REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

BIOPROSPECÇÃO DE GENES DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE TERRA PRETA DE ÍNDIO

BIOPROSPECTING FOR GENES OF INDUSTRIAL INTEREST FROM AN AMAZONIAN DARK EARTH METAGENOMIC LIBRARY

BIOPROSPECCIÓN DE GENES DE INTERÉS INDUSTRIAL A PARTIR DE UNA BIBLIOTECA METAGENÓMICA DE TIERRA NEGRA DE INDIO

Minerval de Oliveira Batalha Junior, Mestre
Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Brasil
mob.junior@hotmail.com https://orcid.org/0009-0007-8751-3210

Luciana Leomil, Doutora
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Centro de Ciências da Saúde, Brasil
leomil.luciana@gmail.com https://orcid.org/0000-0003-0784-6036

Roberto Amaro Bianco, Mestre
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Bosque da Ciência, Brasil
rbiancofilho@hotmail.com https://orcid.org/0000-0001-8357-8091

Carolinie Batista Nobre da Cruz, Mestre
Faculdade do Extremo Sul da Bahia, Brasil
carol_nobre24@yahoo.com.br https://orcid.org/0000-0001-5872-9927

Cecília Fonseca Carvalho, Doutora
Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira, Brasil
cecilia.carvalho.bio@gmail.com https://orcid.org/0009-0009-7017-4368

Paula Istvan, Doutora
Universidade Católica de Brasília – UCB, Brasil
paula.istvan@gmail.com https://orcid.org/0009-0005-5298-9142

Edson Junior do Carmo, Doutor
Universidade Federal do Amazonas – Divisão de Biotecnologia – UFAM, Brasil
edsonjuniorbio@yahoo.com.br https://orcid.org/0000-0002-2222-430X

Ricardo Henrique Kruger, Doutor
Universidade de Brasília – Instituto de Ciências Biológicas, Brasil
kruger@unb.br https://orcid.org/0000-0002-8443-9402

Elisabete José Vicente, Doutora
Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas, Brasil
bevicent@usp.br https://orcid.org/0000-0002-2171-8746.

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

José Odair Pereira, Doutor
Universidade do Amazonas – UEA, Brasil
joseodairpereira@yahoo.com.br https://orcid.org/0000-0002-0441-381X

Spartaco Astolfi-Filho, Doutor
Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Brasil
spartaco.biotec@gmail.com https://orcid.org/0000-0001-7246-6350

Resumo

Este estudo descreve a prospecção biotecnológica de enzimas hidrolíticas e genes envolvidos na biossíntese de biopolímeros a partir de uma biblioteca metagenômica construída com DNA ambiental (eDNA) extraído de terra preta de índio (TPI), um solo antropogênico da Amazônia reconhecido por sua elevada diversidade microbiana. A biblioteca foi construída utilizando como vetor o fosmídeo pCC1Fos e compreendeu aproximadamente 10.000 clones recombinantes independentes, totalizando cerca de 400 Mb de informação genética. A triagem funcional revelou 226 clones com atividades enzimáticas distintas, com predominância de atividades amilolíticas e de clones produtores de polihidroxialcanoatos (PHA), além de atividades lipolíticas, celulolíticas e xilanolíticas. A análise por bioinformática das sequências de DNA dos fosmídeos recombinantes de clones selecionados permitiu a identificação de genes com potencial aplicação industrial, incluindo lipases, esterases e amilases, apresentando diferentes níveis de similaridade com enzimas previamente descritas. Em conjunto, os resultados demonstram que a integração entre triagem funcional e sequenciamento de grandes fragmentos de DNA metagenômico constitui uma estratégia eficaz para a descoberta de genes de biocatalisadores com potencial biotecnológico, refletindo a vasta diversidade inerente aos solos de terra preta de índio.

Palavras-chave: Terra Preta de Índio; Hidrolases; Biblioteca Metagenômica; Triagem funcional.

Abstract

This study describes the bioprospecting of hydrolytic enzymes and genes involved in biopolymer biosynthesis from a metagenomic library constructed using environmental DNA (eDNA) extracted from Amazonian Dark Earth (ADE), an anthropogenic soil from the Amazon region renowned for its high microbial diversity. The library was constructed using the pCC1Fos fosmid vector and comprised approximately 10,000 independent recombinant clones, totaling around 400 Mb of genetic information. Functional screening revealed 226 clones with distinct enzymatic activities, predominantly featuring amylolytic activities and polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing clones, alongside lipolytic, cellulolytic, and xylanolytic activities. Bioinformatics analysis of the DNA sequences from the recombinant fosmids of selected clones allowed for the identification of genes with potential industrial applications, including lipases, esterases, and amylases, which exhibited varying levels of similarity to previously described enzymes. Taken together, these results demonstrate that integrating functional screening with sequencing of large metagenomic DNA fragments constitutes an effective strategy for discovering biocatalyst genes with biotechnological potential, reflecting the vast diversity inherent to Amazonian Dark Earth soils.

Keywords: Amazonian Dark Earth; Hydrolases; Metagenomic Library; Functional Screening.

Resumen

Este estudio describe la bioprospección de enzimas hidrolíticas y genes involucrados en la biosíntesis de biopolímeros a partir de una biblioteca metagenómica construida con ADN ambiental (eDNA)

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

extraído de Tierra Negra de Indio (TPI), un suelo antropogénico de la Amazonía reconocido por su elevada diversidad microbiana. La biblioteca se construyó utilizando el vector de fósmido pCC1Fos y comprendió aproximadamente 10.000 clones recombinantes independientes, sumando cerca de 400 Mb de información genética. El cribado funcional reveló 226 clones con actividades enzimáticas distintas, con predominancia de actividades amilolíticas y de clones productores de polihidroxialcanoatos (PHA), además de actividades lipolíticas, celulolíticas y xilanolíticas. El análisis bioinformático de las secuencias de ADN de los fósmidos recombinantes de clones seleccionados permitió la identificación de genes con potencial aplicación industrial, incluyendo lipasas, esterasas y amilasas, los cuales presentaron diferentes niveles de similitud con enzimas previamente descritas. En conjunto, los resultados demuestran que la integración entre el cribado funcional y el secuenciamiento de grandes fragmentos de ADN metagenómico constituye una estrategia eficaz para el descubrimiento de genes de **biocatalizadores** con potencial biotecnológico, reflejando la vasta diversidad inherente a los suelos de Tierra Negra de Indio.

Palabras clave: Tierra negra de indio; Hidrolasas; Biblioteca metagenómica; Tamizaje funcional.

1. Introdução

A substituição de processos químicos tradicionais por rotas biológicas depende diretamente do isolamento de novos biocatalisadores e biomoléculas funcionais. Setores como a indústria de alimentos, a produção de biocombustíveis e a síntese farmacêutica enfrentam gargalos técnicos que exigem enzimas com perfis diferenciados de termoestabilidade, tolerância a solventes e estabilidade em pHs extremos (Sharma *et al*., 2023; Pabbathi *et al*., 2023). Historicamente, a microbiologia clássica dependeu do isolamento em placas de cultivo para abastecer essas cadeias; no entanto, sabe-se que mais de 99% da microbiota ambiental não forma colônias sob condições convencionais de laboratório (Torsvik *et al*., 1990; Katz *et al*., 2016).

Essa limitação impulsionou a consolidação da metagenômica como ferramenta primária de prospecção. Ao contornar a dependência do cultivo puro por meio da extração direta do DNA ambiental (eDNA), a abordagem permite acessar tanto sequências genômicas inéditas quanto proteínas biologicamente ativas (Alam *et al*., 2021; Mirete *et al*., 2025). Entre os ecossistemas edáficos tropicais, a Terra Preta de Índio (TPI) na bacia amazônica destaca-se como um modelo peculiar. Trata-se de um horizonte arqueológico de solo caracterizado pela deposição pré-colombiana cumulativa de biochar, carvão vegetal, cinzas, nutrientes minerais e restos orgânicos recalcitrantes (Moreira, 2007; Madari *et al*., 2009). Essa matriz

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

exerceu pressões seletivas prolongadas sobre a comunidade microbiana residente, favorecendo rotas metabólicas especializadas na reciclagem de polímeros e na produção de compostos bioativos com potencial biotecnológico expressivo (Brossi, 2012).

A mineração funcional desses solos requer, contudo, vetores capazes de manter insertos volumosos. Bibliotecas baseadas em plasmídeos pequenos frequentemente fragmentam operons e complexos multienzimáticos, ao passo que vetores como o fosmídeo acomodam insertos estáveis entre 35 e 45 kb. Essa capacidade é essencial quando se busca a clonagem de vias biossintéticas inteiras — como as responsáveis pela síntese de polímeros intracelulares — ou quando a atividade enzimática depende da integridade do promotor nativo e de domínios regulatórios adjacentes.

Nesse contexto, o presente estudo compila e integra sistematicamente os achados obtidos em pesquisas realizadas pelo Grupo de Biotecnologia Molecular da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e grupos colaboradores, em uma linha de pesquisa em metagenômica, ao longo de mais de uma década, a partir de uma biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio, reunindo dados empíricos de triagens fenotípicas primárias, análises cinéticas de enzimas purificadas, validações estruturais de polímeros e anotações genômicas completas de clones recombinantes (Leomil *et al*., 2007; Cruz, 2010; Bianco *et al*., 2011; Vicente *et al*., 2011; Carvalho, 2015; Batalha Junior, 2019; Vinces *et al*., 2024). Os resultados aqui apresentados derivam, em sua maioria, de dissertações de mestrado, teses de doutorado e comunicações em anais de congressos, conforme detalhado a seguir:

- A construção da biblioteca metagenômica de TPI foi descrita em resumo de congresso por Leomil *et al*., (2007);
- Os dados de triagem e caracterização de clones amilolíticos (clones P1C4, P6F1, P5C4 e P6C12) foram originalmente descritos em dissertação de mestrado por Cruz, (2010);
- A triagem de enzimas lipolíticas foi reportada inicialmente em resumo de congresso e em dissertação de mestrado por Bianco *et al.*, (2011);

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

- A caracterização funcional e estrutural da enzima Lip4 (clone Fos4) foi objeto da tese de Carvalho, (2015) e detalhes cinéticos e estruturais dessa nova enzima foram relatados por Vinces et al., (2024) e publicados no periódico BIOCHEMISTRY, v. 63, p. 1178-1193.
- A prospecção de clones produtores de PHA e a validação estrutural de PHB por FTIR e RMN foram relatadas em congresso por Vicente *et al*., (2011);
- A expressão de uma enzima β-glucuronidase em *E. coli* foi descrita em dissertação de mestrado por Batalha Junior, (2019).

2. Materiais e métodos

2.1 Coleta e preparo de amostras de solo TPI

As coletas de solo foram conduzidas em áreas de Terra Preta de Índio localizadas no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas, Brasil. As extrações foram realizadas na posição horizontal, utilizando tubos de PVC com 5 cm de diâmetro, previamente descontaminados com álcool 70%. A coleta do solo foi efetuada por meio da exposição de um perfil vertical (trincheira) no local da amostragem. Uma régua graduada foi posicionada para marcação das profundidades, e amostras foram obtidas a cada 10 cm, de 0 a 50 cm de profundidade. Foram retiradas quatro amostras independentes por camada. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno e transportadas em caixas isotérmicas com gelo seco, visando à preservação das características físico-químicas e microbiológicas do solo. No laboratório, as amostras foram armazenadas a –20 °C até o processamento e posteriormente fracionadas em subamostras para extração de DNA ambiental (*e*DNA).

A caracterização físico-química detalhada desse horizonte específico não foi incorporada a este trabalho. Essa delimitação metodológica fundamentou-se no fato de que os atributos edáficos gerais da área amostrada — caracterizados por acentuada fertilidade, elevados teores de carbono pirogênico estável (*biochar*), fósforo disponível e expressiva capacidade de troca catiônica — já foram exaustivamente descritos em levantamentos edafológicos prévios e paralelos da

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

mesma região (Madari *et al.*, 2009; Moreira, 2007). Diante desse histórico consolidado, o presente estudo delimitou seu escopo analítico estritamente à qualidade do DNA metagenômico recuperado, à triagem fenotípica dos clones fosmidiais e à elucidação genômica das hidrolases identificadas.

Em atendimento ao disposto na LEI nº. 13.123/2015 e seus regulamentos, no que se refere ao acesso patrimônio genético, essa pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o número de cadastro A758150/2018.

2.2 Extração de *e*DNA

As amostras do solo da TPI foram misturadas, homogeneizadas, peneiradas e utilizadas para isolamento de *e*DNA. A 25 g dessa mistura, adicionaram-se 50 mL de tampão A (Tris-HCl 50mM, EDTA 50mM, 1 µg/mL de lisozima), procedendo-se à incubação a 37º C por 30 min. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 2000 x g por 15 min, com posterior coleta do sobrenadante. Após a adição do SDS a 1% ao sobrenadante o DNA foi extraído utilizando o protocolo clássico de extrações com solventes orgânicos, iniciando com extração com 1V CLOROFIL (clorofórmio: álcool isoamilico :: 24:1), seguido de uma segunda extração com 1V CLOROFANE (fenol: clorofórmio: álcool isoamilico ::25: 24: 1). Adicionou- se à fase aquosa 0,3M de NaCl e 2,5 V de álcool 100%, misturou-se bem e centrifugou-se por 5.000 g por 1 h a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70% e em seguida seco e redissolvido em Tampão R (Tris- HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). O *e*DNA obtido foi purificado e analisado em gel de agarose a 1% sob campo pulsado (PFGE), apresentando integridade molecular satisfatória para clonagem de grandes fragmentos.

2.3 Construção da biblioteca metagenômica de grandes fragmentos

A biblioteca metagenômica de grandes fragmentos foi construída a partir do DNA ambiental de solo de Terra Preta de Índio extraído como descrito no item anterior. Para construção da biblioteca, moléculas de tamanho entre 40 e 45 Kb foram purificadas por eletroforese de campo pulsado em gel (PFGE), conforme descrito por Schwartz, Cantor, (1984). A clonagem molecular dos fragmentos no

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

fosmídeo pCC1Fos foi realizada utilizando-se o kit comercial "*Copy Control*™ *Fosmid Library Production"* (EPICENTRE Biotechnologies), conforme instruções do fabricante. Os fosmídeos recombinantes foram introduzidos em células de *E. coli* EPI300 por infecção após serem empacotados por proteínas da capsula do fago lambda, então plaqueadas em meio LB (1% Triptona, 0.5% extrato de levedura, e 1% NaCl) suplementado com cloranfenicol 20 µg/mL. Obteve-se cerca de 10.000 clones independentes, consistindo estes na biblioteca primária. Esses clones foram raspados e ressuspendido em meio LB, a suspensão bem homogeneizada e misturada vagarosamente com glicerol 100% estéril. Essa suspensão, denominada biblioteca secundária, foi fracionada em alíquotas de 1mL e estocada a -80ºC para os experimentos subsequentes de triagem.

A referida biblioteca foi validada por três diferentes procedimentos: análise de restrição dos fosmídeos recombinantes, rastreio de diferentes atividades enzimáticas e sequenciamento de fosmídeos recombinantes.

2.4 Extração do DNA fosmidial de clones recombinantes

A partir das placas contendo as células transfectadas, clones recombinantes selecionados aleatoriamente foram inoculados individualmente em 5 mL de meio LB líquido com cloranfenicol (12,5 µg/mL) e levados a uma estufa com agitação de 150 rpm por 18 horas a 37˚C. Após o crescimento das colônias bacterianas, estas foram submetidas a uma indução de crescimento, no qual 1 mL do material crescido foi adicionado a 10 mL de meio LB líquido já induzido com 2 µL de "*Copy Control Induction Solution*" (EPICENTRE®), e levados ao agitador a 150 rpm, 37˚C por 5 horas. Em seguida, o DNA fosmidial de clones individuais foi obtido pelo método de lise alcalina descrita por Sambrook, *et al*., (1989), utilizando o kit *illustra plasmidPrep Mini Spin* (GEHealthcare). Primeiramente, todo o volume da cultura crescida foi centrifugado em microtubos de 2,0 mL a 12.000 g por 3 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido com as soluções do descritas no kit, conforme as informações do fabricante, no final foi realizada uma precipitação com 1:10 de KOAc 3 M (pH 5,3) e um volume de isopropanol gelado, deixando por 15 minutos no gelo, e em seguida centrifugou-se por 15 minutos a

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

12.000 g, a fim de sedimentar o DNA plasmidial. Ao término deste processo, o sedimento foi lavado 3 vezes com etanol 70 % a temperatura ambiente, seguidas de centrifugação por 3 minutos a 12.000 g com descartes dos sobrenadantes. O material ficou secando em temperatura ambiente durante 30 min e o DNA fosmidial foi ressuspendido em 50 µL de H_2O Milli-Q estéril, sendo as amostras armazenadas a -20˚C.

2.5 Digestão com a enzima de restrição *Not*I

O DNA dos clones escolhidos ao acaso e extraídos foram analisados pelo seu perfil de restrição. A digestão foi realizada com a enzima *Not*I (BIOLABS) que possui dois sítios de corte dentro do vetor (2, 643) muito próximos da região de inserção do DNA metagenômico. A reação foi realizada em tubos de 1,5 mL, no qual foi adicionado 200 ng do DNA fosmidial (5 µL), 1 µL de “NE Buffer 3” 10X (BIOLABS), 1 µL de BSA e 1 µL da enzima de restrição *Not*I (10 U/µL), completando o volume final com H_20 Milli-Q para 10 µL. O material foi incubado a 37˚C por 5 horas. O tamanho médio dos insertos foi validado por digestão de clones aleatórios com a endonuclease *Not*I e análise por PFGE (CHEF DRIII, BIO-RAD®) a 6 V por 14 horas, revelando fragmentos variando de 24.000 a 46.200 pb (tamanho médio de ~40 kb), perfazendo um tamanho de biblioteca de aproximadamente 400 Mb de *e*DNA.

2.6 Rastreio Funcional

A triagem funcional foi executada em placas de Petri contendo ágar Luria-Bertani (LB) suplementado com cloranfenicol (12 µg/mL) e substratos específicos; para cada ensaio de triagem, foram plaqueadas cerca de 20.000 clones recombinantes da biblioteca secundária.

- Atividade Amilolítica: Ágar LB + 1% de amido solúvel, revelado com vapor de iodo.
- Atividade Lipolítica: Ágar LB + 0,5% de tributirina emulsificada com 5% de goma arábica.
- Atividade Celulolítica: Ágar LB + 0,5% de carboximetilcelulose (CMC), revelado com *Congo Red* (0,1%) e descorado com NaCl 1 M.

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

- Atividade Xilanolítica: Ágar LB + 0,5% de xilana *oat-spelt*, revelado com *Congo Red* (0,1%).

A positividade primária foi definida pela formação visível de halos de hidrólise ao redor das colônias (Hankin, Anagnostakis, 1977). Todos os clones positivos detectados em um primeiro rastreio foram re-isolados e submetidos a retestes em triplicata (confirmação fenotípica). O controle negativo consistia na linhagem *E. coli* EPI300 transformada com o vetor pCC1Fos original não recombinante.

O rastreio para a biossíntese dos clones produtores de PHA foi realizada em placas contendo meio mínimo sólido Ramsay 5 (Ramsay *et al*., 1990) suplementação de tiamina (10 mg/L), leucina (18 mg/L), α-arabinose 1%, 1% glicerol como fonte de carbono, acrescido de *Nile Red* (Spiekermann *et al.*, 1999). As colônias foram expostas à luz ultravioleta (254 nm), para a identificação dos clones que emitem fluorescência, indicativo da presença de PHA. As colônias pré-selecionadas no teste com *Nile Red* foram transferidas para meio sólido e após o cultivo foram submetidas à coloração com *Sudan Black* B 0,02% (Schlegel *et al*., 1970), por 15 minutos, e em seguida descoradas com etanol 96%, por 5 minutos e visualizadas.

2.7 Isolamento e sequenciamento dos fosmídeos selecionados

Os clones com resultados positivos no rastreio funcional foram cultivados em meio LB caldo com 1x de *Copy Control Induction Solution* (Epicentre®) para induzir o estado de multicópias. Foi obtido DNA fosmidial de clones individuais através do processo de lise alcalina, usando o kit conforme descrito no item 2.4. Os fosmídeos escolhidos foram submetidos à análise por sequenciamento, empregando uma abordagem combinada das tecnologias 454-pirosequenciamento (plataforma 454 Roche® FLX) e Sanger (MegaBACE 1000).

2.8 Processamento e análise das sequências

O processamento dos dados brutos de sequenciamento de DNA foi conduzido por meio do *pipeline* de bioinformática HARPIA, disponível na plataforma da

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Esta etapa inicial consistia em programas para análise de qualidade da sequência Phred (qualidade ≥20) para montagem dos contigs - Phrap; além da remoção sistemática de sequências contaminantes provenientes do vetor de clonagem pCC1Fos.

As regiões codificantes ORFs foram localizadas pelo programa *Open Reading Frame Finder* (NCBI), comparadas e anotadas por meio da ferramenta BLAST junto às sequências disponíveis em bases de dados públicas como o NCBI, Kyoto *Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB) e *Transporter Classification Database*. Para a prospecção de homólogos, empregaram-se os algoritmos BLASTN e BLASTX; o primeiro foi utilizado para a identificação de similaridades em nível de nucleotídeos, enquanto o segundo permitiu a inferência de proteínas funcionais através da tradução conceitual das sequências de DNA e posterior comparação com o banco de dados de aminoácidos.

3. Resultados e Discussão

3.1. Construção da biblioteca metagenômica de TPI

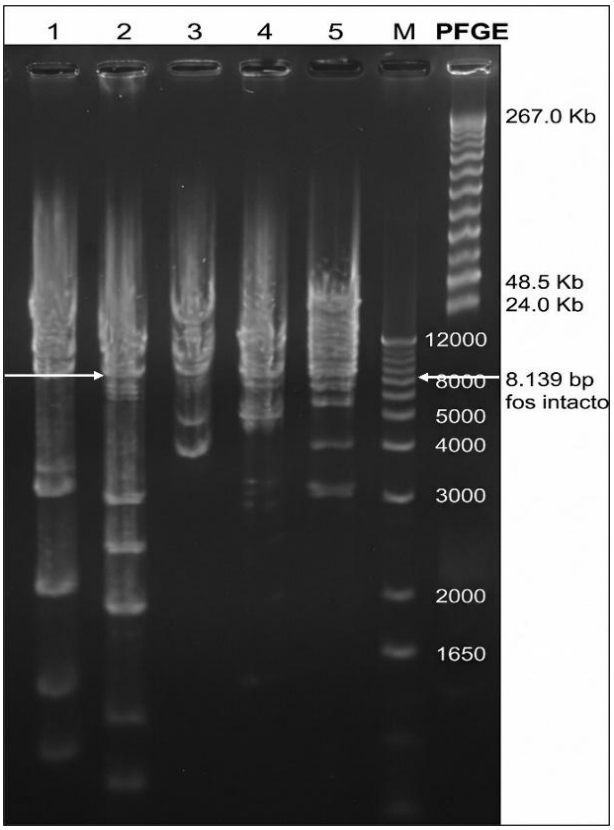
A bioprospecção de enzimas e proteínas a partir de microrganismos do solo representa uma vertente estratégica tanto para a ciência básica quanto para a inovação biotecnológica, permitindo a identificação de genes com potencial de aplicação industrial. A construção da biblioteca metagenômica de TPI, resultou em aproximadamente 10.000 clones independentes que abrangem cerca de 400 Mb de DNA ambiental. Conforme pode se observar na figura 1 em todos os clones analisados existem fragmentos de *Not*I maiores que o vetor pCC1Fos (8.139 pb) e menores, indicando que os insertos clonados são grandes o que está de acordo com o tamanho dos fragmentos utilizados na construção da biblioteca metagenômica.

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

Figura 1 – Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) de campo pulsado de fragmentos de restrição dos fosmídeos recombinantes (1 a 5) digeridos com enzima *Not*I; 6 e 7 marcadores moleculares 1kb e PFGE 267kb.



Fonte: Leomil *et al*., 2007

O emprego da enzima de restrição *Not*I permitiu a individualização dos componentes moleculares dos clones. A seta branca na figura 1 destaca uma banda de 8.139 pb, que corresponde ao vetor de clonagem pCC1Fos. As colunas 1 a 5 exibem perfis de bandas distintos, o que comprova que a biblioteca é composta por insertos diferentes clonados. A variação no número de bandas indica que alguns clones possuem uma frequência maior de sítios de restrição para *Not*I do que outros. O uso concomitante do marcador molecular *1kb plus* (coluna 6) e do marcador de eletroforese em gel de campo pulsado (coluna 7) permitiu estimar o tamanho dos grandes fragmentos de DNA metagenômico.

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

A seleção de uma faixa de tamanho elevada para os insertos (acima de 35 kb) é um fator crítico para o sucesso da metagenômica funcional. Fragmentos desse porte aumentam significativamente a probabilidade de capturar operons completos — unidades genéticas que contêm todos os genes necessários para uma via metabólica íntegra.

3.2. Rastreio funcional de clones produtores de enzimas hidrolíticas e de polihidroxialcanoatos.

Alíquotas da biblioteca metagenômica secundária foram diluídas e plaqueadas em meios sólidos diferenciais para a detecção das atividades biológicas de interesse. A triagem funcional primária revelou 226 clones com formação nítida de halo de hidrólise, sugerindo atividade enzimática extracelular. Desse total de hidrolases candidatas, 191 demonstraram ação amilolítica, 17 lipolítica, 13 celulolítica e 5 xilanolítica, somando-se ainda 135 clones pré-selecionados para o acúmulo de PHA. A compilação dos clones candidatos detectados no rastreio inicial e aqueles efetivamente confirmados após os ensaios de reteste está detalhada na Tabela 1.

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

Tabela 1. Números de clones recombinantes detectados a partir de ensaio e reteste específico.

Função	Substrato	Nº Clones candidatos (teste)	Nº Clones confirmados (reteste)	Tipo de ensaio
Amilase	Amido 1%	191	118	Em meio sólido
Esterase/Lipase	Tributirina 0,5%	17	13	Em meio sólido
Celulase	CMC 0,5%	13	0	Em meio sólido
Xilanase	Xilana 0,5%	5	1	Em meio sólido
Biossíntese de PHA	Nile Red 0,02%	135	2	Em meio sólido

A comparação entre a triagem primária e o reteste fenotípico revela uma perda expressiva de clones ao longo do processo. Enquanto as atividades amilolítica (118 confirmados de 191) e lipolítica (13 de 17) mantiveram boa reprodutibilidade em placa (Bianco *et al*., 2011; Cruz, 2010), a recuperação de hidrolases para biomassa vegetal foi mínima: apenas um clone xilanolítico e nenhum celulolítico permaneceram ativos após o repique (Piccinni *et al*., 2016). Essa diferença decorre da própria natureza dos substratos. A quebra de polímeros recalcitrantes costuma exigir a ação integrada de várias enzimas que dificilmente estão reunidas em um único fragmento de fosmídeo (HUA *et al*., 2022). Além disso, a expressão heteróloga em *E. coli* esbarra no viés de códons, no não reconhecimento de promotores do solo e na incapacidade da célula de secretar essas proteínas para o meio (ALVES *et al*., 2020; PELLIZZA *et al*., 2018; PUNDE *et al*., 2019). O mesmo afunilamento ocorreu com os polihidroxialcanoatos, em que 135 colônias positivas com *Nile Red* resultaram em apenas dois clones confirmados por RMN (Vicente *et al*., 2011). Essa variação

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

confirma que o *Nile Red* se liga de forma inespecífica a lipídios da membrana bacteriana (Spiekermann *et al*., 1999), tornando a análise por RMN de ^{1}H e ^{13}C indispensável para comprovar a síntese efetiva do polímero (Silverstein, Webster, 1996).

3.2.1. Rastreio funcional de enzimas amilolíticas

A amilolise foi avaliada na biblioteca metagenômica secundária em meio sólido LB contendo 0,5% a 1% de amido solúvel, acrescido de cloranfenicol (12 µg/mL), com revelação subsequente por exposição a vapores de iodo. A triagem de atividade amilolítica foi originalmente conduzida por Cruz, (2010) que inclui 191 clones candidatos positivos em aproximadamente 20.000 colônias plaqueadas a partir da biblioteca secundária. Dentre esses, quatro clones (P1C4, P6F1, P5C4 e P6C12) foram selecionados para caracterização específica e atividades dextrinizantes de 4,30; 3,64; 2,87 e 3,23 U/mL respectivamente, após 24 h de indução causada por arabinose. Estes valores são reproduzidos aqui com autorização do autor e dados específicos publicados anteriormente em dissertação de mestrado (Cruz, 2010).

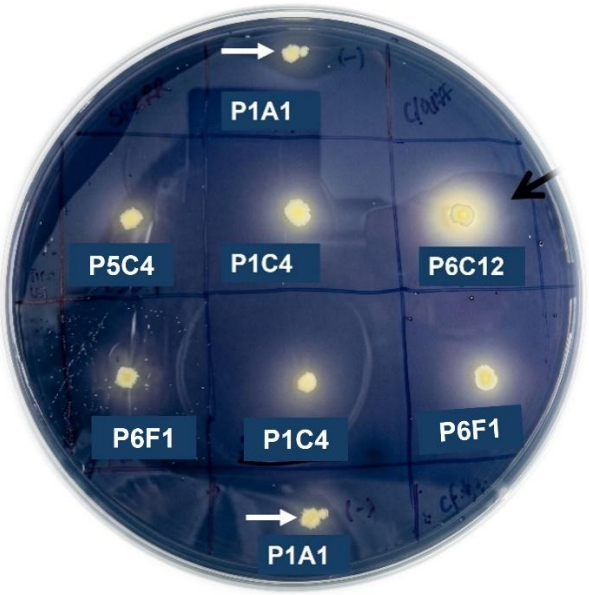
Para a confirmação fenotípica e determinação do índice de amilolise (I_a, - razão entre o diâmetro médio do halo e o diâmetro médio da colônia), clones representativos foram retestados individualmente em placas subdivididas. O reteste confirmou a capacidade amilolítica de 118 clones na biblioteca estocada. Entre os clones selecionados para continuidade dos estudos, quatro demonstraram formação consistente de halo: P1C4 (I_a =2,16; halo de 6,5 mm), P6F1 (I_a =2,33; halo de 7,0 mm), P5C4 (I_a =2,33; halo de 7,0 mm) e P6C12 (I_a =4,66; halo de 14,0 mm) (Figura 2).

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

Figura 2. Confirmação de colônias recombinantes amilolíticas cultivadas em meio sólido contendo amido 1%, coradas com vapor de iodo após incubação a 37 °C. As setas brancas indicam os controles negativos enquanto a seta preta indica o clone P6C12 que apresentou maior halo de hidrólise.



Fonte: Cruz, 2010

A seta preta destaca o clone P6C12, que apresentou o maior halo de hidrólise (14,0 mm de diâmetro total; 3,0 mm de halo límpido isolado). Os controles negativos foram inoculados nas mesmas condições dos clones testados, mas como não possuem genes de amilases não formaram halo de hidrólise após a revelação com iodo, indicando que os halos de degradação do amido observados nos clones positivos foram devido a expressão de genes de amilases presentes nos insertos metagenômicos.

Para avaliar a expressão extracelular em meio líquido, os quatro clones selecionados (P1C4, P6F1, P5C4 e P6C12) foram cultivados em caldo LB acrescido de amido 0,5% e cloranfenicol (12 µg/mL), na presença e ausência de L-arabinose (0,2 mg/mL ou 0,02%), indutor que ativa a replicação de alto número de cópias do vetor pCC1Fos via gene *trfA* no hospedeiro *E. coli* EPI300. A indução por arabinose aumentou significativamente a secreção enzimática em todos os clones (elevação de 32,8% a 41,2% na atividade dextrinizante e de 62% a 82,3% na atividade sacarificante após 24 h). A determinação da atividade enzimática dextrinizante foi realizada segundo o método descrito por Fuwa (1954), enquanto a sacarificante

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

seguiu o método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata.

Os resultados quantitativos obtidos no extrato enzimático bruto após 24 horas de fermentação induzida (medidos a 40 °C por método de Fuwa / DNS) foram:

- Controles (EPI300 / P1A1): 0,08 U/mL (inativo).
- Clone P1C4: 4,30 U/mL (dextrinizante) e 3,89 U/mL (sacarificante);
- Clone P6F1: 3,64 U/mL (dextrinizante) e 2,97 U/mL (sacarificante);
- Clone P5C4: 2,87 U/mL (dextrinizante) e 4,15 U/mL (sacarificante);
- Clone P6C12: 3,23 U/mL (dextrinizante) e 4,66 U/mL (sacarificante);

Observou-se uma divergência entre a magnitude do halo em placa e o rendimento em meio líquido: embora o clone P6C12 tenha apresentado o maior halo em meio sólido (14,0 mm), o clone P1C4 exibiu a maior atividade de secreção dextrinizante em meio líquido (4,30 U/mL a 4,66 U/mL). Essa ausência de correlação direta entre ensaios qualitativos e quantitativos é documentada na literatura (Bhaskar *et al*., 2007), pois a formação do halo em ágar depende não apenas do nível de síntese/secreção proteica, mas da capacidade da enzima de se difundir através da matriz do polímero. Os níveis de expressão absoluta dos clones metagenômicos são inferiores aos de cepas nativas isoladas do solo (como *Bacillus* sp.), o que é esperado em sistemas heterólogos devido ao viés de códons e barreiras de secreção na membrana de *E. coli* (Punde *et al*., 2019).

A caracterização parcial das amilases presentes no extrato bruto revelou temperaturas ótimas de atuação entre 60 °C e 80 °C e pH ótimo de neutro a levemente alcalino (pH 6,0 a 7,5). O clone P1C4 destacou-se pela atividade máxima a 70 °C (6,93 U/mL), enquanto os clones P5C4 e P6C12 demonstraram elevadas taxas de termoestabilidade, mantendo até 95% da atividade após 90 minutos de incubação a 60 °C e suportando exposição a 80 °C.

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

Para identificar a base molecular do fenótipo, o DNA fosmidial dos clones foi extraído e submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos para genes de α-amilases bacterianas conhecidas (*amyIN* de *Bacillus licheniformis* e *amyE* de *Bacillus subtilis*). Todos os quatro clones amilolíticos (P1C4, P6F1, P5C4 e P6C12) apresentaram amplificação positiva do fragmento de 1.540 pb correspondente ao gene *amyIN* (*B. licheniformis*), enquanto nenhum amplificou o gene *amyE* (*B. subtilis*).

Adicionalmente, o sequenciamento completo e a análise bioinformática do fosmídeo *FosXil* (grupo sequenciado em pool) identificaram uma ORF de 2.097 pb pertencente à Família GH13 das Glicosil Hidrolases com 65% de identidade sequencial com a α-amilase de *Nitrosococcus halophilus*. A presença de sequências com similaridade a *B. licheniformis* e *N. halophilus* nos fosmídeos confirma a presença de genes de α-amilases termoestáveis na microbiota não cultivada da TPI.

3.2.2. Rastreio funcional de enzimas lipolíticas

A prospecção funcional de biocatalisadores lipolíticos foi realizada a partir do plaqueamento de alíquotas da biblioteca secundária em meio LB ágar suplementado com cloranfenicol (12,5 µg/mL) e tributirina a 0,5% emulsificada com goma arábica. As placas, contendo em média 400 colônias por unidade, totalizaram aproximadamente 20.000 colônias rastreadas. Rastreio realizado por Bianco *et al*., (2011).

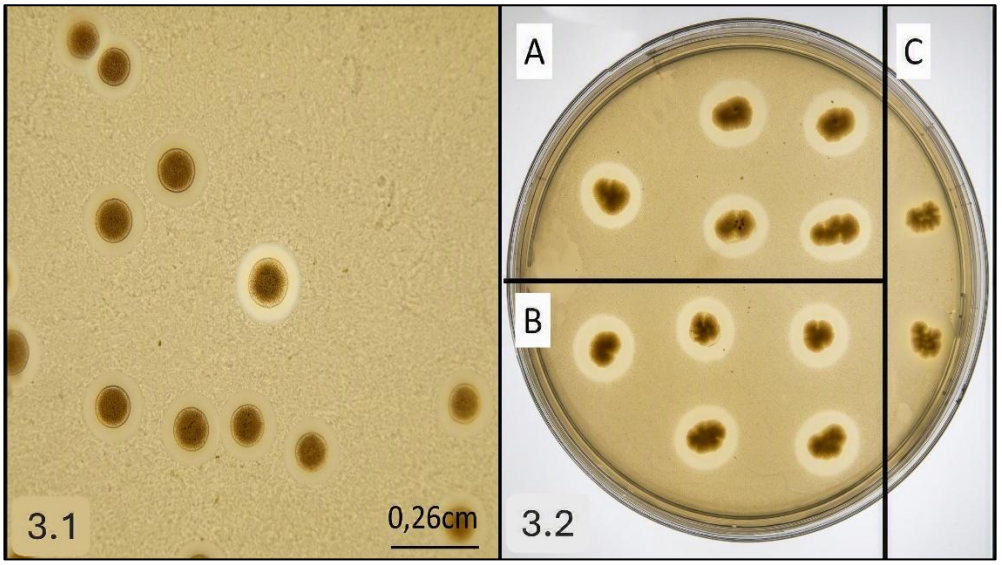
No rastreio, 13 colônias recombinantes apresentaram halos de hidrólise ao redor da massa celular após incubação a 37 °C por 16 horas (Figura 3.1). A confirmação fenotípica foi obtida em um segundo ensaio por meio do repique individual dos clones selecionados em meio idêntico (Figura 3.2, painéis A e B). Como controle negativo, utilizou-se a linhagem hospedeira *E. coli* EPI300 contendo o vetor pCC1Fos sem inserto, na qual não se observou formação de halo (Figura 3.2, painel C).

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

Figura 3. Confirmação de colônias recombinantes lipolíticas em meio LB ágar suplementado com tributirina a 0,5%, após incubação a 37 °C. Em 3.1 mostra uma imagem do rastreio inicial enquanto em 3.2 estão mostradas imagens da confirmação das atividades lipolíticas dos clones positivos: A e B mostram clones positivos enquanto C mostra clones controles negativos.



Fonte: Bianco *et al*., 2011

Para comprovar que a atividade hidrolítica observada decorria do DNA ambiental clonado e excluir a ocorrência de artefatos ou mutações no cromossomo do hospedeiro, os fosmídeos recombinantes foram extraídos e reintroduzidos por eletroporação em células competentes de *E. coli* EPI300. Todos os transformantes resistentes ao cloranfenicol recuperaram a capacidade de secretar a enzima e formar halos de lipólise em meio sólido, validando a origem metagenômica do fenótipo.

A frequência de recuperação de clones lipolíticos confirmados nesta biblioteca (~0,032 clones por Mb de *e*DNA clonado) é compatível com os índices reportados na literatura para a prospecção funcional de esterases e lipases em bibliotecas metagenômicas de solo, cujas taxas frequentemente permanecem abaixo de 0,1% (Araujo *et al*., 2020; Shi *et al*., 2013). A baixa incidência de fenótipos lipolíticos em sistemas heterólogos é frequentemente agravada por limitações do hospedeiro *E. coli*, como a incompatibilidade de sinais de promotores ambientais, o enovelamento incorreto de proteínas, o viés de uso de códons e a ineficiência nos mecanismos de secreção heteróloga (Punde *et al*., 2019; Pellizza *et al*., 2018). Além disso, a literatura alerta para a existência de atividades lipolíticas endógenas ou latentes na própria *E.*

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

coli, o que reforça a necessidade do uso rigoroso de controles não recombinantes e de validação por retransformação.

A análise por bioinformática das sequências dos fosmídeos selecionados (Tabela 1) permitiu identificar ORFs candidatas com similaridade a diferentes famílias de carboxilesterases e lipases. Cabe ressaltar que a anotação *in silico* baseada em similaridade de sequências indica potencial biocatalítico e provê alvos para engenharia de proteínas, mas não substitui a caracterização bioquímica. A atribuição de causalidade direta entre a sequência gênica e o fenótipo observado em placa exige etapas subsequentes de subclonagem, expressão individualizada e ensaios de cinético-estabilidade com a proteína purificada.

Essa abordagem integrada é ilustrada pela trajetória de pesquisa com o clone Fos4, inicialmente reportado por Carvalho, (2015) no qual o gene candidato *Lip4* foi subclonado e expresso como uma proteína solúvel e funcional. A carboxilesterase recombinante gerada (Lip4, 29,3 kDa, Família V.2) teve sua estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios-X e seu mecanismo catalítico confirmado por mutagênese sítio-dirigida no resíduo catalítico. Posteriormente, Vinces *et al*., (2024) consolidaram a caracterização dessa mesma enzima, formalmente denominada Ade1, avançando no mapeamento das dinâmicas regulatórias e alostéricas intrínsecas a esse biocatalisador monomérico. A convergência entre a caracterização física inicial de Lip4 (Carvalho, 2015) e os refinamentos estruturais e cinéticos de Ade1 (Vinces *et al*., 2024), confirma que os atributos biocatalíticos e de cooperatividade observados são propriedades funcionais inerentes a essa nova α/β-hidrolase metagenômica.

A prospecção de biocatalisadores lipolíticos a partir de metagenomas permanece uma estratégia relevante para a descoberta de enzimas com propriedades adaptadas a processos industriais. Recentemente, Jaito *et al*., (2023) utilizaram dados metagenômicos para identificar lipases bacterianas com similaridade estrutural à lipase B de *Candida antarctica* (CalB), recuperando uma variante capaz de manter

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

atividade catalítica superior à enzima comercial em condições extremas de temperatura (70 °C) e pH alcalino (pH 9,0).

A descoberta de esterases metagenômicas alcalófilas e termotolerantes encontra forte paralelo nos trabalhos de Shi *et al*., (2013) e Araujo *et al*., (2020). O gene *bioH* isolado por Shi *et al*., (2013), codifica uma carboxilesterase de 29 kDa (tamanho idêntico ao da Lip4) com atividade máxima em pH 8,0 e excepcional tolerância a altos teores de solventes orgânicos (como DMSO, metanol e etanol). De modo semelhante, a esterase *EstM* caracterizada por Araujo *et al*., (2020), exibiu pH ótimo alcalino (pH 8,5) e manteve atividade em presença de íons metálicos e solventes.

Assim como enfatizado por Shi *et al*., (2013) e Araujo *et al*., (2020), as carboxilesterases derivadas de metagenomas ambientais possuem propriedades estruturais singulares que atendem aos requisitos da química verde e da biocatálise industrial (como tolerância a pH alcalino, especificidade por acil-ésteres de cadeia curta e estabilidade térmica).

3.2.3 Rastreio funcional de clones produtores de celulases e xilanases

A triagem fenotípica primária para a degradação de polissacarídeos estruturais na biblioteca metagenômica secundária de TPI resultou inicialmente na detecção de 13 clones candidatos com atividade carboximetilcelulásica (CMC) e cinco clones com atividade sobre xilana *oat-spelt*. Contudo, após os procedimentos de repique individual e reteste para confirmação fenotípica, apenas um clone celulolítico preservou sua atividade de forma estável, enquanto nenhum dos cinco clones xilanolíticos manteve o fenótipo hidrolítico primário após a retransformação em *E. coli* EPI300.

Essa disparidade de resultados é fundamentada pela complexidade estrutural dos substratos. Enquanto o amido é um polímero de reserva de hidrólise relativamente simples, a degradação da celulose e da xilana exige sistemas multienzimáticos sinérgicos e complexos. Segundo Hua *et al*., (2022), a eficiência na

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

quebra de carboidratos estruturais, como observado em estudos de microrganismos ruminais, depende da co-expressão de múltiplas enzimas que raramente são capturadas em sua totalidade em um único fragmento de DNA metagenômico (como fosmídeos). Além disso, o trabalho de Piccinni *et al*., (2016) com a cepa *Cellulomonas sp*. B6 reforça que, embora o genoma possa conter um vasto arsenal de glicosil hidrolases para celulose e xilana, a expressão funcional dessas proteínas em hospedeiros como *E. coli* é frequentemente dificultada pela necessidade de mecanismos de secreção especializados e reguladores transcricionais específicos que o hospedeiro laboratorial não provê.

Portanto, a baixa incidência de halos para celulose e xilana na biblioteca de TPI não indica necessariamente a ausência dessas funções na microbiota dos solos amazônicos estudados, podendo ser devido a deficiências do processo de expressão/secreção heteróloga. Como destacado por Alves *et al*., (2020), a combinação de métodos dependentes e independentes de cultivo é essencial para superar essas subestimativas, garantindo que o potencial enzimático latente, oculto por falhas na maquinaria de tradução ou secreção do hospedeiro, possa ser eventualmente explorado por meio de síntese gênica e otimização de sistemas de expressão, inclusive utilizando células hospedeiras alternativas.

3.2.4. Rastreio funcional de clones produtores de PHA

A confirmação fenotípica de 135 clones capazes de sintetizar polihidroxialcanoatos em meio quimicamente definido Ramsay reforça o solo de TPI como um nicho edáfico moldado pela alternância de carbono e limitação de nutrientes. A indução fenotípica dessa via em bactérias ocorre tipicamente quando fontes de carbono solúveis (como o glicerol adicionado) coexistem com baixos teores de nitrogênio utilizável, estimulando o acúmulo intracelular de reservas energéticas lipofílicas (Ramsay *et al*., 1990; Cui *et al*., 2017).

Na figura 4 é observado o resultado positivo do rastreio funcional de clones recombinantes capazes de sintetizar PHA em meio Ramsay + glicerol e coradas com *Nile Red* (Vicente *et al*., 2011).

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

Figura 4. Colônias crescidas em meio sólido Ramsay+Glicerol coradas com *Nile Red* e submetidas à irradiação com luz UV de 254 nm. Na fração 1 está o controle negativo com clones não recombinantes (*E. coli* com pCC1Fos sem inserto) e nas frações 2 a 4 os clones recombinantes (*E. coli* com pCC1Fos+inserto) corados com *Nile Red*.



Fonte: Vicente *et al*., 2011

De acordo com dados obtidos por Vicente *et al*., (2011), a triagem primária realizada por *Nile Red* identificou 164 clones fluorescentes (~2% da biblioteca). A confirmação por Sudan Black B validou 135 clones. O *Nile Red* é um corante lipofílico altamente sensível que pode interagir de forma inespecífica com outros compostos hidrofóbicos de membrana, justificando a necessidade de reteste com Sudan Black B.

O afunilamento experimental entre a triagem inicial e a validação química estrutural está detalhado na Tabela 2.

Tabela 2. Subfluxo de seleção e validação dos clones produtores de PHA.

Etapa Experimental	Número de Clones	Critério e Método de Avaliação
Triagem Primária	164	Emissão de fluorescência sob luz UV (254 nm) em placas com *Nile Red*
Confirmação Fenotípica	135	Coloração positiva com Sudan Black B (0,02%) e descoramento com etanol
Análise por Citometria de Fluxo	33	Deslocamento do pico de intensidade de fluorescência (575–625 nm)

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

Extração e Purificação	16	Extração da biomassa seca liofilizada com diclorometano a 50 °C
Validação Estrutural	2	Confirmação da natureza do polímero (PHB) por FTIR e RMN ^{13}C e ^{1}H

Dentre os 16 clones selecionados para extração de polímero em cultivo de maior volume (500 mL), 2 clones produziram quantidades de polímero suficientes para validação físico-química. Os espectros de RMN de próton (^{1}H) exibiram o multipleto característico do próton carbinílico em 5,23 *ppm* (C3), o duplo dubleto dos prótons metilênicos em 2,46 e 2,61 *ppm* (C2) e o dubleto do grupo metila em 1,5 *ppm*, confirmando a síntese de poli-3-hidroxibutirato (PHB) (Silverstein, Webster, 1996).

Embora a redundância clonal esperada de uma biblioteca secundária amplificada explique parte da elevada positividade observada (~2% da triagem inicial), a prevalência de operons de PHA reflete a ecologia do próprio solo amazônico. Vias de condensação de *acil*-CoA mediadas por complexos como PhaCAB são amplamente distribuídas entre linhagens edáficas adaptadas a estresses sazonais e secas periódicas (Pollet, Avérous, 2011; Khatami *et al*., 2021). A recuperação de grânulos purificados e a determinação espectroscópica inequívoca dos sinais clássicos de poli-3-hidroxibutirato por RMN de ^{1}H e ^{13}C comprovam que hospedeiros heterólogos de *E. coli* foram capazes não apenas de expressar as enzimas-chave, mas de mobilizar substratos celulares para completar a polimerização funcional do bioplástico a partir de fragmentos metagenômicos brutos.

3.3. Análise via sequenciamento de fosmídeos recombinantes selecionados

Para identificar as ORFs responsáveis pelas atividades hidrolíticas, fosmídeos selecionados (FosLip2, FosLip3, FosAmy5 e a mistura FosXil) foram submetidos a sequenciamento combinado (454-pirosequenciamento e Sanger) e anotados no pipeline HARPIA / BLAST. A Tabela 3 apresenta os parâmetros bioinformáticos mínimos, o domínio conservado e o grau de compatibilidade entre a anotação e o fenótipo do clone.

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

Tabela 3: Análise *in silico*, Anotação funcional e grau de compatibilidade das ORFs com os fenótipos observados dos clones positivos.

Clone	Atividade do clone	ORF candidata anotada	Organismo / hit mais próximo	Comprimento (pb)	Identidade / Cobertura proteica	Domínio Conservado/ Família (CAZy)	Grau de Compatibilidade ORF – Fenótipo
FosLip2	Lipolítica	Lipase secretada	*Cupriavidus necator* / *Ralstonia eutropha*	1242	93% / 96%	Triacilglicerol lipase (EC 3.1.1.3)	Alta
FosLip3	Lipolítica	Carboxilesterase B (ORF 00017)	*Ktedonobacter racemifer*	1557	92,53% / 89%	Carboxilesterase (EC 3.1.1.1)	Alta
FosLip3	Lipolítica	Feruloil Esterase (ORF 00018)	*Xanthomonas campestris*	1587	95,14% / 92%	Esterase / Família CE1	Média
FosLip3	Lipolítica	Feruloil Esterase (ORF 00013)	*Caulobacter sp.*	1569	91% / 94%	Glicosil esterase (EC 3.1.1.73)	Média
FosLip3	Lipolítica	α-L-ramnosidase	*Streptomyces sp.*	2161	61% / 74%	Glicosil Hidrolase / GH78	Baixa
*FosLip4	Lipolítica	Esterase	*Pseudomonas sp. não cultivável*	2300	100/100*	B-cetoadipato enol-lactona hidrolase	Alta
FosAmy5 (Max104)	Amilolítica	*β*-glucuronidase / *β*-galactosidase	*Bacillus cellulosilyticus*	1626	48% / 81%	Glicosil Hidrolase / Família GH2	Baixa
FosXil (Mistura)	Xilanolítica	*α*-amilase	*Nitrosococcus halophilus*	2097	65% / 85%	Glicosil Hidrolase / Família GH13	Baixa

* FosLip4: Resultado de um BLASTP atualizado em 2026 que contrasta com o resultado obtido 11 anos atrás, descrito na tese de Carvalho, (2015) que mostrou 33% de identidade com lipase/esterase de Pseudomonas aeruginosa PAD01 (PDB ID: 3OM8).

A análise da Tabela 3 revela diferentes graus de concordância entre a anotação bioinformática e o fenótipo observado na triagem. No clone FosLip2, a identificação de uma ORF codificando uma triacilglicerol lipase (EC 3.1.1.3) com 93%

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

de identidade com *Cupriavidus necator* estabelece uma alta compatibilidade com o halo lipolítico detectado.

Por sua vez, o clone FosLip3 exibe um arranjo multifuncional contendo três ORFs com potencial esterásico/lipolítico (*Carboxilesterase B* e duas feruloil esterases) e uma ORF anotada como α-L-ramnosidase (Família GH78). A presença de uma carboxilesterase B (ORF 00017) explica diretamente a hidrólise de tributirina em placa. As feruloil esterases (ORFs 00018 e 00013) e a α-L-ramnosidase representam enzimas envolvidas na remoção de substituintes de lignina e hemicelulose. A co-ocorrência dessas ORFs no mesmo fragmento de ~35 kb indica a captura de um agrupamento gênico direcionado para a degradação de polímeros lignocelulósicos.

Para avançar além da inferência funcional, o gene candidato *Lip4* foi subclonado no vetor pET28a, expresso solúvel em *E. coli* BL21(DE3) RP e purificado por cromatografia de afinidade por níquel (Carvalho, 2015). A enzima Lip4, originalmente identificada a partir do clone fosmidial Fos4, foi descrita em detalhe por Carvalho, (2015). A proteína purificada apresentou massa de aproximadamente 29 kDa e foi definida como carboxilesterase da Família V.2. A estrutura tridimensional foi resolvida por cristalografia de raios-X a 2,3 Å de resolução, revelando dobramento do tipo α/β-hidrolase com a tríade catalítica *Ser94-Asp217-His245*. A relação causal entre a ORF Lip4 e o fenótipo esterásico foi confirmada por mutagênese sítio-dirigida, com abolição completa da atividade nos mutantes Lip4S94A e Lip4S94C (Carvalho, 2015).

Em relação ao gene *Lip*4 e amilase P6C12 foi possível subclonar e expressar as enzimas codificadas, mostrando que o rastreio funcional possibilitou identificar os genes a partir da biblioteca metagenômica. Por outro lado, para outras atividades detectadas no rastreio não foi possível, até o momento identificar, os genes inequivocamente a partir do sequenciamento dos respectivos fosmídeos (genes putativos), nesse caso há necessidade de realizar estudos adicionais como PCR, subclonagem dos genes, expressão dos genes, análises dos produtos para a confirmação de suas funções.

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

A partir do sequenciamento do fosmídeo FosAmy5 de um clone recombinante capaz de produzir halo de amilolise, não foi possível identificar nele sequência similar a genes de amilases descritos, entretanto identificou-se um gene com similaridade de 48% com o gene de *β*-glucuronidase/galactosidase com *Bacillus cellulosilyticus*.

A identificação e a recuperação do gene codificante da *β*-glucuronidase (GUSB) a partir do clone fosmidial FosAmy5 (Maxi 104) consolidam a eficácia da abordagem metagenômica na mineração de enzimas hidrolíticas em solos antropogênicos de TPI. O fragmento gênico nativo de 1.626 pb, característico da família GH2 das glicosil hidrolases, foi inicialmente clonado no vetor pGEM-T e subsequentemente subclonado no vetor pET-28a (+) (Batalha Júnior, 2019). Contudo, a expressão heteróloga da sequência ambiental nativa em *E. coli* BL21(DE3) pLysS resultou em níveis proteicos basais e insuficientes (61 kDa), dificultando as etapas de purificação.

Para contornar essa restrição, sintetizou-se o gene de 1.666 pb da enzima por síntese química com códons preferenciais para *E. coli,* mantendo 100% de identidade na sequência de aminoácidos e inserindo-o no vetor de alto número de copias pDMU02 sob o controle do promotor sintético DM (Moreira, 2023). A indução em *E. coli* JM110 com 0,5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), promoveu uma superexpressão da enzima recombinante (61 kDa em SDS-PAGE a 12%). No entanto, a proteína foi produzida predominantemente na fração insolúvel, formando corpos de inclusão mesmo sob indução por IPTG e temperatura reduzida a 25 °C. Esforços estão sendo realizados para dissolução dos corpúsculos de inclusão e “refolding” para obtenção da enzima ativa visando sua caracterização físico-química e cinética.

4. Conclusão

O conjunto de resultados/dados obtidos pelo Grupo de Biotecnologia Molecular da UFAM corrobora que, a associação entre triagem funcional e prospecção *in silico* em bibliotecas metagenômicas de grandes insertos, constitui uma estratégia robusta para a identificação de genes de enzimas e de vias

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

metabólicas de interesse biotecnológico em solos de Terra Preta de Índio (TPI). A análise das sequências de DNA dos clones fosmidiais revelou quadros abertos de leitura (ORFs) com identidade de sequências com genes de biocatalisadores de relevância industrial, incluindo esterases, lipases, feruloil esterases, amilases e β-glucuronidase, além de rotas associadas ao metabolismo de biopolímeros. Essa diversidade de genes e fenótipos prospectados reforçam o pressuposto de que esses solos antropogênicos da Amazônia contém uma rica biodiversidade microbiana.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, CAPES, FAPEAM, FINEP pelo incentivo e apoio financeiro.

Referências

ALAM, K.; ABBASI, M. N.; HAO, J.; ZHANG, Y. et al. Strategies for natural products discovery from uncultured microorganisms. **Molecules**, Basel, v. 26, n. 10, p. 2977, 17 maio 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules26102977.

ALVES, K. J.; DA SILVA, M. C. P.; COTTA, S. R. et al. Mangrove soil as a source for novel xylanase and amylase as determined by cultivation-dependent and cultivation-independent methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 51, n. 4, p. 1599-1610, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s42770-020-00331-5.

ARAUJO, F.J.; HISSA, D.C.; SILVA, G.O. et al. A novel bacterial carboxylesterase identified in a metagenome derived-clone from Brazilian mangrove sediments. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 47, n. 5, p. 3919-3928, maio 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s11033-020-05484-6.

BARROS, E. V.; BATAUS, L. A.; VALÊNCIA, F. F. et al. A novel cloning system for direct screening using a suicidal strategy. **Gene**. 1996 Nov 14;179(2):287-9. DOI: https://doi.org/10.1016/s0378-1119(96)00374-5.

BATALHA JUNIOR, M. O. **Clonagem e Expressão da enzima β-glucuronidase obtida de uma Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio**. 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

BHASKAR, N. *et al.* Amylase-producing ability of bacterial isolates from marine and terrestrial sources: a comparative evaluation of solid vs. liquid media. **Bioresource**

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

Technology, Oxford, v. 98, n. 14, p. 2758-2761, out. 2007. DOI 10.1016/j.biortech.2006.09.028.

BIANCO, R. A., VICENTE, E. J., ASTOLFI-FILHO, S. et al. Rastreio de enzimas lipolíticas em biblioteca metagenômica de solo da Amazônia. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais** [...]. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011. p. 2.

BROSSI, M. J. L. **Diversidade de genes catabólicos em solos de "Terra Preta de Índio" da Amazônia sob diferentes coberturas vegetais**. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 164 f. 2012.

CARVALHO, C. F. **Caracterização funcional e estrutural de uma enzima lipolítica encontrada na biblioteca metagenômica de solo de Terra Preta de Índio.** 2015. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-11122015-071347/. Acesso em: 20 jun. 2024.

CRUZ, C. B. N. **Seleção dos clones produtores de amilases e proteases presentes na biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio**. 2010. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010. Disponível em: ufam.edu.br. Acesso em: 16 set. 2025.

CUI, Y. W.; SHI, Y. P.; GONG, X. Y. Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. **RSC Advances**, Cambridge, v. 7, n. 31, p. 18953-18961, 2017. DOI: https://doi.org/10.1039/c7ra02131c.

DICENZO, G. C.; FINAN, T. M. The divided bacterial genome: structure, function, and evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 81, n. 3, art. e00019-17, 9 ago. 2017. DOI: https://doi.org/10.1128/mmbr.00019-17.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 41, n. 5, p. 583-603, 1954. DOI: https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126476.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. "Solid media containing CMC to detect CM Cellulase activity of microorganisms," **Journal of General Microbiology,** 1977, 98, 1, pp. 109-115. DOI: https://doi.org/10.1099/00221287-98-1-109.

HUA, D.; HENDRIKS, W. H.; XIONG, B.; PELLIKAAN, W. F. Starch and cellulose degradation in the rumen and applications of metagenomics on ruminal microorganisms. **Animals**, Basel, v. 12, n. 22, art. 3098, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/ani12223098.

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

JAITO, N.; KAEWSAWAT, N.; PHETLUM, S. et al. Metagenomic discovery of lipases with predicted structural similarity to Candida antarctica lipase B. **PLoS One**. 2023 Dec 6;18(12):e0295397. doi: 10.1371/journal.pone.0295397. PMID: 38055755; PMCID: PMC10699602.

KHATAMI, K.; PEREZ-ZABALETA, M.; OWUSU-AGYEMAN, I. et al. Waste to bioplastics: how close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? **Waste Management**. 2021;119(1):374–388. doi: 10.1016/j.wasman.2020.10.008.

KATZ, M.; HOVER, B. M.; BRADY, S. F. Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. J Ind **Microbiol Biotechnol.** 2016 Mar;43(2-3):129-41. doi: 10.1007/s10295-015-1706-6. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26586404.

LEOMIL, L.; REIS, A. M. M.; TAVARES, P. et al. **Construção de biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio**. Brasília: Anais do 24˚ Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, p. 56.

MADARI, B. E.; CUNHA, T.J.F.; NOVOTNY, E.H. et al. Matéria orgânica dos solos antrópicos da Amazônia (Terra Preta de Índio): suas características e papel na sustentabilidade da fertilidade do solo In: Teixeira WG, Kern DC, Madari BE, Lima HN, Woods WI, editors. As terras pretas de índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental; 2009. pp. 172–188.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 1959;31(3):426–428. DOI: https://doi.org/10.1021/ac60147a030.

MIRETE, S.; SÁNCHEZ-COSTA, M.; DÍAZ-RULLO, J. et al. Metagenome-assembled genomes (MAGs): advances, challenges, and ecological insights. **Microorganisms**, Basel, v. 13, n. 5, art. 985, 25 abr. 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/microorganisms13050985.

MOREIRA, A. **Fertilidade, matéria orgânica e substâncias húmicas em solos antropogênicos da Amazônia Ocidental.** Bragantia, v.66, p.307-315, 2007. DOI: https://doi.org/10.1590/S0006-87052007000200015.

MOREIRA, D. S. **Desenvolvimento de novos vetores bem regulados para *E. coli*.** Tese apresentada no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – UFAM, 2023. 203 f.: il. color; 31 cm.

PABBATHI, N.P.P.; VELIDANDI, A.; TAVARNA, T.; GUPTA, S. et al. Role of metagenomics in prospecting novel endoglucanases, accentuating functional metagenomics approach in second-generation biofuel production: a review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Berlin, v. 13, n. 2, p. 1371-1398, 2023. DOI: https://doi.org/10.1007/s13399-020-01186-y.

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

PELLIZZA, L.; SMAL, C.; RODRIGO, G. et al. Codon usage clusters correlation: towards protein solubility prediction in heterologous expression systems in *E. coli*. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, art. 10618, 13 jul. 2018. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-018-29035-z.

PICCINNI, F.; MURUA, Y.; GHIO, S. et al. Draft Genome Sequence of Cellulolytic and Xylanolytic Cellulomonas sp. Strain B6 Isolated from Subtropical Forest Soil. **Genome Announcements** 2016 Aug 25;4(4):e00891-16. doi: 10.1128/genomeA.00891-16. PMID: 27563050; PMCID: PMC5000834. DOI: https://doi.org/10.1002/9781119994008.ch4.

POLLET, E.; AVEROUS, L. Production, chemistry and properties of polyhydroxyalkanoates. *In*: PLACKETT, D. (ed.). **Biopolymers**: new materials for sustainable films and coatings. Chichester: John Wiley & Sons, 2011. cap. 4, p. 65-86. DOI: https://doi.org/10.1002/9781119994008.ch4.

PUNDE, N.; KOOKEN, J.; LEARY, D. et al. Codon harmonization reduces amino acid misincorporation in bacterially expressed P. falciparum proteins and improves their immunogenicity. **AMB Express**. 2019 Oct 19;9(1):167. doi: 10.1186/s13568-019-0890-6. PMID: 31630257; PMCID: PMC6800875.

RAMSAY, B.A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C. et al. Production of poly-(β-hydroxybutyric-co-β-hydroxyvaleric) acids. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 56, n. 7, p. 2093-2098, 1990. DOI: https://doi.org/10.1128/aem.56.7.2093-2098.1990.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning:** A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor,1989. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCHLEGEL, H.G.; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. The isolation of mutants not accumulating poly-beta-hydroxybutyric acid. **Arch Mikrobiol**. 1970;71(3):283-94. doi: 10.1007/BF00410161. PMID: 4097070
SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, Cambridge, v. 37, n. 1, p. 67-75, maio 1984. DOI: https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90301-5.

SHARMA, D.; SINGH, D.; SUKHBIR-SINGH, G. M. et al. et al. Biosurfactants: forthcomings and regulatory affairs in food-based industries. **Molecules**, Basel, v. 28, n. 6, art. 2823, 21 mar. 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules28062823.
SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 6. ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 1996.

SHI, Y.; PAN, Y.; LI, B.; HE, W. et al. Molecular cloning of a novel *bioH* gene from an environmental metagenome encoding a carboxylesterase with exceptional

CC BY

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 13/08/2026 - **Accepted:** 20/09/2026
Vol: 13.20
DOI: 10.66104/4vn28939
Pages: 1-31

tolerance to organic solvents. **BMC Biotechnology**, London, v. 13, art. 13, 15 fev. 2013. DOI: https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-13.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B.H.; KALSCHEUER, R et al. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 171, n. 2, p. 73-80, 1999. DOI: https://doi.org/10.1007/s002030050681.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 56, n. 3, p. 782-787, mar. 1990. DOI: https://doi.org/10.1128/aem.56.3.782-787.1990.

VICENTE, E. J.; OLIVEIRA, R. G.; RIOS, T. C. et al. Prospecção de clones produtores de PHA a partir de biblioteca metagenômica da Terra Preta de Índio. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais** [...]. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011.

VINCES, T. C.; DE SOUZA, A. S.; CARVALHO, C. F. et al. Monomeric Esterase: Insights into Cooperative Behavior, Hysteresis/Allokairy. **Biochemistry**, v. 63, p. 1178-1193, 2024. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.biochem.3c00684.

CC BY