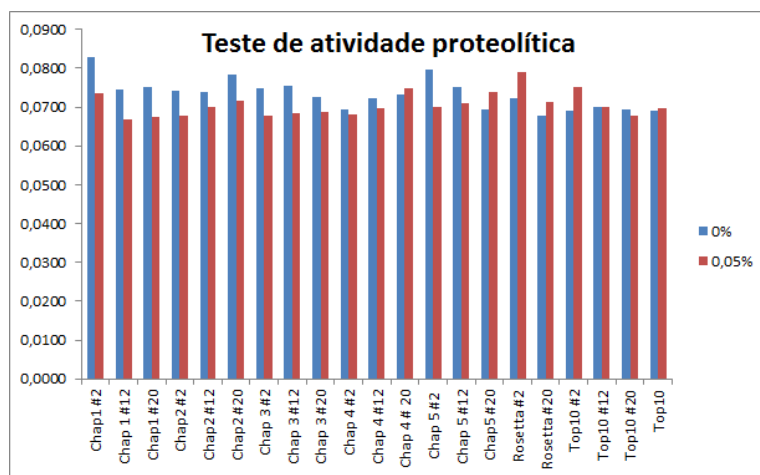


Figura 6: Efeito da presença (0,05%) e ausência (0%) do indutor arabinose na atividade da protease recombinante de *B. stratosphericus* - LAMA 585 fig|1236481.4.peg.2243 (#20), *B. stratosphericus* - LAMA 585 fig|1236481.4.peg.3514 (#12) e *M. excellens* - LAMA 842 fig|1306954.5.peg.1305 (#2). A leitura da absorbância das reações foi realizada em espectrofotômetro ($\lambda = 440$ nm) (Infinite® 200 PRO NanoQuant – Tecan).

Após testarmos diferentes hipóteses para o insucesso na clonagem direta do produto de PCR ao vetor pBADMyHisB, como a eficiência das células competentes, testando várias linhagens de *E. coli* (*Top10*; *Chaperona1*; *Chaperona2*; *Chaperona3*; *Chaperona4*; *Chaperona5* e *Rosetta*); avaliação das enzimas (re-avaliando as etapas iniciais de seleção dos genes, desenho dos *primers* e programa adotado na fase de amplificação), não foi possível obter o clone desejado.

Algumas razões para a não clonagem do vetor pode ser explicada pelo fato do gene ou vetor não ter seus terminais digeridos adequadamente, portanto não puderam se ligar corretamente. Para que haja a expressão de uma determinada proteína, o inserto deve se ligar ao vetor de forma que a fase de leitura correta seja reconhecida, se isto não ocorrer, novas proteínas serão formadas e, portanto, a sequência de interesse não será detectada, mesmo que ela esteja presente em um determinado clone. A eficiência da transformação é um processo que depende de vários fatores, tais como o estado fisiológico das células, os componentes presentes na cultura destas bactérias e as características genéticas da espécie em questão. Esta transformação é o processo natural onde o DNA exógeno liberado após a lise celular é capturado por outra célula, a receptora. A célula apta a receber um DNA exógeno é dita como competente e esta competência está relacionada à presença de receptores na superfície das células doadoras, os quais se ligam ao DNA exógeno e o aproximam da superfície celular. Este material é então internalizado e, finalmente, incorporado ao genoma da célula receptora, o que pode não ter ocorrido de maneira eficiente nas abordagens deste trabalho. Outra razão poderia ser a toxicidade do gene, o que

estaria levando a morte bacteriana, pois o gene estaria sendo expresso, como não houve a indução com arabinose, a enzima não estaria produzindo, ou seja, esta só será expressa após indução. Isto é importante porque proteínas tóxicas às bactérias não são expressas após indução quando há vazamento de expressão de forma basal (MIYAMOTO, 2013).

Baseado no insucesso desta etapa, decidimos usar outra estratégia de clonagem, como o uso do vetor pTZ57R/T. Neste, não é necessário a etapa prévia de digestão, o que leva a clonagem direta do produto da reação de PCR.

4.4. Ligação ao vetor pTZ57R/T

Seguindo-se com a nova abordagem, ao final do plaqueamento, da transformação usando células da ligação com vetor pTZ57R/T, foram obtidas colônias que receberam apenas o vetor sem o fragmento amplificado, estas apresentavam coloração azul; e colônias que receberam o vetor pTZ57R/T ligado ao fragmento de interesse, que apresentavam coloração branca (Figura 7A). Isso ocorre porque em diversos vetores de clonagem, um "sítio de clonagem múltipla" (*Multiple Cloning Site*) está presente no meio da sequência codificadora do fragmento α (parte N-terminal) da β -galactosidase. Nesse sítio é possível colocar DNA exógeno de interesse, como fragmentos provenientes de PCR. Com isso, a sequência da β -galactosidase é quebrada somente nas células transformadas, que passam a não expressar mais a enzima. Disso segue-se que essas células não poderão mais clivar a X-Gal (que é usado para detectar DNA exógeno inserido na região *lacZ* de um DNA plasmidial), não produzindo corante azul. Por tanto, nesse processo de transformação, as colônias sem o vetor aparecerão em azul, enquanto as com o DNA de interesse aparecerão brancas.

Para se confirmar que as colônias observadas nas placas de transformantes continham os genes de interesse foi realizada uma PCR de colônia com os iniciadores específicos para cada gene (Figura 7B) e PCR da extração de plasmídeo (Figura 7C). Nestas reação esperava-se observar bandas do tamanho do gene alvo quando a reação de amplificação fosse submetida à eletroforese em gel de agarose. Foram utilizadas algumas colônias brancas (alvo interesse) e azuis (como controle negativo). Para cada gene foram observadas bandas com tamanho diferentes do gene de interesse (500pb), *B. stratosphericus* - LAMA 585 fig|1236481.4.peg.2243 (#20 – 1.325pb) e *M. excellens* - LAMA 842 fig|1306954.5.peg.3967 (#16 – 1.340pb). Sabendo que o que estava presente não era o nosso gene de interesse, indicando ser contaminantes, foram renomeados, para dar sequência ao trabalho, em contaminante

1 e 2, para #20 *B. stratosphericus* - LAMA 585 e #16 *M. excellens* - LAMA 842, respectivamente.

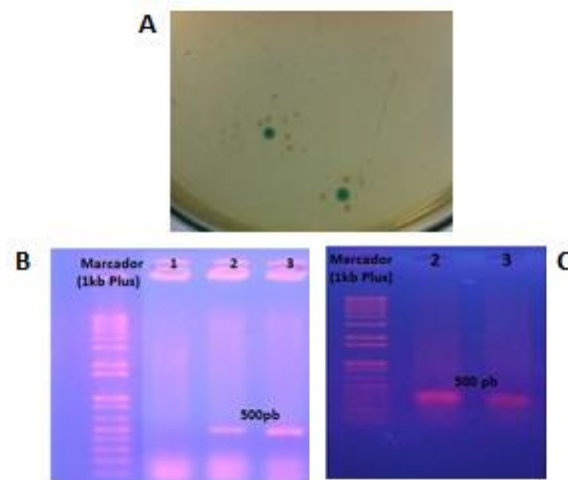


Figura 7: **A:** Colônias formadas na placa como produto da transformação do gene ligado ao vetor pTZ57R/T, presença de colônias azuis e brancas. **B:** Separação por corrida de eletroforese em gel de Agarose 1% do PCR de colônia onde **1:** colônia azul – controle negativo; **2:** contaminante1 e **3:** contaminante2 **C:** Separação por corrida de eletroforese em gel de Agarose 1% do PCR de colônia onde **2:** plasmídeo contendo gene do contaminante1 e **3:** plasmídeo contendo gene do contaminante2.

4.3.2. Avaliação da atividade proteolítica (contaminantes – vetor pTZ57R/T)

Como na etapa anterior, foi detectada a presença de clones contendo insertos, deu-se prosseguimento ao teste de atividade proteolítica, com o intuito de verificar se estes genes contaminantes possuíam algum potencial. Para isso, diferentes concentrações de IPTG (Figura 8) foram utilizadas com algumas colônias resultantes das placas de transformantes, selecionadas aleatoriamente, e células de Top10 (utilizadas para comparação como branco). Para o gene de protease dos contaminantes a confirmação da inserção do gene à colônia transformante foi realizada pela capacidade de degradação do substrato azo-caseína 2mM. O resultado do teste de atividade enzimática foi observado pela mudança da coloração do meio reacional.

adicional não aumentaria a transcrição do gene *lacZ* de forma significativa (OLAOFÉ, 2010). Este padrão foi observado para as amostras das colônias 1 de ambos contaminantes.

Sabe-se que a expressão de um gene é iniciada quando a DNA polimerase se liga ao promotor em uma sequência específica. O produto do gene regulador (ativador ou repressor) se liga a uma sequência localizada próxima ao promotor. Algumas vezes, o produto do gene regulador não consegue se ligar sozinho ao gene e precisa de uma molécula efetora. As moléculas efetoras são pequenas moléculas, como aminoácidos, açúcares e outros metabólitos semelhantes. Quando participam em conjunto com um ativador, são chamadas moléculas indutoras; quando participam em conjunto com um repressor, são chamadas moléculas co-repressoras. O mecanismo de ação das moléculas indutoras consiste na sua ligação ao produto do gene regulador, promovendo uma mudança na sua conformação, alterando sua capacidade de se ligar na região do DNA próxima ao promotor do gene que ele controla.

As bactérias possuem um mecanismo geral para a regulação de genes que codificam produtos relacionados ao funcionamento de um determinado processo bioquímico. Os genes que codificam estes produtos estão agrupados em uma região particular do cromossomo e geralmente são transcritos como uma única molécula de RNA. A maioria dos mRNAs de procariotos utiliza um mesmo transcrito para codificar mais de uma proteína. A produção do transcrito é dirigida por um único promotor, o qual possui sequências que são responsáveis pela sua regulação.

O promotor Lac contém três genes estruturais (*lacZ*, *lacY* e *lacA*) que codificam as enzimas como a β -galactosidase. Quando a lactose está disponível, o promotor é induzido. Uma molécula indutora (sinal) se liga a um sítio específico do repressor, causando uma mudança conformacional que leva à dissociação entre o repressor e o operador. O indutor do sistema não é a própria lactose, mas sim um isômero desta. Depois de entrar na célula, a lactose é convertida em alolactose por uma das poucas moléculas de β -galactosidase existentes. A liberação do repressor Lac causada por ela permite que os genes sejam expressos. O IPTG trata-se de um indutor equivalente, a lactose sendo a fonte de carbono e um forte indutor químico utilizado largamente nos processos em que estão envolvidos a indução de promotores (PANDA *et al.*, 1999). Desta forma, representa uma das moléculas indutoras mais utilizadas nos mais variados sistemas de expressão heteróloga (ZANFONATO, 2012). O IPTG representa hoje um dos indutores mais utilizados em sistemas de alta expressão, no entanto uma das grandes dificuldades na indução por IPTG é sua alta citotoxicidade, apresentando efeitos negativos no crescimento celular (CHAVES, 2009). A forma de indução por IPTG empregada varia tanto em concentrações do indutor, fase da

indução, temperatura e tempo de indução. Sendo que essas condições devem ser testadas e otimizadas, pois dependerão da proteína a ser produzida, da estirpe de *E. coli*, do meio de cultivo, entre outros fatores que são específicos de cada processo.

Pesquisas relatam que formas de indução tornam-se um parâmetro importante na otimização da expressão da proteína recombinante. A maioria dos pesquisadores aperfeiçoou a estratégia de indução variando a dose de indução (AUSTIN *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2005), tempo de indução (HU *et al.*, 2004), além de temperatura, condições de aeração, composição do meio de cultivo e o indutor empregado.

4.5. Avaliação da hidrólise de pescado

A etapa final deste trabalho foi realizada através dos testes utilizando enzimas proteolíticas e lipolíticas no processo de hidrólise de pescado. A estimativa da dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, escolhido por ser um método rápido, de alta sensibilidade, permitir analisar grande número de amostras por vez e não sofrer ação interferente de compostos como carboidratos por exemplo.

Os produtos resultantes do processo de hidrólise sofreram diluições com água destilada para que os valores se mantivessem dentro da curva padrão. Os resultados obtidos para o ensaio de concentração de proteína no processo de hidrólise de músculo do pescado são apresentados na Figura 9.

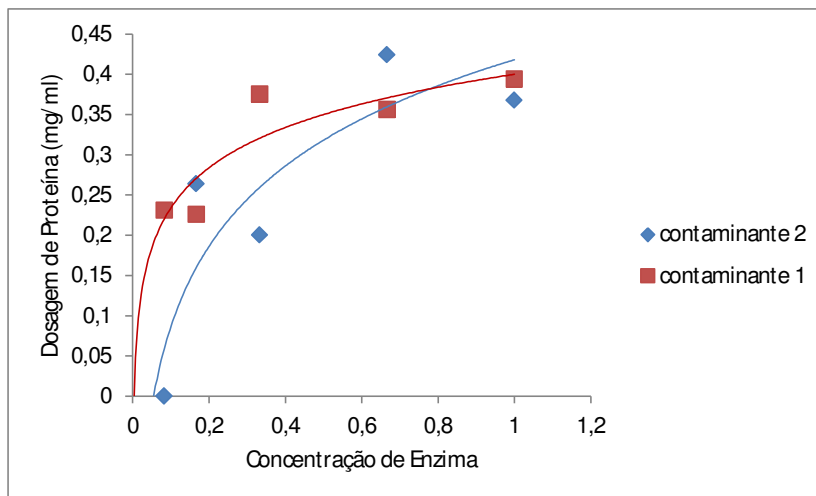


Figura 9: Estimativa de dosagem de proteína no processo de hidrólise de pescado em diferentes concentrações de enzima das bactérias contaminantes.

Foi observado um comportamento comum às curvas, com uma elevação na hidrólise inicial, devido ao elevado número de ligações peptídicas clivadas. Após as concentrações iniciais utilizadas, foi verificada uma, provável, estabilização na taxa de hidrólise, o que indica que a utilização de uma menor concentração poderia acarretar na não obtenção do máximo rendimento do processo de hidrólise, em contra partida, a adição de concentrações ainda maiores podem vir a levar ao gasto desnecessário, uma vez que nesta etapa se determinou concentrações adequadas de enzima para um ensaio posterior. É possível observar no comportamento das curvas que a quantidade de proteína hidrolisada no processo acompanha a quantidade de enzima disponibilizada e que, quanto maior o grau de hidrólise, maior a liberação de peptídeos ativos, corroborando com o que foi descrito por Nilsang e colaboradores (2004).

Uma vez estabelecida a concentração adequada do caldo enzimático no processo de hidrólise de resíduo de pescado, deu-se prosseguimento com a avaliação do tempo de reação. Os valores de hidrólise enzimática observados para as enzimas

expostas em diferentes tempos (Figura 10) apresentam um grande crescimento inicial, seguido de um comportamento quase que estável, ou seja, não há aumento ou redução significativo no processo ao longo do tempo, podendo o ensaio ser realizado em condições de tempos menores, sem que a sua eficiência seja afetada.

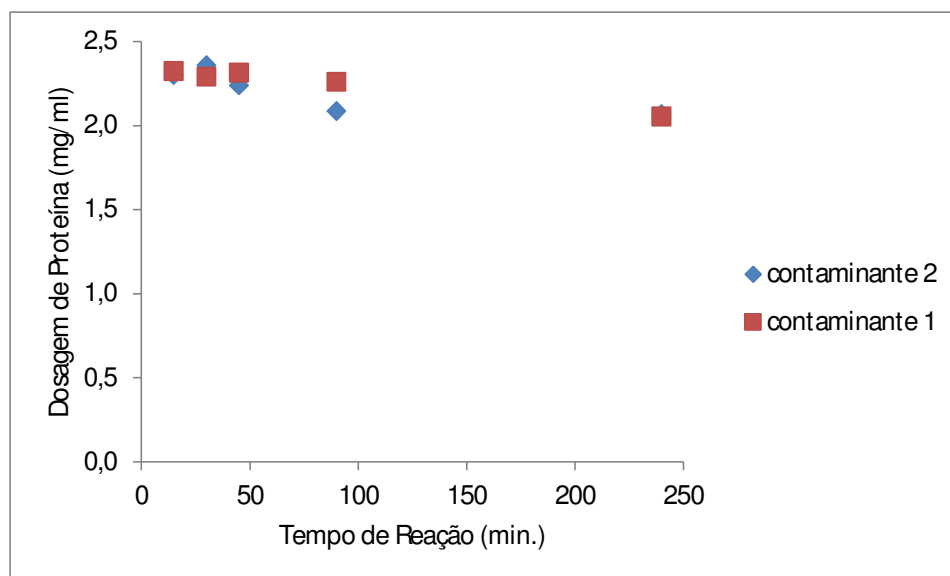


Figura 10: Diferentes tempos de incubação no processo de hidrólise enzimática utilizando proteases contaminantes 2 *M. excellens* (LAMA 842) e 1 *B. stratosphericus* (LAMA 585).

O resultado corrobora com o comportamento similar obtido com a hidrólise de peito de frango utilizando a protease alcalase, e uma variação de tempo de 15 a 400min, na mesma temperatura utilizada neste estudo (50°C), sendo possível observar uma rápida clivagem das ligações peptídicas nos primeiros 15 minutos de reação, seguida da sua estabilização (KUROZAWA *et al.*, 2009), músculo de salmão (KRISTINSSON & RASCO, 2000) e proteína do soro de leite, utilizando protease alcalase, conduzido durante 6h com alíquotas retiradas em intervalos de tempo (SPELLMAN *et al.*, 2003). Uma alta taxa de hidrólise inicial, pode estar ligada ao elevado número de ligações peptídicas clivadas no início da reação. Alguns trabalhos verificaram após um período de tempo uma redução na taxa de hidrólise, essa diminuição da velocidade de reação podendo ocorrer por diversos fatores dentre os quais: inibição potencial da enzima, degradação total, efeito da concorrência entre produto e substrato, diminuição de sítios de hidrólise disponíveis ou ainda pela autodigestão enzimática (SOUZA, 2013), o que não foi observado neste trabalho, onde não foi observada uma variação.

Uma vez estabelecida os efeitos da presença de proteases na reação de hidrólise, prosseguiu-se com a hidrólise utilizando lipase, onde foi avaliado o efeito das diferentes concentrações da enzima, a fim de avaliar se deslipidificação da amostra tem influência no processo de hidrólise de pescado realizado por enzimas proteolíticas, foram utilizadas lipases inativas (como controle); lipases ativas e a protease comercial (Figura 8).

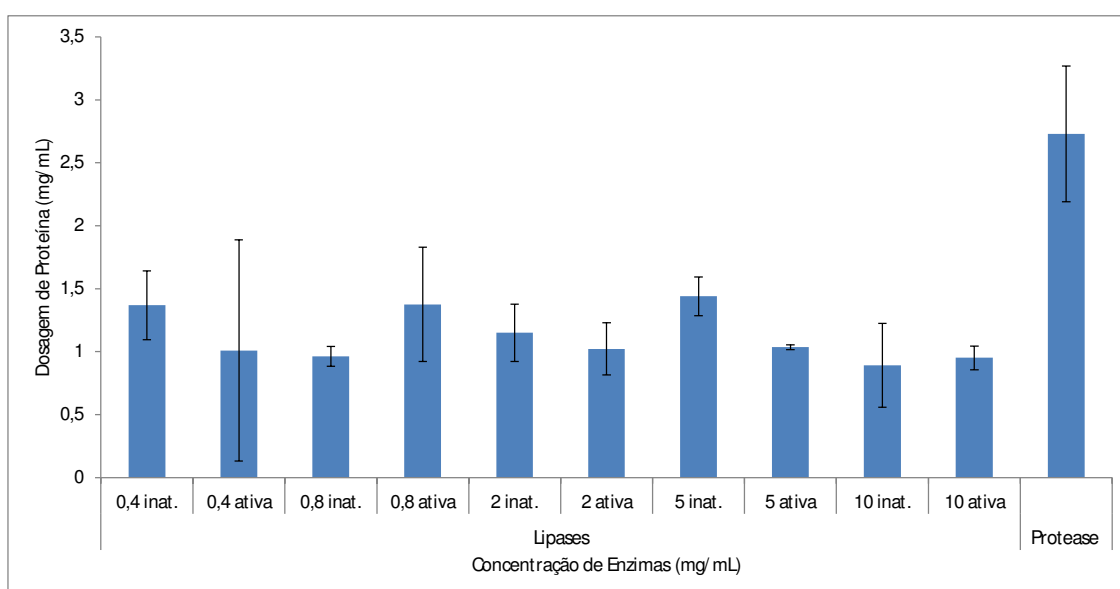


Figura 11: Avaliação do efeito da adição de diferentes concentrações de lipase ativa, no processo de hidrólise de proteína.

Conforme o gráfico é possível observar que todos os ensaios com lipase inativa e ativa não diferiram entre si, sendo todos os valores inferiores ao tratamento utilizando somente a protease, o que nos leva a concluir que, nas condições testadas, a adição de lipase não é vantajosa para o processo de hidrólise. Segundo DRAVANOV & KHALAMEIZER (1997), a ação de lipases é regulada por numerosos fatores externos. Diante disso, as variações entre as condições nas quais as reações de hidrólise se desenvolvem, culminam em diferentes graus de conversão, podendo explicar a ausência de um padrão entre a concentração de enzima e a quantidade de proteínas hidrolisadas. As amostras contendo 0,8mg/mL e 10mg/mL de lipase foram hidrolisados em 41,3% e 5,9%, respectivamente, sendo as únicas que apresentaram valores positivos. Sendo o primeiro resultado presente dentro dos valores apresentados por lipase (*Candida rugosa* – Sigma®), a mesma utilizada no presente estudo, no processo de hidrólise de triglicerídeos presentes no óleo de soja, onde o grau de hidrólise variou entre 16,15 e 63,04% (BUENO, 2005).

Apesar destes resultados, a hidrólise utilizando a protease comercial foi muito superior, indicando que a adição de lipase no processo dificulta o mesmo, não sendo vantajosa a utilização do mesmo combinado ao uso de proteases para este fim.

5. CONCLUSÃO

A partir do conjunto de 11.280 proteínas reconhecidas no genoma de três bactérias marinhas de profundidade, foi conduzida a prospecção de proteases e peptidases. A elevada ocorrência destas enzimas (número de genes reconhecidos), revelam sua importância para a vida no ambiente marinho extremo, onde substratos proteicos representam importante fonte de nutrientes. Assim como, significam um excelente reservatório a ser explorado para proteases industriais. Uma vez que além da abundância, constatou-se que o acervo de proteases possui ampla diversidade de arquiteturas e estruturas. Estratégias para a clonagem de cinco proteases selecionadas a partir do conjunto foram conduzidas. Entretanto, dificuldades no processo amplificação e ligação, impediram a obtenção dos organismos recombinantes. Apesar disso, bactérias proteolíticas não geneticamente modificadas foram testadas quanto ao processo de hidrólise de pescado. Nas condições testadas, verificou-se que as proteases bacterianas atingiram sua eficiência máxima de digestão já nos primeiros minutos de reação, indicando possível potencial de aplicação. Por outro lado, quando lipases comerciais foram adicionadas, o processo de hidrólise ficou comprometido. Portanto, indicando que o aumento do valor agregado de resíduos pesqueiros por meio da hidrólise deve ser principalmente focado nas proteases e, não nas lipases coadjuvantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. **Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review**. Braz J Microbiol. v. 43, p.844-56. 2012.

AEHLE, W.; **Enzymes in Industry**, Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2004.

AMADOR, R. A. R. **Clonagem, sobre-expressão, purificação e caracterização bioquímica da proteína MreB de Marinobacter hydrocarbonoclasticus**. Tese (dissertação de mestrado em bioquímica) - Faculdade de ciências e tecnologia e a universidade nova de Lisboa, 2014.

AUSTIN CJD, MIZDRAK J, MATIN A, SIRIJOVSKI N, KOSIM-SATYAPUTRA P, WILLOWS, RD. **Optimised expression and purification of recombinant human indoleamine 2,3- dioxygenase**. Protein Expr. Purif. v.37, p.392-398, 2004.

BENJAKUL, B.; MORRISSEY, M.T. **Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes**. Journal of Agricultural and Food Chemistry , v.45, p. 3424-3430, 1997.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 506p, 2008.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254, 1976.

BRENNER, S.E. **A tour of structural genomics**. Nat. Rev. Genet. v. 2, n. 10, p. 801-809, 2001.

BUENO, T. **Obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja**. 2005

CAMPOS, L.L.; SILVA, C.C.; SILVEIRA, A. B.; LISBOA, B.B; OLIVEIRA, A.M.R. **caracterização de bactérias dos gêneros *bacillus* e *paenibacillus* para a presença de genes produtores de quitinase**. SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 2013.

CANGANELLA, F.; WIEGEL, J. **Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond**. Naturwissenschaften, v.98, p.253-79, 2011.

CASTRO, A. M.; **Produção e propriedades de celulasas de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Tese (Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

CENTENARO, G. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. E.; SALAS-MELLADO, M. **Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*)**. Quim. Nova, v. 32 (7), p. 1792-1798, 2009.

CHAVES, R. V. A. **Avaliação de dois clones de escherichia coli recombinante quanto ao crescimento e expressão de antígenos de leishmania chagas (kmp11 e p36)**. DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE; 2009.

DINIZ, F.M. & MARTIN, A.M. **Hidrolisado protéico de pescado** In: OGAWA, M. & MAIA, E.L. Manual de Pesca. São Paulo: Varela, 1999.

DRAVANOV, K.; KHALAMEIZER, V.B. **Current state of study of microbial lipases**. Chem. Nat. Comp., v. 33, p. 113-126, 1997.

EINSFELDT K, SEVERO JÚNIOR J, CORRÊA ARGONDISSO A, MEDEIROS M, ALVES T, ALMEIDA R. **Cloning and expression of protease clpp from streptococcus pneumoniae in escherichia coli: study of the influence of kanamycin and iptg concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability**. VACCINE. 2011

FARIA, A.C.E.A.; HAYASHI, C.; GALDIOLI, E.M.; SOARES, C.M. **Farinha de peixe em rações para alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), linhagem tailandesa**. Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, PR, 2001.

FOCUS ON CATALYSTS, V.2010, P.2, JAN., 2011. DISPONÍVEL EM: <[HTTP://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE?_OB=MIAMIIMAGEURL&_CID=272724&_USER=687350&_PII=S1351418010705146&_CHECK=Y&_ORIGIN=SEARCH&_ZONE=RSLT_LIST_ITEM&_COVERDATE=2011-01-31&WCHP=DGLBVLVZSKWZ&MD5=6742C7D91BF69E54BBF86A4DAC8B2DDB/1-S2.0-S1351418010705146-MAIN.PDF](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIAMIIMAGEURL&_cid=272724&_user=687350&_pii=S1351418010705146&_check=Y&_origin=SEARCH&_zone=RSLT_LIST_ITEM&_coverdate=2011-01-31&wchp=DGLBVLVZSKWZ&md5=6742C7D91BF69E54BBF86A4DAC8B2DDB/1-S2.0-S1351418010705146-MAIN.PDF)>.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. **Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis**. Process Biochemistry, v. 31, p. 605, 1996.

FUNGARO, M.H.P. **PCR na micologia**. Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento v.3, p.12-16, 2000.

FURLAN, E.F.; OETTERER, E M.. **Hidrolisado protéico de pescado**. Revista Ciência & Tecnologia, v. 10, p. 79-89, 2002.

GUPTA R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. **Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications**. Applied Microbiology and Biotechnology, v.59, p.15-32, 2002.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. **Developments in industrially important thermostable enzymes: a review**. Bioresource Technology, v. 89, p. 17-34, 2003.

HANDELSMAN J, RONDON MR, BRADY SF, CLARDY J, GOODMAN RM. **Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products**. Chemistry and Biology, v.5, n.10, p.245-249, 1998.

HANDELSMAN J. **Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms**. MICROBIOL MOL BIOL, 2004.

HARDEMAN, F; SJOLING, S. **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, p.524-534, 2007

HOLANDA, H.D. **Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas (*xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos.** Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004.

HU SY, WU JL, HUANG JH. **Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *escherichia coli*.** J. Biotechnol, p.107:161-171, 2004.

KASANA, R.C.; GULATI, A. **Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review.** J Basic Microbiol. v. 51, p. 572-579. 2011.

KENNEDY, J.; MARCHESI, J. R. **Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments.** MICROB CELL FACT, 2008.

KIRIHATA, J. LÍDER MUNDIAL DE BIOINOVAÇÕES PREPARA NOVA FÁBRICA NO BRASIL. 19 JUN. 2010. DISPONÍVEL EM: <[HTTP://WWW.BIINTERNATIONAL.COM.BR/LIDER-MUNDIAL-EM-BIOINOVACOESPREPARE-NOVA-FABRICA-NO-BRASIL-19072010/](http://www.biointernational.com.br/lider-mundial-em-bioinovacoesprepara-nova-fabrica-no-brasil-19072010/)>.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SIMPSON, B. K.; KISHIMURA, H. **Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous twophase systems.** Process Biochemistry, v. 40, p. 3061–3067, 2005.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. **Diversifying microbial natural products for drug discovery.** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, 2003.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO B. **Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 40, p. 43-81, 2000.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. RESEARCH REVIEW PAPER MICROBIAL ALKALINE PROTEASES: FROM A BIOINDUSTRIAL VIEWPOINT. BIOTECHNOLOGY ADVANCES, 1999.

KUROZAWA, L.E., PARK, K.J., HUBINGER, M.D., **influência das condições de processos na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango.** CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2009

LARENTIS A, ARGONDISSO A, ESTEVES G, JESSOURON E, GALLER R, MEDEIROS M. **Cloning and optimization of induction conditions for mature psaa (pneumococcal surface adhesin a) expression in *escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage.** PROTEIN EXPRESSION ANDPURIFICATION, 2011.

LEVEAU, J. H. J. **The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria.** EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, 2007.

LIMA, A.O.S. et al. **Molecular characterization of a β -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.68, p.57-65, 2005.

LIU, J. & ROST, B., **target space for structural genomics revisited.** BIOINFORMATICS, 2012.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Brock Biology of Microorganisms.** ed. 12. Estados Unidos da América, 2008.

MARTONE, C.B.; BORLA, O.P.; SÁNCHEZ, J.J. **Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media.** Bioresource Technology, v. 96, p. 383-387, 2005.

MIYAMOTO, C. A. **Produção de proteínas recombinantes em *escherichia coli*,** 2013.

MOURA, A. J. **Microrganismos endofíticos associados à planta de ambientes impactados e não impactados pela drenagem ácida de mina de carvão (dam).** TESE (MESTRE EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2014.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. **Enzimas, poderosas ferramenta na indústria.** Ciencia Hoje; vol. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

OLAOFE O, BURTON S, COWAN D, HARRISON S. **Improving the production of a thermostableamidase through optimising iptg induction in a highly dense culture of recombinant *escherichia coli*.** BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL, 2010

PANDA AK,KHAN RH, RAO KB, TOLEY SM. **Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of *escherichia coli* expressing ovine growth hormone.** J BIOTECHNOL.,1999.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P.; **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications,** Springer: Dordrecht, 2007.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas industriais e especiais.** CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS - CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, 2006

RAGUKUMAR, C. **Diversity and adaptations of deep-sea microorganisms.** In: satyanarayana, t. And johri, b.n. eds.**microbial diversity: current perspectives and potential applications.** INTERNATIONAL PUBLISHING HOUSE, 2005.

RAJENDHRAN, J., GUNASEKARAN, P. **Strategies for accessing soil metagenome for desired applications.** BIOTECHNOL ADV., 2008.

RAO, M. B.; TANKSALE, M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sep. 1998.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. **Merops: the peptidase database**. NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2006

ROSARIO, A. C. C. E. **Caracterização de populações microbianas em reatores "jet em reatores "jet- -- -loop" para tratamento de loop" para tratamento de efluentes agro-industriais**. TESE (DOUTORADO EM BIOLOGIA) - UNIVERSIDADE DE LISBOA FACULDADE DE CIÊNCIAS DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL, 2009.

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

SAJEDI, R.H.; NADERI-MANESH, H.; KHAJEH, K.; AHMADVAND, R.; RANJBAR, B.; ASOODEH, A.; MORADIAN, F. **A ca-independent α -amylase that is active and stable at low ph from the bacillus sp kr-8104**. ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, DW. **Molecular cloning: a laboratory manual**. NEW YORK: COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, 2001.

SARMADI, B. H., & ISMAIL, A.. **Antioxidative peptides from food proteins: a review**. Peptides, v.31, p.1949–1956, 2010.

SCHLOSS, P. D., HANDELSMAN, J. **Biotechnological prospects from metagenomics**. CURR OPIN BIOTECHNOL., 2003

SILVA, J.F.X. **Produção e Caracterização de Hidrolisado Protéico Provenientes de Resíduos de Tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2010.

SOARES, L.H.B.; MARQUES, D.N.; ALBUQUERQUE, P.M.; AYUB, M.A.Z. **Influence of some commercial proteases and enzymatic associations on the hydrolytic solubilization of deboned poultry meat proteins** *Influencia de algunas proteasas comerciales y preparados enzimáticos en la solubilización hidrolítica de las proteínas de la carne de pollo separada mecánicamente*. Food Science and Technology International, 2000.

SOUZA, R. S. C. **Avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano de proteínas do soro de leite concentradas por membranas e hidrolisadas por diferentes enzimas comerciais**. TESE (MESTRADO EM CIÊNCIAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS) - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 2013.

SPELLMAN, D., MCEVOY, E., O'CUINN, G., FITZGERALD, R.J., **proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of the tnbs, opa and ph stat methods for quantification of degree of hydrolysis**. INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, 2003.

TAYLOR, W.R. **a 'periodic table' for protein structures**. NATURE, 2002

TOUSSAINT, A., GHIGO, J. M., SALMOND, G. P. **A new evaluation of our life-support system.** EMBRO REP., 2003.

GUIDELLI-THULER, A.M.; SENA, J.A.D.; ABREU, I.L.; DAVOLOS, C.C.; ALVES, S.B.; POLANCZYK, R.A.; VALICENTE, F.H.; LEMOS, M.V.F. ***bacillus thuringiensis*: diversidade gênica em isolados lepidoptera-específicos.** ARQ. INST. BIOL., 2008.

TREMACOLDI, C. R. **Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas** ISSN 1983-0513, 2009

VIDAL L, ÁLVARO G, BENAIGES MD, CAMINAL G. **Influence of induction and operationmode on recombinant rhamnulose-phosphate aldolase production by *escherichia coli* using the t5 promoter.** J. BIOTECHNOL., 2005.

VINOT, C.; BOUCHEZ, P.; DURAND, P. **Extraction and purification of peptides from fish protein hydrolysates.** In: MYIACHI, S. et al. Currents Topics in Marine Biotechnology. Tokio: Fuji Technology Press, 1989.

VISHWANATHA, K.S.; RAO, A.G.A.; SINGH, S.A. **acid protease production by solid-state fermentation using *aspergillus oryzae* mtcc 5341: optimization of process parameters.** JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 2010.

VITOLO, M. **Industrial uses of enzymes.** BIOTECHNOLOGY, 2009.

WARD, O. P. Proteinases. In: FOGARTY, W. M. (Ed.). **Microbial enzymes and biotechnology.** London: Applied Science Publishers, p. 251-305, 1983.

WOOD T, PERETTI S. **Effect of chemically-induced, cloned-gene expression on protein synthesis in *e. Coli*.** BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 1991

ZANFONATO K. **Produção de poli (3-hidroxibutirato) por linhagens de *escherichia coli* dh5α e jm101 recombinantes.**[DISSERTAÇÃO].FLORIANÓPOLIS:UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA;2012.

APÊNDICES

Apêndice 1. Coleta e manutenção dos micro-organismos isolados utilizados no trabalho.

Código Atual	Método de Isolamento	Meio de Isolamento	Município	Local	Amostra	Espécie
LAMA 585	Enriquecimento seletivo	CM/CM+CMC	South Equatorial MAR Sector	Super Estação 2	sedimento	<i>Bacillus stratosphericus</i>
LAMA842	Isolamento direto	AM+Tween40	Walvis Ridge Sector	Geológica 1	sedimento	<i>Marinobacter excellens</i>
LAMA915	Isolamento direto	AMD	Rio Grande Rise	4	água+glicerol (2:1)	<i>Erythrobacter citreus</i>