



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

DEISE JULIANA KOLLING

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA
DE DUAS LIPASES MUTANTES DE *Staphylococcus xylosus* E
DE UMA ESTERASE DE *Lactobacillus plantarum* IMOBILIZADA EM
POLIPROPILENO

FLORIANÓPOLIS – SC

2010

Deise Juliana Kolling

Caracterização bioquímica de duas lipases mutantes de *Staphylococcus xylosus* e de uma esterase de *Lactobacillus plantarum* imobilizada em polipropileno

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Ana Carolina Maisonnave Arisi.

Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

K81c Kolling, Deise Juliana
Caracterização bioquímica de duas lipases mutantes
de *Staphylococcus xylosum* e de uma esterase de
Lactobacillus plantarum imobilizada em polipropileno
[dissertação] / Deise Juliana Kolling ; orientadora, Ana
Carolina Maisonnave Arisi. -Florianópolis, SC, 2010.
76 p.: grafs, tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Tecnologia de alimentos. 2. Ciência dos alimentos.
3. Recombinante. 4. Mutagenese. 5. Lipase. 6. Esterases. 7.
Imobilização. 8. *Lactobacillus plantarum*. 9. *Staphylococcus*
xylosum. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

CDU 663

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE DUAS LIPASES MUTANTES DE
Staphylococcus xylosus E DE UMA ESTERASE DE *Lactobacillus plantarum*
IMOBILIZADA EM POLIPROPILENO**

Por

Deise Juliana Kolling

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Adriano Brandelli – UFRGS

Prof. Dr. Javier Ignacio Vernal – UFSC/CCB

Profa. Dra. Elisa Helena Siegel Moecke – UFSC/CCA/CAL

Profa. Dra. Ana Carolina Maiosonnave Arisi – UFSC/CCA/CAL – Orientadora

Aprovada pela banca examinadora em 26 de fevereiro de 2010.

KOLLING, D. J. **Caracterização bioquímica de duas lipases mutantes de *Staphylococcus xylosus* e de uma esterase de *Lactobacillus plantarum* imobilizada em polipropileno.** 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, [2010].

RESUMO

As lipases e esterases pertencem ao grupo das hidrolases e são enzimas capazes de catalisar a clivagem e formação de ligações ésteres. Essas enzimas são empregadas em diferentes ramos industriais, principalmente na indústria química, farmacêutica e de alimentos. A lipase (AF208229) de *Staphylococcus xylosus* foi previamente isolada, clonada, seqüenciada e caracterizada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a importância do resíduo de aminoácido valina 309 para atividade enzimática desta lipase, modificando a valina 309 por aspartato ou lisina através da PCR mutagênese sítio dirigida. A mutação foi realizada com sucesso e os mutantes (Mut-Asp e Mut-Lys) apresentaram características diferentes da lipase recombinante selvagem (WT-Val) em relação a hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila. Foi observado que a substituição do aminoácido 309 aumentou a atividade das lipases mutantes, principalmente com a presença do aminoácido básico (Mut-Lys). No entanto, a afinidade da enzima ao substrato diminuiu após a substituição do aminoácido valina, ocasionando aumento em duas vezes do valor de K_m para as enzimas mutantes. A atividade ótima para as três lipases recombinantes foi observada em pH 9,0 e a 42°C, sendo que, a Mut-Lys apresentou a maior atividade no pH alcalino. A lipase recombinante selvagem (WT-Val) e as lipases mutantes Mut-Asp e Mut-Lys mostraram ser termoestáveis após incubação a 80°C, visto que não foi observada perda na atividade nos períodos de incubação analisados (10, 20 e 30 min), fato observado pela primeira vez para lipases do gênero *Staphylococcus*.

A imobilização de enzimas é uma estratégia bastante utilizada para modificar a atividade enzimática e propiciar o uso de biocatalisadores nos processos industriais. A esterase de *Lactobacillus plantarum* foi previamente isolada, clonada, seqüenciada e caracterizada. Neste trabalho, esta esterase foi expressa em *E. coli* e o lisado celular foi imobilizado no suporte hidrofóbico polipropileno (Accurel MP1000) pelo método de adsorção e apresentou eficiência de 68,7%. A enzima imobilizada mostrou ser mais estável nas diferentes temperaturas testadas, como também, apontou ser mais termoestável que o lisado celular de enzima livre, mostrando que o processo de imobilização ocasiona restrição na mobilidade conformacional e maior rigidez na estrutura da enzima, impedindo a desnaturação e a perda da capacidade catalítica. A enzima imobilizada apresentou menor atividade específica e menor afinidade pelo substrato em relação a enzima livre, frente a hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila. Não foi observado desprendimento de proteína do suporte após 3 ciclos contínuos e a atividade de hidrólise da enzima imobilizada foi estável até a terceira semana após ser imobilizada.

Palavras chaves: recombinante, mutagênese sítio dirigida, lipase, esterase, imobilização, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*.

KOLLING, D. J. **Biochemical characterization of two mutants of *Staphylococcus xylosus* lipases and an esterase from *Lactobacillus plantarum* immobilized on polypropylene.** 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, [2010].

ABSTRACT

The lipases and esterases belong to the group of hydrolases and these enzymes are capable of catalyzing the cleavage and formation of ester bonds. These enzymes are used in different industrial fields, mainly in the chemical, pharmaceutical and food industries. Lipase (AF208229) of *Staphylococcus xylosus* was previously isolated, cloned, sequenced and characterized. The objective of this study was to evaluate the importance of the amino acid valine 309 for activity of lipase, changing valine 309 to aspartate or lysine by PCR site directed mutagenesis. The mutation was successfully performed and the mutant (Mut and Mut-Asp-Lys) had different characteristics from recombinant lipase wild (WT-Val) for the hydrolysis of butyrate *p*-nitrophenyl. It was observed that the substitution of amino acid 309 increased the activity of lipase mutants, especially with the presence of basic amino acid (Mut-Lys). However, the affinity of the enzyme to the substrate decreases after substitution of the amino acid valine, leading to increased at twice the value of K_m for mutant enzymes. The optimum activities for the three recombinant lipases were observed at pH 9.0 and 42° C, and the Mut-Lys showed the highest activity at alkaline pH. Recombinant lipase wild-type (WT-Val) and the mutants Mut-Asp and Mut-Lys proved to be heat-stable after incubation at 80°C, whereas there was no loss of activity in the incubation periods examined (10, 20 and 30 min). This result was first observed for lipases of *Staphylococcus*.

The immobilization of enzymes is a strategy often used to modify the enzymatic activity and promote the use of biocatalysts in industrial processes. The esterase of *Lactobacillus plantarum* was previously isolated, cloned, sequenced and characterized. In this work, this esterase was expressed in *E. coli* and the cell lysate was immobilized on the support hydrophobic polypropylene (Accurel MP1000) by the method of adsorption and presented efficiency of 68.7%. The immobilized enzyme was more stable at different temperatures, and also was more thermostable than the cell lysate of free enzyme, showing that the immobilization process can causes restricted mobility and greater rigidity in the structure of the enzyme, preventing the denaturation and loss of catalytic ability. The immobilized enzyme showed a lower specific activity and a lower affinity by the substrate than the free enzyme for hydrolysis of butyrate *p*-nitrophenyl. It was not observed detachment of protein support after 3 continuous cycles and the hydrolysis activity of immobilized enzyme was stable until the third week after being immobilized.

Palavras chaves: recombinant, site directed mutagenesis, lipase, esterase, immobilization, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*.

Aos Meus Pais, os principais e eternos professores, que com muito amor e carinho me ensinaram princípios e valores, que entre tantos, destaco aqui, a responsabilidade, a perseverança, a objetividade e a prudência, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. A eles dedico esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir a transformação dos meus sonhos em realidade.

À Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela oportunidade oferecida, orientação, preocupação e pelos ensinamentos que me possibilitaram realizar este trabalho.

Aos meus pais e meu irmão por respeitarem minhas escolhas e sempre me darem apoio e incentivo para realização dos meus objetivos.

Ao meu namorado Jefferson pela paciência, compreensão, auxílio, carinho e amor em todos os momentos.

Aos amigos de laboratório e colegas de mestrado, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração que tornaram os momentos de trabalho mais prazerosos.

Ao colega Fábio Brod pela paciência e os inúmeros ensinamentos teóricos e práticos, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos bolsistas Willian Suguino e Ana Silvia Scheibe pelo auxílio durante os experimentos de imobilização.

Ao Professor Hérnan Terenzi que oportunizou a utilização de equipamentos de seu laboratório e à seus orientados pelo auxílio e compreensão.

Ao Dr. Javier Ignacio Vernal pelas orientações durante o processo de construção dos mutantes.

À CAPES e ao CNPq pelo financiamento.

Aos membros da comissão avaliadora pela disposição e seriedade, dividindo seus conhecimentos para o enriquecimento da pesquisa.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1.	Mecanismo da reação da lipase.....	16
Figura 1.2.	Posições (sn) dos ácidos graxos em uma molécula de triacilglicerol	18
Figura 1.3.	Organização da lipase de <i>Staphylococcus hyicus</i> como pré-pró-proteína.....	19
Figura 1.4.	Alinhamento das seqüências maduras da lipase de <i>S. xylosus</i>	20

Capítulo 2

Figura 2.1.	Efeito do pH na atividade da recombinante <i>S. xylosus</i> lipase (WT-Val) e mutantes (Mut-Asp e Mut-Lys).....	48
Figura 2.2.	Efeito da temperatura na atividade das lipases recombinantes de <i>S. xylosus</i> selvagem (WT-Val) e mutantes (Mut-Asp e Mut-Lys).....	49
Figura 2.3.	Termoestabilidade das lipases recombinantes de <i>S. xylosus</i> selvagem (WT-Val) e mutantes (Mut-Asp e Mut-Lys) a 80°C.....	50
Figura 2.4.	Gráficos de Michaelis-Menten das lipases recombinantes de <i>S. xylosus</i> (A) WT-Val, (B) Mut-Lys e (C) Mut-Asp.....	51
Figura 2.5.	Alinhamento das seqüências	54
Figura 2.6.	SDS-PAGE (10% de acrilamida) das proteínas purificadas.....	55

Capítulo 3

Figura 3.1.	Efeito da temperatura na esterase de <i>L. plantarum</i> livre e imobilizada em polipropileno.....	68
Figura 3.2.	Estabilidade térmica da esterase de <i>L. plantarum</i> livre e imobilizada em polipropileno.. ..	69
Figura 3.3.	Gráficos de Michaelis-Menten de (A) esterase imobilizada em polipropileno e (B) esterase livre	70
Figura 3.4.	Estabilidade operacional da esterase de <i>L. plantarum</i> imobilizada em polipropileno.. ..	71
Figura 3.5.	Tempo de estocagem da esterase de <i>L. plantarum</i> imobilizada em polipropileno.....	72

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Tabela 2.1.** Iniciadores utilizados na mutagênese sítio dirigida para construção dos mutantes. 45
- Tabela 2.2.** Parâmetros cinéticos das lipases recombinantes selvagem e mutantes de *S. xylosus*. 46

Capítulo 3

- Tabela 3.1.** Parâmetros cinéticos da esterase recombinante de *L. plantarum*, enzima livre e imobilizada em polipropileno..... 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC** - *American Type Culture Collection*
- BL21 pLysS (DE3)** - Linhagem de *E.coli* modificada geneticamente para superexpressar proteínas
- DH5 α** - Linhagem de *E. coli* modificada geneticamente para superexpressar plasmídeo.
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- EC** - *Enzyme Commission (Enzyme Nomenclature)*
- IPTG** - *Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo*
- LB** - *Luria Bertani*
- LipF** - iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de lipase
- LipR** - os iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de lipase
- AspF** - os iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de lipase
- AspR** - os iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de lipase
- LysF** - os iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de lipase
- LysR** - os iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de lipase
- Mut-Asp** – Lipase recombinante de *S. xylosus* mutante, que contem um aspartato no resíduo de aminoácido 309.
- Mut-Lys** – Lipase recombinante de *S. xylosus* mutante, que contem uma lisina no resíduo de aminoácido 309.
- pb** - Pares de bases de DNA
- PBS** - *Phosphate buffered saline* – Tampão Fosfato acrescido de sais.
- PCR** - *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase
- pET14b** - vetor de expressão – plasmídeo
- pET14b-Est_Lpl** - Plasmídeo pET14b com o inserto da esterase de *Lactobacillus plantarum*.
- pET14b_lip** – plasmídeo pET14b com inserto S4 (linhagem selvagem)
- pET14b_mutAsp** – plasmídeo pET14b com inserto S4 modificado geneticamente por PCR mutagênese sitio dirigida para inserção de um aspartato no resíduo 309.
- pET14b_mutLys** - plasmídeo pET14b com inserto S4 modificado geneticamente por PCR mutagênese sitio dirigida para inserção de um lisina no resíduo 309.
- pGem -T easy** - Sistema para clonagem, vetor
- PMSF** - *Phenylmethanesulphonylfluoride* – Fluoreto fenil metano sulfonil
- pNPC₄** – butirato de *p*-nitrofenila
- S4** – Gene de lipase amplificado a partir de linhagem de *Staphylococcus xylosus* isolado de lingüiça colonial
- SAL** – Lipase de *Staphylococcus aureus*
- SDS** – Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE** - Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
- SSL** – Lipase de *Staphylococcus simulans*
- SXL** – Lipase de *Staphylococcus xylosus*
- WT-Val** – Lipase recombinante selvagem de *S. xylosus*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 1	14
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 LIPASES	15
1.1.1 Lipases de Staphylococcus xylosus	20
1.2 ESTERASES	23
1.2.1 Esterase de Lactobacillus plantarum	24
1.3 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE LIPASES	26
1.4 MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA	28
1.5. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	30
CAPÍTULO 2	35
MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASE DE STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS	36
CAPÍTULO 3	54
IMOBILIZAÇÃO DE ESTERASE RECOMBINANTE DE LACTOBACILLUS PLANTARUM EM POLIPROPILENO ACCUREL MP1000	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

INTRODUÇÃO

As lipases (EC 3.1.1.3) e as esterases (EC 3.1.1.1) são enzimas que catalisam a clivagem e formação de ligações ésteres. Elas pertencem ao grupo das hidrolases e são consideradas biocatalisadores versáteis, pois são capazes de catalisar diferentes reações (BORNSCHEUER, 2002). As enzimas microbianas são frequentemente mais utilizadas que as enzimas derivadas de plantas ou animais devido à maior variedade de atividade catalítica, possibilidade de alto rendimento no processo de obtenção da enzima, facilidade na manipulação genética, fornecimento regular proporcionado pela ausência de flutuações sazonais, crescimento rápido e barato do microrganismo, maior estabilidade que as enzimas correspondentes de plantas e animais e processo de produção mais conveniente e seguro (HASAN et al., 2006).

As lipases são empregadas em diferentes ramos industriais, mas com maior intensidade na indústria química, na farmacêutica e de alimentos. Nesta última é utilizada para produção de *flavors*, de lipídios estruturados, na maturação de derivados lácteos e cárneos e na produção de alimentos livres de gordura.

A necessidade de se obter enzimas com maior atividade e capazes de sobreviver aos processos industriais faz aumentar a busca por lipases provenientes de microorganismos ainda pouco explorados, bem como, propicia a utilização de estratégias capazes de modificar a atividade enzimática. Dentre as estratégias que podem ser escolhidas, existe a técnica de mutação sítio dirigida, que é capaz de alterar a enantioseletividade, a atividade catalítica e a seletividade por substrato da enzima modificada (MORLEY; KAZLAUSKAS, 2005). Esta técnica é importante para verificar a importância de resíduos de aminoácidos específicos na estrutura e atividade das proteínas. Outra estratégia bastante empregada é a imobilização de enzimas em um suporte inerte, que tem como vantagem proporcionar melhor flexibilidade operacional, melhorar a estabilidade térmica e a reutilização da enzima, aumentar a solubilidade do substrato e diminuir os custos de produção (MATEO, et al. 2007; HUANG; CHENG, 2008; KARRA-CHÂABOUNI, et al. 2008).

Até o momento, foram caracterizadas duas lipases expressas por *Staphylococcus xylosum*, a AF208229 seqüenciada por Rosenstein e Gotz (2000) e caracterizada por Brod *et al.* (2010a), e a AY701336 seqüenciada e caracterizada por Mosbah *et al.* (2005), no entanto, estudos adicionais envolvendo a importância de resíduos de aminoácidos específicos só foram

realizados com a lipase AY701336. Desta forma, a lipase de *S. xylosus* AF208229 é um interessante objeto de estudo, a fim de se obter informações sobre as características desta enzima e da possibilidade de uso da mesma em processos industriais.

A esterase de *Lactobacillus plantarum* foi isolada, seqüenciada e caracterizada previamente por Brod *et al.* (2010b). No entanto, ainda existem poucas informações a respeito da caracterização de enzimas expressas por essa bactéria, como também, poucos trabalhos utilizando esterases no processo de imobilização. A imobilização de enzimas é uma estratégia bastante utilizada para modificar a atividade enzimática e propiciar o uso de biocatalisadores nos processos industriais.

Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi verificar a importância de aminoácidos específicos na lipase de *Staphylococcus xylosus*, utilizando a técnica de mutagênese sítio dirigida e posterior caracterização bioquímica; e também, imobilizar e caracterizar bioquimicamente a esterase imobilizada de *Lactobacillus plantarum* e verificar a possibilidade de uso deste biocatalisador em processos industriais.

Este trabalho conta com o financiamento dos projetos coordenados pela Prof^a Ana Carolina Maisonnave Arisi “Novas Lipases Recombinantes com Alta Resiliência para Produção de Biodiesel a Partir de Rejeito de Óleo de Fritura” (CNPq edital 039/2007 Biodiesel processo 552508/2007-1) e “Expressão e Purificação de Lipases Recombinantes de *Staphylococcus xylosus* e *Lactobacillus plantarum*” (CNPq edital Universal 2007 faixa B processo 476285/2007-0).

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Lipases

As hidrolases são enzimas que catalisam reações em meio aquoso e são subdivididas em diversos grupos, entre eles o grupo das enzimas que atuam sobre ligações éster (carboxil ester hidrolases), onde as lipases (triacilglicerol acilhidrolase, E.C. 3.1.1.3) e esterases (E.C. 3.1.1.1) são enquadradas (ENZYME NOMENCLATURE, 2010). As carboxil ester hidrolases (E.C. 3.1.1.x) catalisam a clivagem e a formação de ligações ésteres e são subdivididas em 83 grupos, sendo os dois grupos mais numerosos pertencentes as lipases e as “verdadeiras” esterases (BORNSCHEUER, 2002). As lipases microbianas ocupam hoje um lugar de destaque entre os biocatalisadores devido à sua diversidade na atividade catalítica, alto rendimento e baixo custo de produção, bem como a relativa facilidade de manipulação genética (SHU et al., 2010). Além disso, essas enzimas microbianas são estáveis em solventes orgânicos, não necessitam de cofactores e possuem ampla especificidade de substrato (SAXENA et al., 2003). Atualmente existem mais de 20 lipases microbianas sendo produzidas em grande escala comercial (SHU et al., 2010).

As lipases podem ser simplesmente definidas como enzimas que catalisam a hidrólise (e síntese) de acilgliceróis de cadeia longa. No entanto, esta não é uma definição restrita, visto que, as lipases também podem hidrolisar gliceróis ésteres de cadeia curta (menor que 10 átomos de carbono), sendo a hidrólise destes substratos uma atividade característica de esterases (JESSEN, 1983).

As lipases apresentam preferência por compostos insolúveis em água e permanecem adsorvidas na interface óleo/água para posterior hidrólise do substrato (ARPIGNY; JAEGER, 1999). As enzimas lipolíticas são caracterizadas pelo aumento drástico da atividade quando presentes na interface óleo/água, fenômeno chamado de ativação interfacial (JAEGER et al., 1999). Esse aumento da atividade é devido a um rearranjo estrutural da região do sítio ativo. Na ausência da interface óleo/água o sítio ativo de diversas lipases encontra-se coberto por uma tampa. No entanto, na presença de substâncias hidrofóbicas esta tampa se abre, tornando acessíveis os resíduos catalíticos e expondo uma superfície hidrofóbica que interage com a

superfície do lipídeo (BRZOWSKI et al., 1991; DEREWENDA et al., 1992). A tampa pode ser formada por uma única hélice, por duas hélices ou por um *loop*. Entretanto, existem lipases que são desprovidas de tampa e não apresentam ativação interfacial (JAEGER et al., 1999).

Baseados na seqüência homóloga de aminoácidos, Arpigny e Jaeger (1999) identificaram e agruparam 47 distintas lipases, dentro de 6 famílias diferentes, sendo que a família I, denominada como a família das “verdadeiras” lipases, apresenta-se dividida em 6 subfamílias. As subfamílias I e II compartilham recursos estruturais importantes, como dois resíduos de aspartato envolvidos na ligação de íons Ca^{2+} ; e dois resíduos de cisteína formando uma ponte dissulfeto (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Devido ao fato dessas estruturas estarem localizadas na vizinhança dos resíduos catalíticos de histidina e aspartato, acredita-se que elas sejam importantes na estabilização do sítio ativo da enzima (KIM, et al., 1997).

Algumas enzimas hidrolíticas, como é o caso das lipases, possuem um padrão de enovelamento denominado α/β hidrolase. Esta estrutura consiste em oito folhas β -pregueadas dispostas paralelamente uma ao lado da outra, sendo a folha β_2 antiparalela e as folhas β_3 até a β_8 conectadas por α -hélices. A curvatura das folhas β e a posição espacial α -hélice podem variar bastante entre as várias enzimas (OLLIS, et al., 1992; JAEGER et al., 1999).

O sítio ativo das α/β hidrolases é constituído por três aminoácidos. O das lipases, especificamente, é formado por uma serina (resíduo nucleofílico), um aspartato ou glutamato (resíduo catalítico ácido) e uma histidina; estando estes resíduos dispostos sempre nessa seqüência da cadeia peptídica. O resíduo nucleofílico de serina está localizado em uma região altamente conservada, composta pelo pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly (OLLIS, et al., 1992; JAEGER et al., 1999).

Em um recente trabalho foi observado que as lipases de *Pseudomonas* e *Burkholderia* são geralmente codificadas em um *operon* juntamente com um segundo gene que codifica a enovelase específica para lipase (Lif) que é necessária para obter a lipase ativa enzimicamente. Uma análise detalhada baseada na seqüência de aminoácidos sugeriu que as proteínas Lif são classificadas em 4 diferentes famílias e também revelou uma seqüência conservada [Rx1x2FDY(F/C)L(S/T)A]. Experimentos recentes sugerem evidências que as Lif agem como chaperonas, baixando as barreiras energéticas durante o enovelamento dos seus *cognate lipases*, e proporcionam informação estérica necessária para enovelamento dentro da conformação ativa da enzima (ROSENAU; TOMMASSEN; JAEGER, 2004).

Mecanismo da catálise

A reação catalisada pelas lipases é semelhante à catalisada pelas serina-proteases devido à similaridade da tríade catalítica entre as duas enzimas. A seqüência de acontecimento da reação é apresentada abaixo (Figura 1.1).

- i. Primeiramente ocorre um ataque nucleofílico do oxigênio do grupo hidroxila da serina catalítica à carbonila (que faz a ligação éster) do substrato (etapa 1).
- ii. Ocorre a formação do intermediário tetraédrico transitório (etapa 2).
- iii. O próton do anel imidazólico é doado para o oxigênio que pertence à ligação éster do substrato. Com isso uma molécula de álcool é liberada.
- iv. É formado um intermediário covalente (“acila enzima”), proveniente da união da parte ácida da molécula do substrato com a serina nucleofílica (etapa 3).
- v. A histidina catalítica atrai o próton (H^+) de uma molécula de água, fazendo com que o íon hidroxila da molécula de água ataque a carbonila do intermediário covalente (etapa 3), formando um tetraedro (não representado).
- vi. A histidina doa um próton para o oxigênio da serina e ocorre a liberação da molécula acila (etapa 4).

No início da reação, o ataque nucleofílico da serina é facilitado pela histidina catalítica, que recebe o próton do grupo hidroxila da serina. A transferência de próton é facilitada pelo resíduo catalítico ácido (aspartato), que orienta o anel imidazólico da histidina e neutraliza, em parte, a carga formada (GROCHULSKI et al., 1994; KAZLAUSKAS, 1994; SCHRAG et al., 1997; LANG et al., 1998; JAEGER et al., 1999).

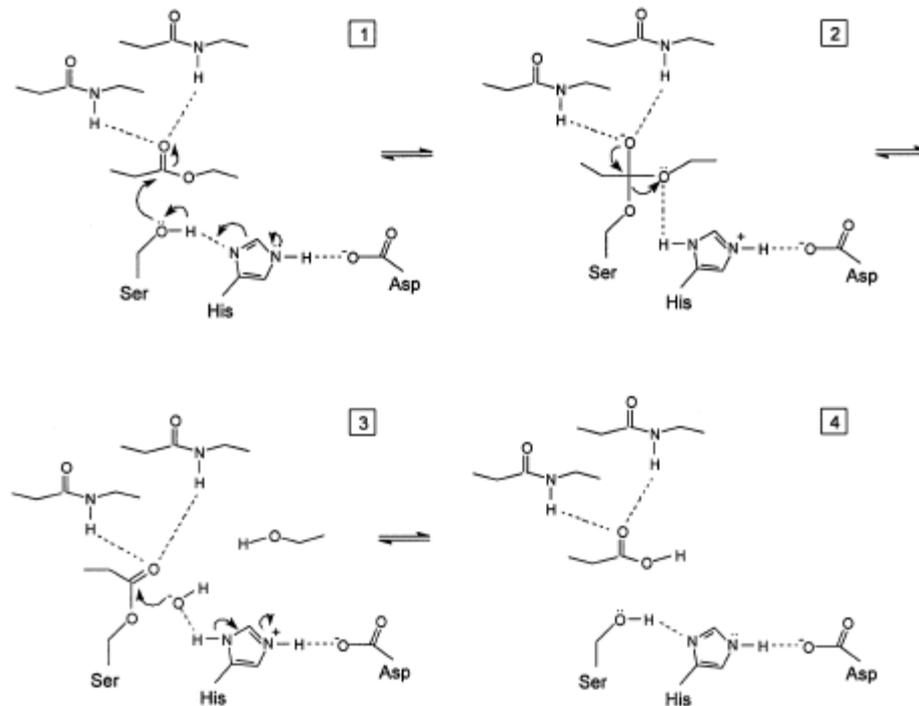


Figura 1.1. Mecanismo da reação da lipase. [1] Ligação do lipídio. [2] Intermediário tetraédrico transitório. [3] Intermediário covalente ("acila enzima"). [4] Liberação da molécula acila. Fonte: JAEGER et al.(1999).

Reações de Hidrólise e Síntese catalisadas por lipases

As lipases são caracterizadas como enzimas capazes de catalisar tanto a hidrólise como a síntese de acilgliceróis de cadeia longa (JAEGER et al., 1999; SHARMA et al., 2001). No entanto, outras moléculas como ésteres, amidas, poliol/poliácido ésteres, tiol ésteres, etc, também são substratos para estas enzimas (GANDHI, 1997).

As lipases possuem uma ampla especificidade por substrato e dessa forma podem ser empregadas em diferentes reações. Apresentam também, em uma catálise reversa, elevada eficiência ao realizar a reação de síntese, fato que torna algumas lipases mais adaptadas para aplicações de síntese do que de hidrólise (GANDHI, 1997).

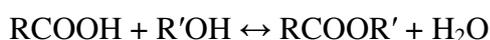
As duas principais categorias nas quais as reações catalisadas por lipases podem ser classificadas são:

◆ Hidrólise:

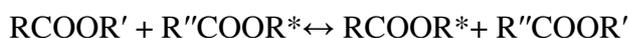


◆ Síntese:

* Esterificação



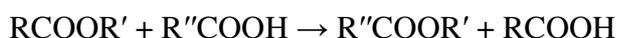
* Interesterificação



* Alcólise



* Acidólise



As três últimas reações são frequentemente agrupadas em um único termo designado de transesterificação (GANDHI, 1997).

Para investigar a função fisiológica de uma determinada lipase é necessário determinar a atividade específica e a sua especificidade por substrato. A diferenciação de uma lipase pode começar pela avaliação da atividade de hidrólise e síntese (JAEGER et al., 1999).

A hidrólise de lipídios com diferentes tipos de ácidos graxos e em diferentes posições pode conduzir a descoberta de compostos que são específicos para determinado tipo de lipase. Sendo assim, a regioespecificidade e a seletividade por substratos de uma lipase podem ser exploradas para determinação estrutural de triglicerídeos e para síntese de glicerídeos específicos (ALFORD; SMITH, 1965; BROCKERFOFF, 1971).

A reação de esterificação catalisada por uma lipase necessita de um solvente orgânico como meio reacional e é geralmente composta pela presença dos substratos (um álcool e um ácido carboxílico), da enzima e de água (que atua como sub-produto da reação) (GANDHI, 1997; JAEGER et al., 1999). A taxa de formação dos ésteres pode ser determinada por cromatografia gasosa e por cromatografia líquida de alta eficiência (JAEGER et al., 1999).

A esterificação e a transesterificação catalisada por lipases em meio anidro tem sido bastante estudada. A ausência de água elimina a competição da reação de hidrólise. Além disso, a especificidade por substrato, a regioespecificidade e a esteriospecificidade de uma enzima podem ser controladas variando o meio reacional. Embora os solventes orgânicos usados nestas reações sejam caracterizados como anidros, eles geralmente apresentam traços de água. Este conteúdo de água afeta a atividade da enzima e atua também como um concorrente nucleofílico (GANDHI et al., 2000). A quantidade de água presente na mistura

reacional controla o deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Geralmente as lipases apresentam preferência por um tipo de substrato, sendo a regioselectividade destas enzimas maior para as posições sn1 e sn3, e menos freqüente para a posição sn2 em uma molécula de triacilglicerol (Figura 1.2) (SVENDSEN, 2000).

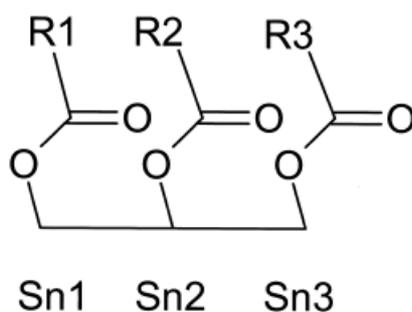


Figura 1.2. Posições (sn) dos ácidos graxos em uma molécula de triacilglicerol.
Fonte: SVENDSEN (2000).

1.1.1 Lipases de *Staphylococcus xylosus*

Staphylococcus xylosus é uma bactéria Gram positiva e coagulase-negativa, usada como cultura iniciadora em produtos cárneos e laticínios, assegurando o desenvolvimento de cor e contribuindo para aromas típicos (DORDET-FRISONI et al., 2007). *S. xylosus* é uma bactéria onipresente, frequentemente isolada de produtos fermentados naturalmente bem como de ambientes onde ocorre o processamento de alimentos (IRLINGER et al., 1997; ROSSI et al., 2001; MARTIN et al., 2006). Estudos elucidaram o mapa físico e genético do cromossomo C2a de *S. xylosus* e o seu tamanho foi estimado em 2868 ± 10 kb. Nele foram mapeados 33 marcadores (DORDET-FRISONI et al., 2007).

As seqüências de nove diferentes genes de lipases de seis espécies de *Staphylococcus*, incluindo *S. xylosus*, foram comparadas, sendo que foi observada alta similaridade na organização molecular dessas proteínas (ROSENSTEIN; GOTZ, 2000). Estas lipases de *Staphylococcus* são traduzidas como uma pré-pró-proteína, composta por um peptídeo sinal (35 a 38 aminoácidos), seguido um pró-peptídeo de 207 a 321 aminoácidos com caráter hidrofílico e um peptídeo maduro contendo 383 a 396 aminoácidos (figura 1.3).

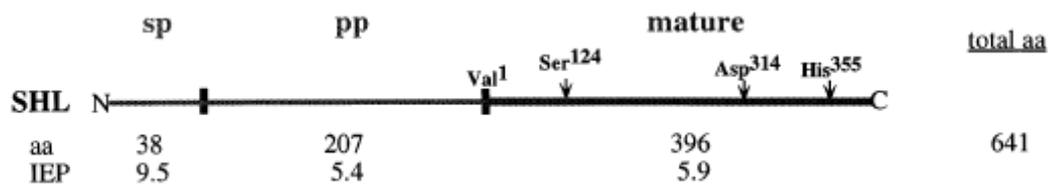


Figura 1.3. Organização da lipase de *Staphylococcus hyicus* como pré-pró-proteína. **sp**: peptídeo sinal; **pp**: pró-peptídeo; **mature**: lipase madura. Ser – Asp – His: tríade catalítica. Fonte: GOTZ et al. (1998).

O processamento para obtenção da lipase madura de *Staphylococcus hyicus* foi bastante estudado e é realizado por proteases extracelulares após a secreção da pró-proteína. Foram identificadas duas proteases envolvidas, a ShpI e a ShpII, sendo a ShpII responsável pela clivagem entre os resíduos Treonina 245 e Valina 246 (AYORA; GOTZ, 1994; AYORA et al., 1994). A função da região pró-proteína também foi investigada e os resultados mostraram envolvimento dessa região na translocação da proteína para o meio extracelular e proteção contra a degradação proteolítica (LIEBL; GOTZ, 1986; SAMUELSON et al., 1995; ROSENSTEIN; GOTZ, 2000).

Tiesinga e colaboradores (2007) elucidaram a estrutura da lipase de *Staphylococcus hyicus* por substituição molecular, usando como modelo base a estrutura da lipase de *Geobacillus stearothermophilus* P1. O modelo construído possui duas unidades moleculares altamente similares. Esta lipase possui enovelamento α/β hidrolase, com sete folhas β paralelas localizadas na região central e que são cobertas por α hélices (α_1 , α_{14} , α_2 , α_4 , α_{13}). A borda do sítio ativo é formada pelas hélices α_7 , α_{12} e por mais duas hélices que formam a “tampa”, a α_8 e α_9 e a tríade catalítica é formada pelos resíduos: Ser124, Asp314 e His355. Similar a lipase de *Pseudomonas cepacia*, a lipase de *S. hyicus* possui três cavidades de ligação para o substrato, uma posterior, uma anterior e outra no meio. A cavidade média possui em particular quatro resíduos polares (Glu292, Thr294, Lys295, Ser356), onde o resíduo de Lys295, localizado no centro, faz ligação com os outros três resíduos. Esta Lys295 está envolvida na ligação ao substrato, sendo que ela é capaz de ligar-se ao oxigênio da carbonila do lipídio e também ao fosfato do fosfolipídio. A cavidade anterior é flexível e possui um resíduo de treonina 27. Em outras lipases de *Staphylococcus*, geralmente é encontrado no lugar da Thr27 uma asparagina, que proporciona a estas lipases uma preferência por substratos de cadeia curta. A mudança de uma treonina por uma asparagina no resíduo 27 pode proporcionar mudanças na ligação e especificidade por substrato, no entanto, estudos adicionais são necessários para comprovar isto.

Mosbah e colaboradores (2005) caracterizaram uma lipase de *S. xylosus* (SXL) e encontraram para sua massa molecular um valor aproximado de 43 kDa. Esta lipase mostrou-se capaz de hidrolisar triacilgliceróis sem apresentar grande especificidade pelo comprimento da cadeia lateral; e ao contrário do critério utilizado por alguns autores para diferenciar lipases de esterases, a SXL não apresentou ativação interfacial. Foram analisados também os possíveis resíduos catalíticos envolvidos na atividade lipolítica desta lipase, sendo eles: Serina 117, Aspartato 308 e Histidina 350. A seqüência de aminoácidos dessa lipase (AY701336) madura apresentou 53% de similaridade com a lipase (AF208229) seqüenciada por Rosenstein e Gotz (2000), conforme pode ser observado na figura 1.4 (MOSBAH et al., 2005).

SXL	:	ANQVQPLNKYPVVFVHGFLLGLVGDNAPALYPNYWGGNFKKVIIEELRKGQY	50
SXL DSM20266	:	-KGGQYKNQDPIILVHGFNGFTDDINPAVLAEYWGGRKLNIRQDLESNGY	49
▼			
SXL	:	NVHCASVSAFGSNYDRAVELYIIKGGRVVDYGAHAHAKYGHERYGKTYHG	100
SXL DSM20266	:	ETYEASVGALESNYDRAVELYIIKGGTVVDYGAHAHAKYGHERYGKTYEG	99
▼			
SXL	:	IMPNWEPPGKKVHLVGHSMGGQTIIRLMEEFLLRNGNKEETAVHKAHGGETISF	150
SXL DSM20266	:	VYKDWCPGKKVHLVAHSMGGQTVRQLEELLRNGNQEETEVQREHGGETISF	149
▼			
SXL	:	LFTGGHNNMVASITTLATPHNGSQAADKFGNTEAVRKIMEALNRFMGNKY	200
SXL DSM20266	:	LFQGNNDNMVNSITTIIGTPHNGTHAADALGNEAVRQLAFDYARFEGNKN	199
▼			
SXL	:	SNIDLGLTQWGFKQLPNESYIIDYIKRVSKSKIWTSDNAAAYDLTLDGSAK	250
SXL DSM20266	:	SKVDFGFGQWGLKQREGETIAQYVQRVQNSGLWKTEDNGFYDLTREGAAK	249
▼			
SXL	:	LNNMTSMNPNIITYTITGVSSTHTGPLGYENFDLGTGFLMDTISRITIGHDA	300
SXL DSM20266	:	LNKNTSLNPNIVYKTYTGESTRPTLFGNOKSDVNLFLPFTVIGNVIGKPA	299
▼			
SXL	:	REEWRKNDGVPVVISSLHPSNCFVNVVINDPATRRGIWQVKPIIQGWDH	350
SXL DSM20266	:	EKEWRENDGLVSTISSQHPFNQAFIEAT-DE--VKKGVWQVTPIKHGWDH	346
▼			
SXL	:	VDFIGVDFLDFKRKGAELANFYTGIIINDLIRVEATESKGTQLKAS-----	395
SXL DSM20266	:	VDFVGDSTDSNHPTEELQCFWHNLAEDLVRNE-----QFDA-----	383

Figura 1.4. Alinhamento das seqüências maduras da lipase de *S. xylosus*. SXL: lipase (AY701336) seqüenciada por Mosbah e colaboradores (2005); SXL DSM20266: lipase (AF208229) seqüenciada por Rosenstein e Gotz (2000). As caixas pretas indicam posição de aminoácidos idênticos nas duas proteínas. As caixas cinzas indicam a localização de resíduos similares. Os triângulos indicam a Ser, Asp e Ser que provavelmente formam a tríade catalítica. O número refere-se ao aminoácido localizado no final de cada linha. Fonte: MOSBAH et al. (2005).

Fiorentini e colaboradores (2007) caracterizaram diversas cepas de *Staphylococcus xylosus* isoladas de salame artesanal, embutido cárneo fermentado produzido artesanalmente no sul do Brasil. Posteriormente, um fragmento do gene da lipase *gehM* de uma cepa de *Staphylococcus xylosus* isolada de salame artesanal e de uma linhagem padrão de *S. xylosus* (ATCC 29971) foi clonado e seqüenciado, sendo que as seqüências de nucleotídeos obtidas apresentaram similaridade de 99% com o gene *gehM* da lipase de *S. xylosus* AF208229 (PELISSER, 2008; BROD et al., 2010a).

Brod e colaboradores (2010a) realizaram a clonagem, purificação e caracterização da lipase recombinante de *S. xylosus* (AF208229), e observaram que esta enzima monomérica de aproximadamente 42 kDa apresenta atividade ótima em pH 9.0 e a 42°C. Também foi observado, para esta enzima, seletividade por substratos de cadeia curta e termo-tolerância, a qual mantém 77% da sua atividade após ser incubada a 95°C por 10 min.

Estudos abordando a modificação de aminoácidos específicos na estrutura da lipase de *S. xylosus* AF208229 ainda não foram publicados. Desta forma, é de grande interesse e relevância verificar a importância de aminoácidos específicos na estrutura e atividade desta lipase.

1.2 Esterases

As Esterases pertencem ao grupo das hidrolases e catalisam a clivagem e formação de ligações ésteres. As carboxil ester hidrolases são subdivididas em 83 grupos (ENZYME NOMENCLATURE, 2010) sendo os dois maiores grupos pertencem as lipases (EC 3.1.1.3) e as ‘verdadeiras’ esterases (EC 3.1.1.1) (BORNSCHEUER, 2002).

As esterases são amplamente encontradas em animais, plantas e microorganismos e assim como as lipases, as esterases apresentam enovelamento característico das α/β hidrolases e tríade catalítica composta por Ser – Asp (ou Glu) – His, sendo que a região consenso (Gly – x – Ser – x – Gly) ao redor do sitio ativo de Serina geralmente é encontrada (BORNSCHEUER, 2002). As esterases (e algumas lipases) são desprovidas da tampa encontrada na estrutura de muitas lipases (FORJAN et al., 2000).

As esterases se distinguem das lipases por não apresentarem ativação interfacial e por apresentarem uma cinética clássica de Michaelis-Menten (diferentes de algumas lipases

que necessitam de uma quantidade mínima de substrato para se tornarem ativas) (BORNSCHEUER, 2002). As lipases geralmente apresentam atividade ótima em pH alcalino, ao redor de 8,0 – 9,0, e as esterases preferem pHs menores, em torno de 5,5 – 6,5 (PETERSEN et al., 2001).

As esterases preferem substratos de menor hidrofobicidade e triglicerídeos com ácidos graxos menores que 6 carbonos, já as lipases são capazes de atuar sobre uma extensão maior de substratos, dando preferência para substratos de cadeia longa e insolúveis em água (FORJAN et al., 2000; BORNSCHEUER, 2002). Segundo Forjan e colaboradores (2000), que realizaram uma comparação detalhada entre a composição de aminoácidos e a distribuição eletrostática na superfície da proteína, o alinhamento da seqüência global de esterases e lipases não mostrou associação significativa entre essas enzimas em relação à seqüência de aminoácidos. Neste trabalho não foi encontrada diferença na composição global de resíduos de aminoácidos polares entre lipases e esterases. Em contraste, foi encontrada uma diferença nítida entre lipases e esterases, dependente da acessibilidade do solvente ao redor da proteína. As esterases apresentaram uma diminuição na composição de resíduos de aminoácidos não polares com o aumento da quantidade de solvente ao redor da proteína, como comumente é observado em proteínas solúveis em água. Já as lipases mostraram um aumento no conteúdo de resíduos não polares quando a acessibilidade do solvente ao redor da proteína foi em torno de 50 – 80%. Este aumento na cobertura hidrofóbica localizada nesta área da proteína acessada pelo solvente pode facilitar a ligação da lipase ao substrato hidrofóbico (FORJAN et al., 2000).

1.2.1 Esterase de *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia e não formadora de esporos, pertence ao grupo das bactérias denominadas bactérias ácido-láticas (BAL) (HOLZAPFEL et al., 2001). Essas bactérias são encontradas em diversos ambientes, como em produtos lácteos, cárneos e vegetais (KLEEREBEZEM et al., 2003), sendo algumas linhagens utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação industrial e artesanal, contribuindo para conservação, produção de flavor e textura de alimentos fermentados (DE VRIES et al., 2006).

A seqüência completa do genoma do *Lactobacillus plantarum* cepa WCFS1 foi determinada. O cromossomo de 3.308.274 pb contém 3.052 prováveis genes que codificam proteínas. O sequenciamento revelou que esse microorganismo está focado no catabolismo de carbono, pois foram encontrados muitos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo central do carbono e que pertencem ao grupo dos genes altamente expressos. Foi também descoberto um número relativamente alto de funções reguladoras que implica na capacidade do *L. plantarum* de se adaptar eficientemente em muitos ambientes (KLEEREBEZEM et al., 2003).

A importância dos lactobacilos na produção de alimentos fermentados tem sido bem estudada e documentada (LOPES et al., 2002), porém ainda existem poucas informações a respeito das esterases e lipases provenientes de *Lactobacillus spp.* Isto pode ser consequência da baixa produção de lipases por estes microorganismos (VOGEL et al., 1990) quando comparados com *Staphylococcus spp.* (KENNEALLY et al., 1998). Brod e colaboradores (*in press*) realizaram a clonagem, purificação e caracterização da esterase recombinante de *L. plantarum* ATCC 8014, com massa molecular teórica calculada de 39,075 kDa. Esta proteína mostrou identidade de 100% com a lipase/esterase putativa de *L. plantarum* WCFS1 (NP_784685.1). O alinhamento desta enzima com esterases de conhecida estrutura tridimensional sugere que a tríade catalítica seja formada pelos aminoácidos Ser174, Asp283 e His313. A atividade ótima desta esterase foi observada a 40°C e pH 6.0, sendo que a atividade específica encontrada para hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila de 17.2 ± 3.12 U/mg. Assim como já foi observado em outras esterases, a esterase recombinante de *L. plantarum* apresentou especificidade pelos substratos de cadeia lateral curta, como o acetato de *p*-nitrofenila (128.9 U/mg) e o butirato de *p*-nitrofenila (15.7 U/mg), sendo que não foi detectada atividade nos outros ésteres de *p*-nitrofenila testados cuja cadeia do ácido graxo possuía mais que 8 carbonos (BROD et al., 2010b).

A influência de fatores ambientais na produção de lipases de *L. plantarum* isolado de lingüiça Portuguesa seca fermentada (*chouriço*) foi avaliada e observou-se que a produção máxima de lipase era alcançada em pH 5.5 a 30°C. Também se notou que a concentração de glicose foi importante para a rápida produção de lipase e que ela não influenciou na quantidade de lipase alcançada no meio de cultura (LOPES et al., 1999).

Esta mesma lipase isolada de lingüiça Portuguesa seca fermentada foi purificada e caracterizada. A purificação foi realizada por cromatografia de gel filtração e gel de acrilamida, e foi observado quatro bandas entre 98 e 45 kDa com atividade lipolítica diante do óleo de oliva. Foi observado também uma impressionante estabilidade térmica desta lipase,

que apresentou perda de apenas 10% na atividade após ser incubada por 30 min a 100°C (LOPES et al., 2002).

Uma lipase intracelular de *L. plantarum* 2339 foi purificada e caracterizada. Esta enzima apresentou massa molecular de 65 kDa e atividade ótima em pH 7.5 a 35°C, sendo que após o tratamento térmico a 75°C por 2 min ela foi inativada irreversivelmente. Esta lipase apresentou especificidade por substratos de cadeia curta dando preferência para hidrólise dos ésteres de β -naftila com C4 (100%), C6 (93%), C2 (85%) e C8 (78%) carbonos na cadeia lateral. Esta enzima apresentou atividade de hidrólise de apenas 17% e 5% sobre palmitato e estearato de β -naftila, respectivamente (GOBBETTI et al., 1996).

1.3 Aplicações industriais de lipases

As lipases estão entre as enzimas hidrolíticas de maior interesse, pois são biocatalisadores versáteis capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Estas enzimas possuem considerável potencial biotecnológico, industrial e significância fisiológica (SHARMA et al., 2001; MOSBAH et al., 2005) devido à existência de alguns fatores como estabilidade em solventes orgânicos, o não requerimento de co-fatores, a especificidade por substratos variados e a presença de enantioespecificidade (JAEGER; REETZ, 1998; HASAN et al., 2006).

Os óleos e gorduras são importantes constituintes dos alimentos e apresentam valor nutricional e sensorial, além de propriedades físicas que são influenciadas por fatores como: posição do ácido graxo na estrutura do glicerol, comprimento da cadeia lateral do ácido graxo e presença de insaturações. As lipases são utilizadas na indústria de alimentos para modificar essas propriedades através de reações de transesterificação e interesterificação (SHARMA et al., 2001).

Os lipídeos estruturados são definidos como triacilgliceróis formados por resíduos particulares de ácidos graxos em posições específicas. Esses compostos podem ser produzidos por catálise química ou enzimática, no entanto, a reação catalisada por lipases apresenta como vantagem o maior controle do produto final, devido a seletividade e a regioespecificidade desta enzima (OSBORN; AKOH, 2002; IWASAKI; YAMANE, 2000). As lipases são usadas para produzir lipídios estruturados ricos em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) a partir de

lipídeos vegetais e animais. Os PUFA's possuem efeitos benéficos e são empregados em produtos farmacêuticos, nutracêuticos e aditivos de alimentos (GILL; VALIVETY, 1997; SHARMA, et al. 2001).

Os ácidos graxos trans, produzidos principalmente pelo processo de hidrogenação, foram muito utilizados na indústria de alimentos devido a suas boas propriedades tecnológicas, no entanto, muitos estudos têm relacionado esses compostos com o surgimento de doenças (coronarianas, de obesidade, câncer etc). Desta forma, com o objetivo de se eliminar ou diminuir os ácidos graxos trans, a indústria de alimentos buscou alternativas tecnológicas, entre elas, a reação de interesterificação catalisada por lipases. Esta reação fornece uma eficiente maneira de se produzir gordura com desejadas características químicas e físicas (LEE, et al. 2007), sendo uma de suas aplicações a produção de equivalente da manteiga de cacau (importante ingrediente do chocolate) a partir de óleo de palma, ácido esteárico, ácido palmítico e óleo de oliva (BLOOMER, et al. 1992; LIU, et al. 2005).

As lipases são usadas na síntese de mono-glicerídeos de açúcar, ésteres de açúcar, e amino-ésteres de acil graxo, ambos compostos são empregados como emulsificantes de alimentos. Os mono-glicerídeos são também usados como material base para filmes comestíveis e lubrificantes comestíveis (ZAKS; GROSS, 1990; GANDHI, 1997).

Lipases também têm sido utilizadas para sintetizar ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e álcoois, que são compostos de sabor e aroma conhecidos e que são adicionados aos alimentos para modificação do sabor (HASAN et al., 2006). Lipases de diferentes microorganismos foram utilizadas para melhorar o flavor de produtos de arroz, para modificação do leite de soja e para melhorar o aroma e acelerar a fermentação de vinhos de maçã (HASAN et al., 2006).

Na indústria de laticínios as lipases são amplamente utilizadas na hidrólise da gordura do leite. Suas principais aplicações incluem o aprimoramento do sabor e a aceleração da maturação de queijo, fabricação de produtos “tipo queijos”, e lipólise da gordura da manteiga e do creme de leite. Os ácidos graxos obtidos pela ação de lipases na gordura do leite proporcionam a estes produtos flavor característicos, principalmente aos queijos leves (HASAN et al., 2006). Desta forma, a adição de lipases que proporcionam a produção de ácidos graxos de cadeia curta (principalmente C4 e C6) leva ao desenvolvimento de aromas acentuados e penetrantes ao produto, no entanto, a liberação de ácidos graxos de cadeia media (C12, C14) confere um sabor de sabão ao produto. Além disso, os ácidos graxos livres são convertidos pela população microbiana presente nos queijos, iniciando a síntese de

ingredientes formadores de aromas como acetoacetato, β -cetoácidos, metilcetonas, ésteres e lactonas (HASAN et al., 2006).

As lipases desempenham um papel importante nas etapas de fermentação e fabricação de salsichas e também para alterar os ácidos graxos de cadeia longa liberados durante o amadurecimento (HASAN et al., 2006). As lipases têm sido utilizadas em peixes para produção de carne magra. Neste processo, chamado de biolipólise, a lipase faz a quebra da gordura e esta é removida da carne de peixe (GANDHI, 1997; HASAN et al., 2006).

Entre as etapas que promovem melhoria na qualidade do chá preto, há a etapa de fermentação enzimática a qual a planta do chá é submetida. Nesta etapa, a decomposição dos lipídeos de membrana inicia a formação de produtos voláteis com aromas característicos, enfatizando a importância dos lipídeos no desenvolvimento do flavor. A lipase produzida por *Rhizomucor miehei* aumentou o nível de ácidos graxos poliinsaturados na produção de chá preto produzido com o auxílio desta lipase (LATHA et al., 1999).

As lipases têm sido utilizadas na melhoria do flavor em branqueadores de café para produzir um aroma lácteo e textura de manteiga em balas de leite e caramelo. Em padarias, a utilização destas enzimas, permite estender a vida de prateleira, ajuda a melhorar e controlar o escurecimento não enzimático, e aumenta o volume e melhora a estrutura do miolo de pão (HASAN et al., 2006).

Além da indústria de alimentos, as lipases são amplamente utilizadas nas formulações de detergentes e desengordurantes, na síntese de compostos de interesse na indústria química e farmacêutica, na produção de cosméticos e flavorizantes, na aceleração da degradação de resíduos gordurosos e poliuretanos (GANDHI, 1997; SHARMA et al., 2001; HASAN et al., 2006), e na produção de biodiesel (ISO et al., 2001; YAGIZ, et al. 2007).

1.4 Mutagênese sítio dirigida

As enzimas nem sempre apresentam um desempenho satisfatório em relação a sua atividade, estabilidade e enantioseletividade. No entanto, essas propriedades podem ser otimizadas por alterações no substrato, no sistema reacional e por técnicas de engenharia genética (BORNSCHEUER, 2002). Dentre as técnicas de modificação genética, a mutagênese randômica e a mutagênese sítio dirigida tem sido empregadas para modificar o desempenho

catalítico de diferentes lipases (SVENDSEN, 2000). Essa técnica é capaz de alterar a estrutura primária de uma enzima, como também, pode ser capaz de modificar a estrutura secundária e terciária (JAEGER; EGGERT, 2004).

Diversos estudos que procuram melhorar as propriedades enzimáticas, através de técnicas de mutação, têm revelado que na maioria dos casos as mutações próximas do sítio ativo são mais efetivas que as mutações distantes. Em uma revisão realizada por Morley e Kazlauskas (2005), os autores concluíram que as mutações próximas do sítio ativo alteraram preferencialmente a enantioseletividade, a atividade catalítica e seletividade por substrato. Já para melhorar a termoestabilidade e a atividade catalítica, ambas as mutações, próximas ou distantes do sítio ativo, apresentam-se efetivas para alterar tais propriedades enzimáticas.

Diferentes estratégias podem ser empregadas para melhorar as propriedades de uma enzima. No entanto, para análise de enantioseletividade, especificidade por substrato e modificação no desempenho catalítico, a mutagênese sítio-dirigida é a melhor escolha, visto que a mutação randômica cria mais modificações em aminoácidos distantes do sítio ativo do que em aminoácidos próximos do sítio ativo (MORLEY; KAZLAUSKAS, 2005).

A estrutura tridimensional e a catálise enzimática geralmente estão relacionadas com resíduos de aminoácidos conservados nas proteínas de uma mesma família. Variações nos resíduos de aminoácidos são geralmente encontradas na superfície da proteína e nas regiões próximas ao sítio de ligação do substrato (CYGLER et al., 1993; LOTTI et al., 1994). Em relação às lipases de *Staphylococcus*, existe carência de estruturas tridimensionais disponíveis e baixa homologia da seqüência dessas lipases com as lipases de outras famílias, sendo dessa forma difícil de promover a modelagem computacional da estrutura completa da proteína (MOSBAH, et al., 2005; MOSBAH, et al., 2007).

Tem sido proposto que a região próxima do resíduo 290 de algumas lipases de *Staphylococcus* pode estar envolvida na seletividade por substrato. Para a lipase de *S. aureus* (SAL) a alanina 290 está relacionada com a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia curta; já na lipase de *S. simulans* (SSL) o resíduo 290 é ocupado por um aspartato, que proporciona a esta enzima a capacidade de hidrolisar triacilgliceróis sem especificidade pela cadeia lateral (SAYARI et al., 2001). Mosbah e colaboradores (2006) verificaram na lipase AY701336 de *S. xylosus* que o resíduo de aspartato 290 pode estar envolvido na seletividade pelo comprimento da cadeia lateral em uma reação de hidrólise. Neste estudo, a lipase nativa (que possui o resíduo de aspartato 290) apresentou seletividade para triacilgliceróis de cadeia curta; já a enzima mutante, construída a partir de mutagênese sítio-dirigida, possuindo uma alanina na posição 290 foi capaz de hidrolisar triacilgliceróis sem especificidade pela cadeia lateral.

Em outro estudo, também realizado por Mosbah e colaboradores (2007), foi observada a importância do resíduo glicina 311 para a lipase AY701336 de *S. xylosum*, o qual foi substituído por leucina, triptofano, aspartato ou lisina. Em relação às propriedades bioquímicas, foi observado que a atividade específica dos mutantes diminuía conforme aumentava a cadeia lateral do aminoácido substituído, sendo que a lipase que continha triptofano não apresentou nenhuma atividade frente aos substratos, tributirina, óleo de oliva e fosfatidilcolina. A mudança da glicina 311 por um resíduo básico ou ácido (lisina ou aspartato) proporcionou uma mudança no pH ótimo, que passou de 8 para 9,5 ou 6,5, respectivamente. Entre todos os mutantes e a enzima nativa, apenas o mutante leucina 311 apresentou atividade de fosfolipase. Estas observações confirmam que a glicina 311 é um importante resíduo para esta lipase de *Staphylococcus xylosum* e que ele pode estar envolvido no reconhecimento de fosfolipídios.

1.5. Imobilização de Enzimas

A baixa estabilidade e eficiência catalítica de enzimas nativas frente aos processos industriais são consideradas barreiras para aplicação em larga escala desses catalisadores. As lipases têm sido muito utilizadas em reações de síntese, onde solventes orgânicos, como metanol, são utilizados no meio reacional, porém, muitos desses solventes promovem a desnaturação da enzima. Em virtude disto, as lipases têm sido imobilizadas para proteger a enzima do solvente desnaturante, facilitar a separação da enzima no meio reacional, proporcionar melhor flexibilidade operacional, melhorar a estabilidade térmica e a reutilização da enzima, aumentar a solubilidade do substrato e diminuir custos de produção (MATEO, et al. 2007; YAGIZ, et al. 2007; HUANG; CHENG, 2008; KARRACHÂBOUNI, et al. 2008; LEE et al., 2009).

A imobilização de enzimas consiste no confinamento das mesmas em um material determinado, sendo que os métodos de imobilização podem ser divididos em dois grandes grupos:

- Encapsulação
 - Em matriz: Confinamento do catalisador em matriz formada por géis poliméricos.
 - Em membrana polimérica: entre membranas macroscópicas ou através do confinamento em microcápsulas.
- Ligação
 - Por ligação covalente: diretamente no suporte ou por ligação cruzada entre a enzima e o suporte pelo uso de um reagente multifuncional.
 - Por adsorção (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Diversas abordagens têm sido reportadas para imobilização das lipases, sendo que a seleção da estratégia de imobilização é baseada na eficácia da utilização da enzima, custo da imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedade final desejada do biocatalisador imobilizado (KARRA-CHÂABOUNI, et al. 2008).

O processo de imobilização pelo método de adsorção é simples e muito utilizado por apresentar algumas vantagens, como ser de simples preparação, baixo custo, formar derivados estáveis e não provocar mudanças conformacionais na enzima (SÁNCHEZ-OTERO et al., 2008). Neste método a ligação da enzima ao suporte é realizada por ligações de baixa energia, tais como interações de Van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas (DALLA-VECCHIA et al., 2004; SÁNCHEZ-OTERO et al., 2008; LEE et al., 2009).

O sucesso da eficiência do processo de adsorção depende de vários parâmetros, como o tamanho da proteína e a sua concentração, a área superficial do adsorvente, a porosidade do suporte e o tamanho do poro. O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima fica adsorvida no interior dos poros (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Muitos suportes têm sido estudados incluindo polímeros, resinas, materiais carbonados, compostos de sílica e sílica-alumina. Estes sistemas geralmente possuem baixa força mecânica e limitações de difusão, conduzindo a baixa atividade enzimática. Para minimizar as limitações de difusão interna, suportes porosos são utilizados na forma de partícula, dentre eles a cerâmica porosa, que possui elevada força mecânica e boa durabilidade (HUANG & CHENG, 2008). A imobilização de um extrato enzimático bruto no interior de estruturas porosas estabiliza a enzima frente a interações com moléculas do extrato enzimático, prevenindo a agregação, a autólise ou a proteólise por proteases do extrato (que também serão dispersas e imobilizadas) (MATEO, et al. 2007).

Com o intuito de melhorar a eficiência de adsorção, aditivos ou solventes polares, como etanol ou isopropanol, tem sido utilizados no processo de imobilização a fim de realizar um pré-tratamento do suporte (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Kosugi e colaboradores (1995) imobilizaram a lipase de *Pseudomonas fluorescens* em resina de troca iônica Drowex 66 e observaram que sem o pré-tratamento do suporte a adsorção foi muito baixa. No entanto, quando foi adicionado 50% de um solvente polar, a adsorção aumentou para 96-97% (KOSUGI et al., 1995). Em outro trabalho também foi observado efeito na adsorção da proteína ao suporte e na atividade de hidrólise do óleo de oliva após o pré-tratamento do suporte, sendo que esses autores sugerem que o solvente polar absorve as moléculas de água do suporte, favorecendo a adsorção da proteína (MONTERO et al., 1993).

A água é um componente importante na catálise, principalmente em meio reacional orgânico. Dependendo o tipo de solvente e das características do suporte utilizado, uma quantidade mínima de água é necessária para solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Mesmo quando ligadas covalentemente a um suporte, as enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa. A água contribui também para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo, estabilidade da proteína e também pode limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (DALLA-VECCHIA et al., 2004). O efeito da hidratação na dinâmica de proteínas confinadas foi estudo por Galarneau e colaboradores (2006), onde foi observado que o nível de hidratação, nos poros de uma matriz de sílica gel, afetou fortemente o deslocamento de prótons da proteína confinada, mas não afetou o tamanho da proteína.

O uso de enzimas em solventes orgânicos é de grande interesse, pois permite reações de esterificação. Entretanto, a atividade da enzima é fortemente afetada pela escolha de solventes orgânicos que podem causar desnaturação da enzima e conseqüentemente perda da atividade catalítica (KARRA-CHÂABOUI et al., 2008). Karra-Châabouni *et al.* (2008) avaliaram a tolerância de uma lipase imobilizada na presença de 4 solventes e verificaram ao longo do tempo, que a enzima foi mais tolerante nos solventes hexano e *tert*-butanol. Já nos solventes acetona e acetonitrila a atividade diminuiu drasticamente nos primeiros 60 min de incubação. Os autores sugerem que a baixa atividade da lipase nos solventes acetona e acetonitrila foi decorrente da maior polaridade destes solventes, nos quais a água é altamente miscível. Esta miscibilidade com a água proporcionou a retirada de uma camada de água ao redor da enzima que é essencial para manutenção da sua conformação, provocando a perda da atividade.

Enzimas imobilizadas podem ser influenciadas pela natureza do solvente, que pode causar interações iônicas na proteína e mudança na rigidez da enzima, devido a alta constante dielétrica do solvente. As diferentes energias de solvatação do solvente podem modificar a polaridade do sítio ativo devido a estabilização das cargas do estado de transição, como também estabilizar a variação da energia livre total. O parâmetro utilizado para descrever quantitativamente o efeito do solvente é o $\log P_{\text{oct}}$, definido como logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água. (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Alguns efeitos sobre a atividade catalítica podem ser esperados após a imobilização. Entre eles, os efeitos estéricos e conformacionais. Quando a enzima liga-se ao suporte podem ocorrer mudanças na sua conformação que interferem na sua eficiência catalítica. A interação enzima-suporte é quase sempre aleatória, sendo que neste processo o sítio ativo pode se tornar menos acessível ao substrato, ocorrendo diminuição na atividade. Outro efeito está relacionado ao microambiente. Neste, a enzima fica sujeita a uma circunvizinhança que pode causar uma distribuição desigual do substrato, produto e co-fatores entre a região vizinha ao sistema imobilizado e o resto da solução, levando a modificação dos valores dos parâmetros cinéticos. Os efeitos causados pela difusão do substrato também são muito importantes após o processo de imobilização. Ao imobilizar um biocatalisador, o substrato deve difundir-se do seio da solução até o sítio ativo da enzima para que a reação ocorra. A velocidade com que o substrato se difunde é menor do que a velocidade de transformação da enzima, não chegando a saturá-la com o substrato, sendo assim, a velocidade observada para reação, é mais baixa do que a esperada para uma dada concentração de enzima em solução (VITOLLO, 2001).

Fatores como, características do suporte, grupos reativos e condições de imobilização, devem ser selecionados cuidadosamente para que seja possível agregar uma grande quantidade de enzimas no suporte durante a imobilização (MATEO et al., 2007). Para que ocorra uma eficiente imobilização, o suporte deve apresentar características como: larga superfície interna; grande quantidade de grupos reativos na sua superfície, sendo que estes grupos devem interagir com grupos posicionados na superfície da enzima; grupos reativos estáveis para permitir longos períodos de reação enzima-suporte; e fácil obtenção de uma superfície inerte depois da imobilização, através da destruição e bloqueio dos grupos reativos que sobraram no suporte sem afetar a enzima. A imobilização deve ocorrer em condições que favoreçam a reação enzima-suporte, sendo que as variáveis críticas para este processo são: tempo de reação; pH, que dependendo do suporte e da enzima pode ser tanto neutro quanto alcalino; temperatura, sendo que temperaturas moderadamente altas favorecem a vibração da

enzima e do suporte, aumentando as possibilidades de ligação; e presença de inibidores e outros protetores da proteína, a fim de impedir as perdas de atividade (MATEO et al., 2007).

Existem muitos exemplos de lipases adsorvidas em suportes hidrofóbicos de baixa carga iônica, envolvendo as áreas hidrofóbicas ao redor do sítio ativo que levam a estabilização da proteína na forma aberta (MATEO et al., 2007). Devido a grande hidrofobicidade na superfície ao redor do sítio ativo, a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é considerada vantajosa uma vez que assegura a) a hiperativação de muitas lipases, b) alta seletividade na adsorção, possibilitando em alguns casos purificação, c) maior enantioseletividade, e d) possibilidade de recuperação do suporte após a desativação da enzima (ALMEIDA et al., 2008).

O suporte polipropileno poroso (Accurel) tem sido usado por muitos grupos de pesquisa para imobilizar diferentes hidrolases utilizando o método de adsorção (GUPTA et al., 2005; SABBANI et al., 2006). Tem sido também reportado, que a imobilização de lipases em Accurel influencia a atividade catalítica e a enantioseletividade (SABBANI et al., 2006). Entre as diferentes matrizes disponíveis, Accurel é um suporte ideal para imobilizar lipases, pois é hidrofóbico, macroporoso, de baixa densidade e com uma grande área superficial para adsorção pois apresenta um pequeno tamanho de partícula (BALCAO et al., 1996).

A prática de adsorção, principalmente de lipases, dentro de uma matriz para o uso da catálise enzimática é amplamente utilizada, no entanto, a subsequente dessorção da enzima da matriz é algo relativamente novo e inexplorado, devido a ineficiente eluição da enzima da matriz (GUPTA et al., 2005). Recentemente, este método de adsorção e dessorção para purificação de lipases tem sido adaptado utilizando matrizes de alginato (SHARMA; GUPTA, 2001), sefarose (BATISTA et al., 1998) e também de polipropileno Accurel MP-1000 (GUPTA et al., 2005).

CAPÍTULO 2

MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASE DE *Staphylococcus xylosus*

Artigo aceito para publicação.

KOLLING, D. J.; BERTOLDO, J. B.; BROD, F. C. A.; VERNAL, J.; TERENZI, H.; ARISI, A. C. M. Biochemical and Structural Characterization of Two Site-Directed Mutants of *Staphylococcus xylosus* Lipase. *Molecular Biotechnology*. v.xx, p.xx, 2010.

MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASE DE *Staphylococcus xylosus*

Deise Juliana Kolling^a, Fábio Cristiano Angonesi Brod^a, Javier Vernal^b, Hernán Terenzi^b, Ana Carolina Maisonnave Arisi^{a*}

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, Brazil.

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Brazil.

Resumo

A clonagem, expressão e purificação de uma lipase de *Staphylococcus xylosus* foi previamente realizada. No presente trabalho o aminoácido valina 309 da lipase recombinante de *S. xylosus* foi substituído por aspartato ou lisina através da PCR mutagênese sítio dirigida e o gene das duas lipases (1084 pb) mutantes foi clonado, seqüenciado, expresso em *E. coli*. Enzimas mutantes contendo cauda de histidina foram purificadas e caracterizadas usando butirato de *p*-nitrofenila como substrato. A modificação de valina 309 por aspartato ou lisina foi realizada com sucesso e as proteínas mutantes (Mut-Asp e Mut-Lys) apresentaram características diferentes da lipase recombinante selvagem (WT-Val) em relação à hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila. A substituição do aminoácido 309 aumentou a atividade das lipases mutantes, principalmente a da lipase Mut-Lys que apresentou uma maior eficiência catalítica proporcionada pela presença do aminoácido básico. A substituição pelos aminoácidos aspartato e lisina ocasionou o aumento do valor K_m . As enzimas mutantes apresentaram estabilidade térmica, igualmente observada para lipase WT-Val, sendo que, após serem incubadas a 80°C, não houve diminuição da atividade das três enzimas.

Palavras-chave: lipase, *Staphylococcus xylosus*, mutagênese sítio dirigida.

1. Introdução

As lipases (EC 3.1.1.3) catalisam a síntese e a hidrólise de ligações ésteres e são amplamente distribuídas na natureza (SHARMA et al., 2001). As lipases possuem padrão de enovelamento denominado de α/β hidrolase e triade catalítica formada por um resíduo nucleofílico, caracterizado pela presença de uma serina, um resíduo catalítico ácido, composto por aspartato ou glutamato, e uma histidina (OLLIS et al., 1992; JAEGER et al., 1999).

As seqüências de nove lipases de seis espécies de *Staphylococcus* foram comparadas, incluindo a lipase AF208229 de *S. xylosus*, sendo que foi observada alta similaridade na organização molecular dessas proteínas (ROSENSTEIN; GOTZ, 2000). Uma cepa de *S. xylosus* foi isolada de salame artesanal naturalmente fermentado (FIORENTINI et al, 2007) e um fragmento de DNA correspondente a região madura da lipase AF208229 desta cepa de *S. xylosus* foi clonado, sequenciado e expresso em *E.coli* como proteína-fusão contendo uma cauda de histidina (BROD et al, 2010). A seqüência de DNA desta lipase apresentou 99% de homologia com a seqüência da lipase AF208229 da cepa de *S. xylosus* DSM20266. Mosbah e colaboradores (2005) caracterizaram uma segunda lipase (AY701336) de *S. xylosus*, sendo que esta lipase apresentou 53% de similaridade com a lipase AF208229.

Geralmente a estrutura tridimensional e a catálise enzimática estão relacionadas com os resíduos conservados nas proteínas de uma mesma família, no entanto, variações são encontradas nos resíduos localizados na superfície da proteína e nas regiões próximas ao sítio de ligação do substrato. Sendo assim, a análise desses resíduos variados pode prover informações sobre a especificidade e a estrutura da proteína (CYGLER et al., 1993; LOTTI et al., 1994).

A mutagênese sítio dirigida tem sido muito empregada para análise da importância de resíduos específicos de aminoácidos na estrutura e atividade de proteínas. Esta técnica tem sido empregada para analisar a lipase AY701336 de *S. xylosus* (MOSBAH et al., 2006; MOSBAH et al., 2007), no entanto, para lipase AF208229, que apresenta 99% de identidade na seqüência de nucleotídeos com a lipase utilizada neste trabalho (BROD et al, 2010), este é o primeiro estudo que tem por objetivo elucidar aminoácidos importantes para sua atividade.

A importância do resíduo glicina 311 para a lipase de *S. xylosus* AY701336 foi analisado através da substituição deste resíduo por leucina, triptofano, aspartato ou lisina, e foi observado que a atividade específica dos mutantes diminuía conforme aumentava a cadeia lateral do aminoácido substituído, sendo que a lipase que continha triptofano não apresentou

nenhuma atividade frente aos substratos, tributirina, óleo de oliva e fosfatidilcolina. Outro fato observado, foi que a mudança da glicina 311 por um resíduo básico ou ácido (lisina ou aspartato) proporcionou uma mudança no pH ótimo, que passou de 8 para 9,5 ou 6,5, respectivamente (MOSBAH et al., 2007). Em virtude da mudança no pH ótimo observado por Mosbah e colaboradores (2007) após a substituição do aminoácido 311 por lisina ou aspartato, o objetivo deste estudo foi realizar a substituição do resíduo valina 309 da lipase de *S.xylosus* AF208229 (BROD et al., 2010), que corresponde ao resíduo 311 da lipase AY701336, pelos aminoácidos aspartato ou lisina, e caracterizar bioquimicamente as enzimas mutantes.

2. Material e Métodos

2.1. Cepas bacterianas, plasmídeos e compostos químicos

A cepa *E. coli* DH5 α foi usada para clonagem dos genes e propagação dos plasmídeos, e a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS foi utilizada para expressão da proteína recombinante. O plasmídeo pET-14b (Novagen) foi usado como vetor de expressão. A *Tli* DNA polimerase e as enzimas de restrição foram adquiridas pela Promega, e a resina de Níquel (Ni-NTA) da QIAGEN. O butirato de *p*-nitrofenila e o isopropil-L-tio- β -D-galactopiranosídeo (IPTG) foram adquiridos pela Sigma.

2.2. Mutagênese Sítio Dirigida de lipase de *S. xylosus*

O plasmídeo *pET14b_lip* (BROD et al., 2010) foi usado como molde para a construção dos plasmídeos mutantes através da PCR mutagênese sítio dirigida. Os iniciadores descritos na tabela 2.1 foram desenhados para introduzir no lugar da valina 309 os aminoácidos mutantes aspartato ou lisina. Para construção de cada proteína mutante foram realizadas três ampliações. A primeira e segunda PCR foram realizadas com 0.5 μ M de cada iniciador (LipF e AspR; LipR e AspF; LipF e LysR; LipR e LysF) e 1 μ L de *pET14b_lip*. A terceira PCR foi realizada com 2 μ M de cada iniciador (LipF e LipR) e 1 μ L dos produtos da primeira e da segunda amplificação. A reação de amplificação foi realizada com volume final de 50 μ L contendo 1 X Tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e 1 U de *Tli* DNA polimerase. As reações foram realizadas em termociclador (MJ Research Inc., Watertown, MA) nas seguintes condições: desnaturação a

95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1 min, 50°C por 1 min e 74°C por 1.5 min, e extensão final a 74°C por 7 min.

Tabela 2.1. Iniciadores utilizados na mutagênese sítio dirigida para construção dos mutantes.

Mutantes	Iniciador	Sequencia do iniciador
	LipF	5'-GGATTCTCGAGCAAGGACAGTATAAAAACC-3'
	LipR	5'-TATTACGGATCCTCAGTAGGATGATT-3'
Mut-Asp	AspF	5'-GAAAATGACGGCTTAG <u>ATT</u> TCTACTATTTTCATCACAA-3'
	AspR	5'-TTGTGATGAAATAGTAGA <u>AT</u> CTAAGCCGTCATTTTC-3'
Mut-Lys	LysF	5'-GAAAATGACGGCTTAA <u>AA</u> TCTACTATTTTCATCACAA-3'
	LysR	5'-TTGTGATGAAATAGTAGA <u>TTT</u> TAAGCCGTCATTTTC-3'

A mutação foi introduzida nos nucleotídeos sublinhados.

2.3. Construção do vetor de expressão *pET14b_mutAsp* e *pET14b_mutLys*

Os produtos da terceira amplificação foram isolados e digeridos com *Bam*HI/*Xho*I. O fragmento de DNA obtido da digestão foi ligado ao vetor pET14b previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. Os plasmídeos recombinantes foram chamados de *pET14b_mutAsp* e *pET14b_mutLys*, e foram usado para transformar a cepa de *E. coli* DH5 α . A presença do inserto apropriado foi determinado por PCR e análise de restrição com *Eco*RI. O sequenciamento e análise do inserto mutante foi realizado em MegaBace1000 (Amersham Biosciences, Piscataway) no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

2.4. Expressão e Purificação de Lipase

Os plasmídeos recombinantes *pET14b_mutAsp* e *pET14b_mutLys* foram utilizados para transformar a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. As três *E. coli* transformadas contendo os plasmídeos *pET14b_lip*, *pET14b_mutAsp* e *pET14b_mutLys* foram cultivadas em 250 mL de meio LB contendo 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol a 37°C até atingirem a DO₆₀₀ de 0,8. Cinco horas após a adição de 1 mM de IPTG ao meio de cultivo incubado a 30°C, as células foram centrifugadas (3000x g, 15 min, 4°C) e o precipitado lavado com 50mM NaH₂PO₄, pH 8,0. As células foram ressuscendidas no tampão A (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM, pH 8.0) e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PMSF, e em seguida foram sonicadas (7 ciclos de 20s) em banho de gelo. Após centrifugação (10000x g,

20 min, 4°C), 3 mL do sobrenadante contendo a respectiva lipase recombinante foi misturada com 1.5 mL de resina de afinidade de níquel (Ni-NTA, QIAGEN) previamente equilibrada com tampão A, e permaneceu sob agitação a 4°C por 1h, para então ser adicionada a coluna. A coluna foi lavada com 32 mL de tampão A contendo 40 mM de imidazol. A proteína recombinante foi eluída em 4 alíquotas de 1 mL, utilizando tampão A contendo 250 mM de imidazol. 1 mL da proteína eluída foi dialisada 2 vezes com 1 L de tampão NaH₂PO₄ 50 mM contendo NaCl 300 mM (pH 8.0). A pureza e massa molecular aparente foi determinada por gel de eletroforese SDS poliacrilamida 10% (m/v), no sistema Bio-Rad Mini- PROTEAN[®]. O SDS-PAGE foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorado com metanol/ácido acético/água (5:1:4 v/v/v). A concentração de proteína foi determinada por Bradford usando Bio-Rad Protein Assay e BSA (Soro Albumina Bovina) como padrão.

2.5. Avaliação da atividade da Lipase

A atividade enzimática foi determinada de acordo com Maia *et al.* (2001) usando butirato de *p*-nitrofenila (pNPC₄) como substrato. A produção do *p*-nitrofenol liberado foi monitorada a 410 nm em espectrofotômetro de placa (TECAN Infinite Series M200) por 30 min, em um volume final de reação de 300 µL. Uma solução estoque de 20 mM de pNPC₄ foi preparada em isopropanol e diluído em Tris-HCl 50 mM, pH 9,0, para concentração final de pNPC₄ 1 mM, no momento do ensaio enzimático. Então, 30 µL da solução de enzima foi adicionada a 270 µL da solução de reação. O ensaio da atividade foi realizado a 42°C, pH 9,0, por 30 min. Para cada parâmetro analisado foi realizado um ensaio controle (em duplicata), composto pelas mesmas condições das amostras exceto a solução enzimática que foi substituída pelo tampão utilizado na diálise. O coeficiente de absorvidade molar do *p*-nitrofenol foi determinado experimentalmente como 18015,43 M⁻¹ cm⁻¹. Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de *p*-nitrofenol por minuto. Para cada enzima analisada (WT-Val, Mut-Asp Mut-Lys) os resultados foram expressos como média ± erro padrão de três ensaios independentes, cada um realizado em triplicata, totalizando n=9.

Efeito do pH

O efeito do pH foi investigado avaliando a atividade em pH de 5,0 a 9,0. Os tampões usados para este ensaio foram acetato 50 mM, pH 5,0, fosfato 50 mM, pH 6,0 e 7,0, e Tris-HCl 50mM, pH 8,0 e 9,0. A reação foi realizada misturando o tampão apropriado com a solução estoque de pNPC₄ 20 µM a fim de obter concentração final de substrato 1 mM. A reação foi

iniciada pela adição de 30 μL da solução enzimática em 270 μL de solução de substrato. A absorvidade molar do *p*-nitrofenol foi determinada experimentalmente para cada pH analisado, sendo de 5487,25 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (pH 5,0 e 6,0), 9554,33 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (pH 7,0), 18015,43 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (pH 8,0) e 18669,31 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (pH 9,0).

Efeito da Temperatura

O efeito da temperatura foi investigado a 28°C, 35°C e 42°C em espectrofotômetro de placa (TECAN Infinite Series M200) sob as condições padrões descritas acima.

Ensaio de Termoestabilidade

A termoestabilidade da lipase recombinante foi analisada incubando a solução de enzima a 80°C. Depois de 10, 20 e 30 minutos a 80°C, as enzimas foram incubadas por 10 min a 42°C e então se procedeu a medida da atividade a 42°C, pH 9,0 usando butirato de *p*-nitrofenila como substrato, sob as condições padrões descritas acima.

Parâmetros cinéticos

Para análise dos parâmetros cinéticos, a atividade da lipase foi medida em função de varias concentrações (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2 e 3 mM) de pNPC₄. O ensaio de atividade foi realizado a 42°C, pH 9,0, por 30 min. Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten: constante de afinidade (K_m), velocidade máxima (V_{max}) e número de *turnover* (k_{cat}) foram calculados a partir dos dados experimentais usando o programa GraphPad Prism 5.01. A eficiência catalítica (K_m/k_{cat}) também foi determinada. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, cada um realizado em triplicata, totalizando n=9.

3. Resultados e Discussão

3.1. Construção dos plasmídeos mutantes

A lipase recombinante de *S. xylosus* correspondente a lipase selvagem (WT-Val) foi previamente clonada, seqüenciada e expressa em *E. coli* BL21 (DE3) usando o vetor de expressão pET-14b (BROD et al., 2010a). O plasmídeo *pET14b_lip* (BROD et al., 2010) foi

usado para construção dos plasmídeos mutantes através da PCR mutagênese sítio-dirigida. Os códons para aspartato 309 e lisina 309 foram introduzidos no lugar do códon de valina 309 a fim de expressar em *E. coli* as lipases recombinantes mutantes Mut-Asp e Mut-Lys. Os vetores de expressão das lipases mutantes *pET14b_mutAsp* e *pET14b_mutLys*, foram construídos pela inserção de um fragmento de 1084 bp, correspondente as seqüências mutantes, no pET14b.

A primeira transformação foi realizada com células *E. coli* DH5 α competentes, as colônias positivas foram cultivadas em meio LB contendo ampicilina e o plasmídeo correspondente foi isolado. O fragmento de inserção foi confirmado pela digestão com *EcoRI*. A presença da mutação e a ausência de mutações aleatórias oriundas da PCR foram verificadas através do sequenciamento do DNA. A análise das seqüências mostrou que ambas as mutações foram realizadas com sucesso (dados suplementares 2.5). O aminoácido valina 309 foi modificado por um aspartato e uma lisina nas lipases Mut-Asp e Mut-Lys, respectivamente. Nenhuma outra mudança foi observada nas seqüências de DNA. Os plasmídeos *pET14b_mutAsp* e *pET14b_mutLys* foram introduzidos na *E. coli* BL21 (DE3) pLysS para expressão das lipases recombinantes Mut-Asp e Mut-Lys.

A análise da seqüência de aminoácidos da lipase selvagem de *Staphylococcus xylosus* utilizada neste trabalho (WT-Val) apresentou 99 % de homologia com a da lipase AF208229 (ROSENSTEIN; GOTZ, 2000). Uma segunda lipase de *Staphylococcus xylosus* (AY701336) foi clonada, seqüenciada, expressa e caracterizada (MOSBAH et al., 2005), sendo que esta lipase AY701336 apresenta identidade, na seqüência de aminoácidos, de 54 % com a lipase utilizada neste trabalho. O alinhamento da seqüência da lipase AY701336 com a lipase AF208229 mostra que o resíduo glicina 311 da lipase AY701336 corresponde ao resíduo valina 309 da lipase utilizada neste trabalho. Conforme modelo molecular desenhado por Mosbah et al. (2005), o resíduo 311 esta localizado na vizinhança da região do sitio ativo. A análise do alinhamento da seqüência da lipase AY701336 mostra que a glicina 311 esta a uma distancia de apenas 2 aminoácidos do aminoácido catalítico ácido, aspartato, que compõem a tríade catalítica. Após alinhamento (BLAST) da lipase AF208229 com outras lipases de *Staphylococcus spp.* foi possível observar que esta lipase também possui 2 aminoácidos entre o resíduo 309 e o aspartato 306 que compõem a tríade catalítica juntamente com a serina 115 e a histidina 345.

3.2. Expressão e purificação das lipase mutantes

As duas lipases recombinantes mutantes Mut-Asp e Mut-Lys, e também a WT-Val, contêm 6 histidinas na região N-terminal, que permite a purificação das proteínas por cromatografia de afinidade por resina de níquel (Ni-NTA). Durante a purificação, as três lipases com cauda de histidina permaneceram ligadas a resina, e foram eluídas usando imidazol. O imidazol remanescente, capaz de interferir no ensaio de atividade, foi removido por diálise utilizando tampão fosfato. Depois da purificação das proteínas, foi observado no SDS-PAGE em condições não desnaturantes, uma banda de aproximadamente 42 KDa (dados suplementares 2.6), correspondente as lipases WT-Val, Mut-Asp e Mut-Lys.

3.3. Efeito do pH e da temperatura na atividade da lipase

A atividade específica das lipases recombinantes WT-Val, Mut-Asp e Mut-Lys foi determinada por monitoramento da produção de *p*-nitrofenol proveniente da hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila (pNPC₄) a 410nm. O efeito do pH na atividade de hidrólise das lipases recombinantes mutantes e selvagem foi investigada na faixa de 5,0 – 9,0 (Figura 1). Todas as enzimas apresentaram atividade ótima em pH 9,0, sendo que a maior atividade foi observada para Mut-Lys no pH 9,0, a 42°C, e esta atividade foi considerada como 100 %. Nas mesmas condições, Mut-Asp e WT-Val apresentaram atividade de 67 % e 57 %, respectivamente. Para cada enzima, a menor atividade foi observada em pH 7,0, sendo 37 % para WT-Val, 26 % para Mut-Asp e 39 % para Mut-Lys (Figura 2.1). A atividade para a lipase WT-Val, Mut-Asp e Mut-Lys no pH 5,0 foi de 55 %, 49 % e 46 %, respectivamente.

As lipases geralmente apresentam maior atividade em pH alcalino. Esta característica também foi observada para esta lipase, sendo o pH 9,0 o ótimo para esta enzima (BROD et al, 2010). Porém, a modificação do aminoácido valina 309 por lisina e aspartato mostrou um significativo aumento da atividade de hidrólise, em pH 9,0, para as lipases Mut-Asp e Mut-Lys (Figura 2.1), sendo que a maior atividade foi observada pela adição do aminoácido básico (Mut-Lys) no lugar do aminoácido apolar (WT-Val). Já em pH 5,0 a lipase mutante que apresenta em sua estrutura o aminoácido ácido (Mut-Asp) foi mais ativa que a lipase Mut-Lys. Resultados diferentes foram apresentados por Mosbah e colaboradores (2007), que observaram uma mudança no pH ótimo de 8,5 para 9,5 e 6,5 quando a glicina foi substituída por lisina e aspartato, respectivamente.

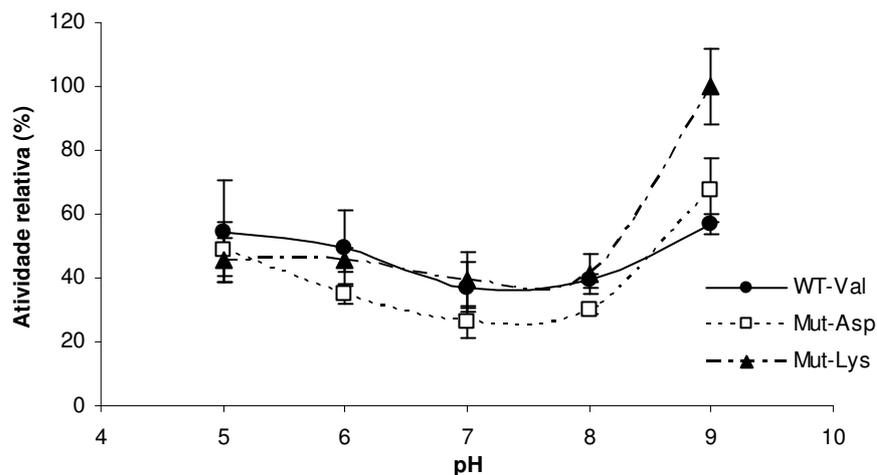


Figura 2.1. Efeito do pH na atividade das lipases recombinantes de *S. xylosus* selvagem (WT-Val) e mutantes (Mut-Asp e Mut-Lys). A atividade enzimática foi realizada com pNPC₄ usando diferentes tampões: acetato 50 mM (pH 5,0), fosfato 50 mM (pH 6,0 e 7,0), Tris-HCl 50 mM (pH 8,0 e 9,0). Os resultados correspondem à média \pm erro padrão de três purificações independentes (n=9).

O efeito da temperatura na atividade das lipases recombinantes WT-Val, Mut-Asp e Mut-Lys foi analisado a 28°C, 35°C e 42°C, em pH 9,0 (Figura 2.2). Nas condições analisadas, a atividade mais elevada foi observada a 42°C para todas as enzimas. A maior atividade foi observada para lipase recombinante Mut-Lys (100 %) a 42°C, seguido pela Mut-Asp (72 %) e WT-Val (63 %). A atividade das lipases WT-Val, Mut-Asp e Mut-Lys a 35°C foi de 63 %, 72 % e 73 %, e a 28°C foi de 52 %, 57 % e 68 %, respectivamente.

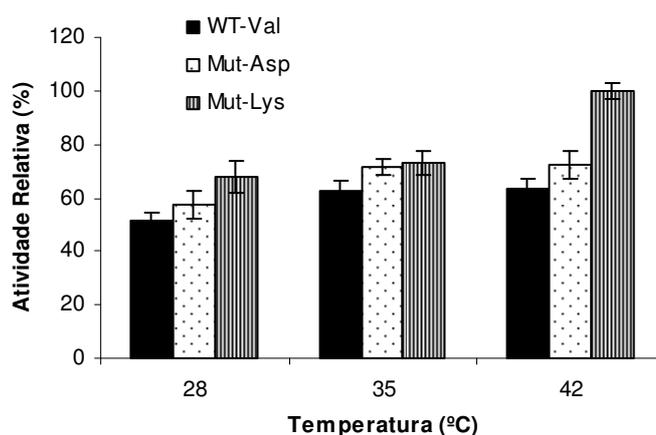


Figura 2.2. Efeito da temperatura na atividade das lipases recombinantes de *S. xylosus* selvagem (WT-Val) e mutantes (Mut-Asp e Mut-Lys). A atividade enzimática foi realizada com pNPC₄ em pH 9,0. Os resultados correspondem a média \pm erro padrão de três purificações independentes (n=9).

O efeito da temperatura na atividade da lipase recombinante esta de acordo com o que foi apresentado previamente (BROD et al., 2010a), onde a atividade máxima foi observada a 42°C. A mesma temperatura de atividade máxima observada para as lipases mutantes Mut-Asp e Mut-Lys e a lipase WT-Val, indica que a modificação no aminoácido 309, nas temperaturas analisadas, não influenciou na mudança da temperatura de maior atividade observada. Por outro lado, a atividade máxima a 42°C é consideravelmente maior para Mut-Lys em relação a WT-Val. Em geral, as lipases do gênero *Staphylococcus* apresentam atividade ótima em temperaturas menores que 37°C, sendo 25°C para *S. warneri* (TALON et al., 1995), 30°C para *S. saprophyticus* (SAKINÇ et al., 2007) e 37°C para o *S. simulans* (SAYARI et al., 2001). Atividade máxima em temperaturas maiores foram reportadas para as lipases de *S. aureus* (SAL3) (HORCHANI et al., 2009) e *S. epidermidis* (ESAKKIRAJ et al., 2010) que apresentaram atividade ótima a 50°C. A lipase AY101336 de *S. xylosus* apresentou atividade ótima a 45°C (MOSBAH et al., 2005).

A estabilidade térmica é um fator importante e atrativo para a aplicação industrial das lipases. A termoestabilidade do biocatalisador permite uma maior temperatura de operação, o que é claramente vantajoso, devido a maior reatividade proporcionada pela diminuição da resistência de difusão do meio reacional. Este aumento na temperatura de reação permite também maior estabilidade e rendimento do processo, ocasionado pelo aumento da solubilidade dos substratos e produtos, além de ocasionar menor viscosidade e problemas com contaminação (HASAN et al., 2006).

A lipase de *S. xylosus* apresenta estabilidade térmica, visto que, depois de incubada por 10 min a 95°C, 77 % da atividade inicial foi mantida (Brod et al, 2010a). Neste trabalho, as enzimas recombinantes WT-Val, Mut-Asp e Mut-Lys foram incubadas a 80°C por 10, 20 e 30 min. Após o tratamento térmico, a atividade das lipases foi medida a 42°C, em pH 9,0, usando como substrato o pNPC₄ e todas as lipases mantiveram a atividade inicial, sendo que um pequeno aumento foi observado (Figura 3). Já a lipase recombinante AY701336 de *S. xylosus* e suas mutantes não apresentaram atividade após serem incubadas por 30 min em temperaturas acima de 60°C (MOSBAH et al., 2007). Informações sobre a termoestabilidade de lipases de *Staphylococcus* ainda são escassas, e entre as existentes, as que demonstraram resultado expressivo são: *S. saprophyticus*, que manteve 80 % da atividade após ser incubada por 15 min a 70°C e 30 % após 15 min a 100°C (SAKINÇ et al., 2007), a lipase AY701336 de *S. xylosus* que manteve 50 % da atividade após ser incubada por 15 min a 60°C (MOSBHA et al., 2007), e a *S. aureus* (SAL3) que manteve 95 % e 50 % da atividade após ser incubada por 60 min a 55°C e 60°C, respectivamente (HORCHANI et al., 2009). Já a lipase de

Staphylococcus simulans, quando incubada por poucos minutos a 60°C foi inativada (SAYARI et al., 2001).

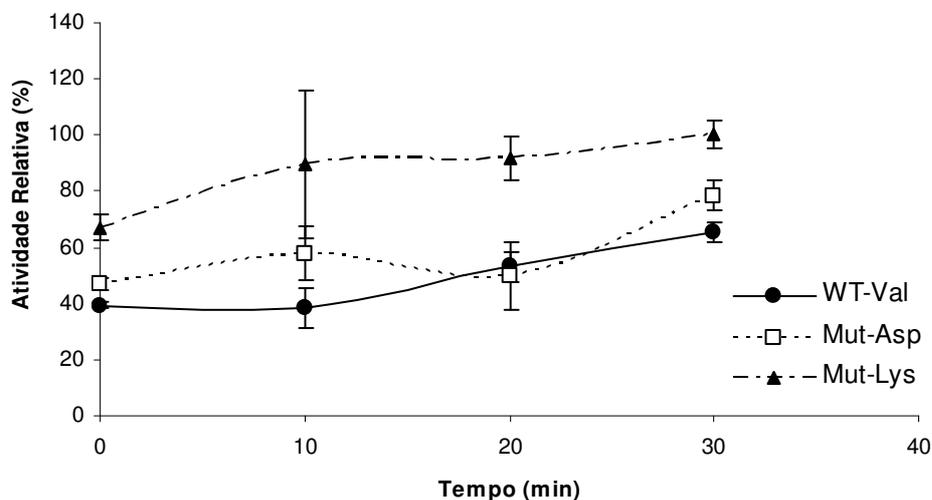


Figura 2.3. Termoestabilidade das lipases recombinantes de *S. xylosus* selvagem (WT-Val) e mutantes (Mut-Asp e Mut-Lys) a 80°C. Atividade enzimática foi realizada com pNPC₄ em pH 9,0 e a 42°C após incubação a 80°C por 10, 20 e 30 min. Resultados correspondem a média ± erro padrão de três purificações independentes (n=9).

Elevada e significativa estabilidade térmica, seguida de um pequeno aumento na atividade, como foi observado para WT-Val, Mut-Asp e Mut-Lys, ainda não foi reportada para lipases de *Staphylococcus*. Uma explicação para a termo-ativação observada pelo pequeno aumento da atividade destas lipases após serem incubadas a 80°C por 10, 20 e 30 min, pode estar relacionada a uma pequena modificação no enovelamento das enzimas após a desnaturação causada pelo aquecimento a 80°C. Lipases termoestáveis e alcalinas são bastante atrativas para a síntese de biopolímeros e biodiesel, e para uso na produção de produtos farmacêuticos, agro-químicos, cosméticos e flavor (HORCHANI et al., 2009).

3.4. Parâmetros cinéticos

As constantes cinéticas foram obtidas a partir do gráfico de Michaelis-Menten (Figura 4), que representa a taxa de hidrólise do pNPC₄ em diferentes concentrações. Os dados cinéticos foram determinados e a velocidade máxima (V_{max}), constante de afinidade (K_m), número de *turnover* (k_{cat}) e eficiência catalítica (K_m/k_{cat}) foram calculados para as três enzimas (tabela 2.2). As lipases Mut-Asp e Mut-Lys apresentaram diferença significativa na atividade

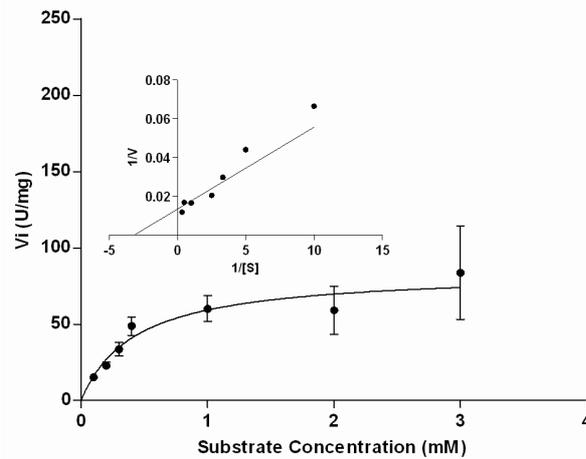
específica de hidrólise do pNPC₄ ($P < 0,05$) em comparação com a lipase WT-Val, sendo que, tanto a atividade específica como a V_{\max} das lipases mutantes foram maiores que a da lipase selvagem mostrando que o aminoácido 309 é importante para catálise enzimática. O valor de K_m para enzimas Mut-Asp e Mut-Lys foi maior que o da WT-Val (0,76 mM, 0,64 mM e 0,43 mM, respectivamente). Resultado diferente foi observado na modificação do aminoácido 311 da lipase AY701336 de *S. xylosus*, onde a adição dos aminoácidos aspartato e lisina fizeram com que a afinidade da enzima pelo substrato aumentasse (MOSBAH et al., 2007). O número de *turnover* (K_{cat}) avalia o número de moléculas de substrato que o centro ativo converte em produto por segundo, já a razão K_{cat}/K_m relaciona a eficiência catalítica da enzima e sua afinidade com o substrato. A avaliação desses parâmetros demonstra que a eficiência catalítica das enzimas mutantes foi maior que a da lipase recombinante selvagem, $0,158 \text{ s}^{-1}$ para Mut-Lys, $0,125 \text{ s}^{-1}$ para Mut-Asp e $0,061 \text{ s}^{-1}$ para WT-Val. Os valores encontrados para a razão k_{cat}/K_m evidencia que o elevado valor encontrado para Mut-Lys ($0,247 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) é devido a maior eficiência catalítica, e que os valores aproximados para WT-Val ($0,141 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) e Mut-Asp ($0,164 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) são devido ao baixo valor de K_m encontrado para lipase recombinante selvagem e elevado K_{cat} observado para lipase recombinante mutante Mut-Asp.

Tabela 2.2. Parâmetros cinéticos das lipases recombinantes selvagem e mutantes de *S. xylosus*.

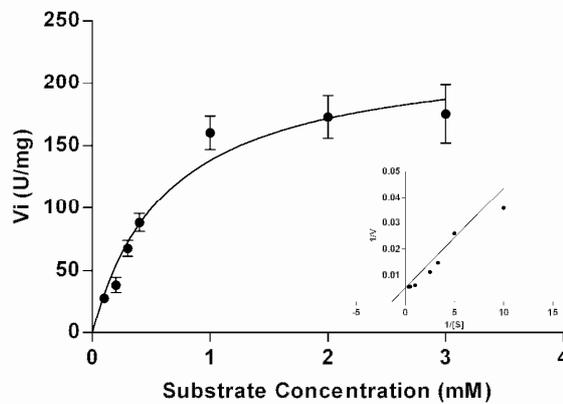
Lipase	Atividade Específica (U/mg)	V_{\max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
WT-Val	60,0 ± 8,4 ^a	84,6 ± 14,0	0,43 ± 0,21	0,061	0,141
Mut-Asp	135,5 ± 11,0 ^b	179,7 ± 21,6	0,76 ± 0,22	0,125	0,164
Mut-Lys	160,4 ± 13,3 ^b	226,5 ± 18,8	0,64 ± 0,14	0,158	0,247

Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de três purificações independentes (n=9). A diferença significativa foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$) após teste de Tukey.

A



B



C

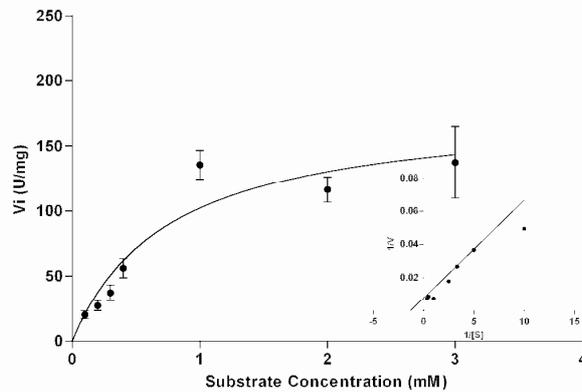


Figura 2.4. Gráficos de Michaelis-Menten das lipases recombinantes de *S. xylosus* (A) WT-Val, (B) Mut-Lys e (C) Mut-Asp. Os dados cinéticos foram avaliados usando pNPC₄ como substrato. O gráfico menor corresponde ao gráfico de Lineweaver-Burk. O ensaio foi realizada com tampão fosfato 50 mM pH 9,0 a 42°C. Resultados correspondem à média \pm erro padrão de três purificações independentes (n=9).

4. Conclusão

A modificação do aminoácido valina 309 por aspartato e lisina foi realizada com sucesso e nenhuma outra modificação na seqüência do DNA foi observada. Assim como a lipase recombinante selvagem (WT-Val) as lipases mutantes Mut-Asp e Mut-Lys também mostraram ser termoestáveis após incubação a 80°C. Em relação aos pHs analisados, foi observada atividade ótima em pH 9,0 para as três lipases, no entanto, a lipase que contem o aminoácido básico (Mut-Lys) apresentou atividade especifica maior. A substituição do resíduo valina 309 por um aminoácido com cadeia lateral ácida (aspartato) ou básica (lisina) proporcionou um aumento significativo na atividade específica da enzima e duplicou sua eficiência catalítica, sendo que a eficiência foi maior com adição do aminoácido básico. Estes resultados comprovam que o resíduo de aminoácido 309 possui um papel importante na catálise enzimática e sua modificação por um aminoácido básico é capaz de aumentar a atividade da lipase.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo CNPq processo 552508/2007-1. DJK foi bolsista da CAPES.

DADOS SUPLEMENTARES

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                10         20         30         40         50
WT-Val      CAAGGACAGT ATAAAAACCA AGATCCTATC ATTTTAGTGC ATGGTTTCAA
Mut-Asp    CAAGGACAGT ATAAAAACCA AGATCCTATC ATTTTAGTGC ATGGTTTCAA
Mut-Lys    CAAGGACAGT ATAAAAACCA AGATCCTATC ATTTTAGTGC ATGGTTTCAA
Clustal Co *****

```

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                60         70         80         90        100
WT-Val      TGGCTTTACT GATGATATTA ATCCAGCGGT ATTAGCCCAT TATTGGGGTG
Mut-Asp    TGGCTTTACT GATGATATTA ATCCAGCGGT ATTAGCCCAT TATTGGGGTG
Mut-Lys    TGGCTTTACT GATGATATTA ATCCAGCGGT ATTAGCCCAT TATTGGGGTG
Clustal Co *****

```

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                110        120        130        140        150
WT-Val      GAGATAAATT GAATATCCGC CAAGATTTAG AAAGTAATGG TTATGAAACA
Mut-Asp    GAGATAAATT GAATATCCGC CAAGATTTAG AAAGTAATGG TTATGAAACA
Mut-Lys    GAGATAAATT GAATATCCGC CAAGATTTAG AAAGTAATGG TTATGAAACA
Clustal Co *****

```

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                160        170        180        190        200
WT-Val      TACGAAGCGA GCGTTGGTGC ATTAAGTAGT AACTACGATC GTGCCGTTGA
Mut-Asp    TACGAAGCGA GCGTTGGTGC ATTAAGTAGT AACTACGATC GTGCCGTTGA
Mut-Lys    TACGAAGCGA GCGTTGGTGC ATTAAGTAGT AACTACGATC GTGCCGTTGA
Clustal Co *****

```

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                210        220        230        240        250
WT-Val      GCTTTATTAC TATATTAAGG GTGGCACGGT AGATTATGGT GCAGCCCATG
Mut-Asp    GCTTTATTAC TATATTAAGG GTGGCACGGT AGATTATGGT GCAGCCCATG
Mut-Lys    GCTTTATTAC TATATTAAGG GTGGCACGGT AGATTATGGT GCAGCCCATG
Clustal Co *****

```

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                260        270        280        290        300
WT-Val      CTGAGAAGTA CGGTCATGAA CGTTATGGTA AAACATATGA AGGTGTATAT
Mut-Asp    CTGAGAAGTA CGGTCATGAA CGTTATGGTA AAACATATGA AGGTGTATAT
Mut-Lys    CTGAGAAGTA CGGTCATGAA CGTTATGGTA AAACATATGA AGGTGTATAT
Clustal Co *****

```

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                310        320        330        340        350
WT-Val      AAAGATTGGC AACCAGGTAA AAAAGTTCAC TTAGTGGCTC ATAGTATGGG
Mut-Asp    AAAGATTGGC AACCAGGTAA AAAAGTTCAC TTAGTGGCTC ATAGTATGGG
Mut-Lys    AAAGATTGGC AACCAGGTAA AAAAGTTCAC TTAGTGGCTC ATAGTATGGG
Clustal Co *****

```

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                360        370        380        390        400

```

```

WT-Val      TGGACAAACA GTGAGACAAC TTGAAGAATT ATTGCGTAAC GGTAATCAAG
Mut-Asp     TGGACAAACA GTGAGACAAC TTGAAGAATT ATTGCGTAAC GGTAATCAAG
Mut-Lys     TGGACAAACA GTGAGACAAC TTGAAGAATT ATTGCGTAAC GGTAATCAAG
Clustal Co  *****
            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            410      420      430      440      450
WT-Val      AAGAAATAGA ATATCAAAAA GAACATGGCG GTGAGATTTC TCCACTATTC
Mut-Asp     AAGAAATAGA ATATCAAAAA GAACATGGCG GTGAGATTTC TCCACTATTC
Mut-Lys     AAGAAATAGA ATATCAAAAA GAACATGGCG GTGAGATTTC TCCACTATTC
Clustal Co  *****

            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            460      470      480      490      500
WT-Val      CAAGGCAATA ACGATAATAT GGTGAATTCA ATTACTACTA TTGGTACGCC
Mut-Asp     CAAGGCAATA ACGATAATAT GGTGAATTCA ATTACTACTA TTGGTACGCC
Mut-Lys     CAAGGCAATA ACGATAATAT GGTGAATTCA ATTACTACTA TTGGTACGCC
Clustal Co  *****

            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            510      520      530      540      550
WT-Val      TCATAATGGT ACACATGCTG CAGATGCATT AGGTAATGAG GCGATAGTTA
Mut-Asp     TCATAATGGT ACACATGCTG CAGATGCATT AGGTAATGAG GCGATAGTTA
Mut-Lys     TCATAATGGT ACACATGCTG CAGATGCATT AGGTAATGAG GCGATAGTTA
Clustal Co  *****

            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            560      570      580      590      600
WT-Val      GACAATTAGC ATTTGATTAC GCCAAATTCA AAGGTAATAA AAACACTCAAAA
Mut-Asp     GACAATTAGC ATTTGATTAC GCCAAATTCA AAGGTAATAA AAACACTCAAAA
Mut-Lys     GACAATTAGC ATTTGATTAC GCCAAATTCA AAGGTAATAA AAACACTCAAAA
Clustal Co  *****

            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            610      620      630      640      650
WT-Val      GTAGATTTTG GTTTTGGCCA GTGGGGTCTT AAACAGAGAG AAGGAGAAAC
Mut-Asp     GTAGATTTTG GTTTTGGCCA GTGGGGTCTT AAACAGAGAG AAGGAGAAAC
Mut-Lys     GTAGATTTTG GTTTTGGCCA GTGGGGTCTT AAACAGAGAG AAGGAGAAAC
Clustal Co  *****

            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            660      670      680      690      700
WT-Val      GTACGCTCAA TACGTACAAC GCGTTCAAAA TAGCGGATTA TGGAAAACAG
Mut-Asp     GTACGCTCAA TACGTACAAC GCGTTCAAAA TAGCGGATTA TGGAAAACAG
Mut-Lys     GTACGCTCAA TACGTACAAC GCGTTCAAAA TAGCGGATTA TGGAAAACAG
Clustal Co  *****

            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            710      720      730      740      750
WT-Val      AAGACAACGG ATTTTATGAT TTGACTAGGG AAGGTGCTGC TAAATTAAT
Mut-Asp     AAGACAACGG ATTTTATGAT TTGACTAGGG AAGGTGCTGC TAAATTAAT
Mut-Lys     AAGACAACGG ATTTTATGAT TTGACTAGGG AAGGTGCTGC TAAATTAAT
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                760       770       780       790       800
WT-Val      AAAAAACACAT CGTTAAACCC TAACATTGTC TATAAAACAT ACACTGGAGA
Mut-Asp     AAAAAACACAT CGTTAAACCC TAACATTGTC TATAAAACAT ACACTGGAGA
Mut-Lys     AAAAAACACAT CGTTAAACCC TAACATTGTC TATAAAACAT ACACTGGAGA
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                810       820       830       840       850
WT-Val      ATCAACAAGA CCTACTTTGT TTGGCAATCA AAAATCCGAT GTTAATTTGT
Mut-Asp     ATCAACAAGA CCTACTTTGT TTGGCAATCA AAAATCCGAT GTTAATTTGT
Mut-Lys     ATCAACAAGA CCTACTTTGT TTGGCAATCA AAAATCCGAT GTTAATTTGT
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                860       870       880       890       900
WT-Val      TCCTACCATT TACTGTAACG GGTAATGTAA TTGGCAAAGC TGCAGAAAAA
Mut-Asp     TCCTACCATT TACTGTAACG GGTAATGTAA TTGGCAAAGC TGCAGAAAAA
Mut-Lys     TCCTACCATT TACTGTAACG GGTAATGTAA TTGGCAAAGC TGCAGAAAAA
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                910       920       930       940       950
WT-Val      GAATGGCGTG AAAATGACGG CTTAGTCTCT ACTATTTTCAT CACAACATCC
Mut-Asp     GAATGGCGTG AAAATGACGG CTTAGATTTCT ACTATTTTCAT CACAACATCC
Mut-Lys     GAATGGCGTG AAAATGACGG CTTAAAAATCT ACTATTTTCAT CACAACATCC
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                960       970       980       990       1000
WT-Val      ATTTAATCAA GCCTTTATAG AAGCTACGGA CGAAGTGAAA AAAGGTGTAT
Mut-Asp     ATTTAATCAA GCCTTTATAG AAGCTACGGA CGAAGTGAAA AAAGGTGTAT
Mut-Lys     ATTTAATCAA GCCTTTATAG AAGCTACGGA CGAAGTGAAA AAAGGTGTAT
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                1010      1020      1030      1040      1050
WT-Val      GGCAAGTGAC TCCAATTAAT CACGGTTGGG ACCATGTAGA TTTTGTGGT
Mut-Asp     GGCAAGTGAC TCCAATTAAT CACGGTTGGG ACCATGTAGA TTTTGTGGT
Mut-Lys     GGCAAGTGAC TCCAATTAAT CACGGTTGGG ACCATGTAGA TTTTGTGGT
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ...|
                1060      1070      1080
WT-Val      CAAGATTCTA CTGACTCAAA TCATCCTACT GAGG
Mut-Asp     CAAGATTCTA CTGACTCAAA TCATCCTACT GAGG
Mut-Lys     CAAGATTCTA CTGACTCAAA TCATCCTACT GAGG
Clustal Co  *****

```

Figura 2.5. Alinhamento das seqüências das lipases recombinante de *S. xylosus* WT-Val, Mut-Asp e Mut-Lys utilizando o programa ClustalX 2.0.9. (*) Nucleotídeo idêntico nas 3 seqüência.

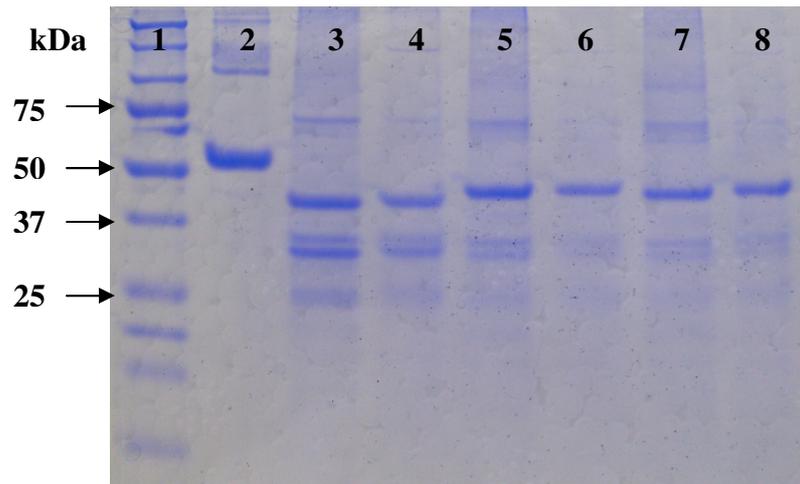


Figura 2.6. Eletroforese em gel de acrilamida 10% sob condições não desnaturante das proteínas purificadas. Canaleta 1: Padrão molecular; linha 2: BSA; canaleta 3 e 4: WT-Val; canaleta 5 e 6: Mut-Asp; canaleta 7 e 8: Mut-Lys.

CAPÍTULO 3

IMOBILIZAÇÃO DE ESTERASE RECOMBINANTE DE *Lactobacillus plantarum* EM POLIPROPILENO ACCUREL MP1000

Artigo a ser submetido a revista *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

IMOBILIZAÇÃO DE ESTERASE RECOMBINANTE DE *Lactobacillus plantarum* EM POLIPROPILENO ACCUREL MP1000

Deise Juliana Kolling^a, Willian Alexandre Suguino^a, Fábio Cristiano Angonesi Brod^a, Ana Carolina Maisonnave Arisi^{a*}

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, Brasil.

Resumo

Uma esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum* foi previamente isolada, clonada, seqüenciada, purificada e caracterizada. Neste trabalho o lisado celular de *E.coli* expressando esta esterase recombinante foi imobilizado no suporte hidrofóbico polipropileno (Accurel MP1000) pelo processo de adsorção. A imobilização foi realizada em meio aquoso (PBS 24 mM, pH 7.0) na proporção de 100 mg de suporte para 3 mL de solução enzimática e a eficiência do processo de adsorção foi 68,7 % e a quantidade de enzima adsorvida ao suporte foi de 12,4 mg/g de suporte. A atividade enzimática foi determinada usando butirato de *p*-nitrofenila e a temperatura ótima da enzima imobilizada foi 50°C e da enzima livre 30°C. A termoestabilidade da enzima imobilizada também foi maior que a da enzima livre, sendo as atividades residuais de 91 % e 56 % respectivamente, após serem incubadas por 30 min a 80°C. Após a imobilização, a esterase recombinante de *L. plantarum* apresentou menor afinidade pelo substrato do que quando se encontrava em solução. Não foi observado desprendimento de proteína do suporte após 3 ciclos contínuos e a enzima imobilizada mostrou estabilidade na atividade de hidrólise até a terceira semana após ser imobilizada.

Palavras chaves: Esterase, *Lactobacillus plantarum*, imobilização, Accurel MP1000.

1. Introdução

As Esterases (EC 3.1.1.x) pertencem ao grupo das hidrolases e catalisam a clivagem e formação de ligações ésteres. As carboxil ester hidrolases são subdivididas em 83 grupos (ENZYME NOMENCLATURE, 2010) sendo que os dois maiores grupos pertencem as lipases (EC 3.1.1.3) e as ‘verdadeiras” esterases (EC 3.1.1.1) (BORNSCHEUER, 2002). Estas enzimas catalisam diferentes reações e são usadas na indústria de alimentos, papel, têxtil, no tratamento de resíduos e na síntese de fármacos e compostos químicos (ALMEIDA et al., 2008). Entretanto, a baixa estabilidade e eficiência catalítica das enzimas nativas são consideradas barreiras para o aplicação dessas enzimas em larga escala (HUANG; CHENG, 2008). Desta forma, a busca por estratégias para reverter estes problemas vem crescendo, sendo que a imobilização de enzimas tem se mostrado eficiente. A imobilização de enzimas protege a enzima do solvente desnaturante, facilita a separação da enzima no meio reacional, proporciona melhor flexibilidade operacional, melhora a estabilidade térmica e a reutilização da enzima, aumenta a solubilidade do substrato e diminui custos de produção (MATEO, et al. 2007; YAGIZ, et al. 2007; HUANG; CHENG, 2008; KARRA-CHÂABOUNI, et al. 2008).

Existem várias técnicas de imobilização e entre elas a adsorção. No processo de adsorção, a ligação da enzima ao suporte ocorre através de interações iônicas, forças de *Van der Waals* e ligação de hidrogênio, e apresenta como vantagens: preparação simples, de baixo custo, formação de derivados estáveis e não ocasiona mudanças conformacionais na enzima (DALLA-VECCHIA et al., 2004; SÁNCHEZ-OTERO et al., 2008; LEE et al., 2009).

Muitos trabalhos têm mostrado que as lipases são capazes de serem adsorvidas em suportes hidrofóbicos de baixa carga iônica, condição esta que não acontece com outras enzimas (MATEO et al., 2007). Devido a grande hidrofobicidade na superfície ao redor do sitio ativo, a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é considerada vantajosa uma vez que assegura: hiperativação de muitas lipases; alta seletividade na adsorção, possibilitando em alguns casos purificação; maior enantioseletividade; e possibilidade de recuperação do suporte após a desativação da enzima (ALMEIDA et al., 2008).

O suporte polipropileno poroso Accurel tem sido usado para imobilizar diferentes hidrolases por adsorção (GUPTA et al., 2005; SABBANI et al., 2006; SANCHEZ-OTERO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2008). Tem sido também reportado que a imobilização de lipases em Accurel influencia a atividade catalítica e a enantioseletividade (SABBANI et al., 2006). Entre as diferentes matrizes disponíveis, Accurel é um suporte ideal para imobilizar lipases,

pois é hidrofóbico, macroporoso, apresenta baixa densidade e grande área superficial para adsorção, pois apresenta um pequeno tamanho de partícula (BALCAO et al., 1996).

A esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum* usada neste trabalho foi previamente isolada, clonada, seqüenciada, purificada e caracterizada por Brod e colaboradores (2010b). Esta esterase possui massa molecular de 38 kDa, atividade ótima em pH 6,0 à 40°C e apresenta preferência por substrato de cadeia curta, como o butirato de *p*-nitrofenila. A estrutura secundária desta enzima foi investigada por dicróismo circular e a análise do espectro mostrou a presença de 38,6% de folhas β -pregueadas e 23,4% de α -hélice, indicando que esta esterase pode ser incluída no grupo das α/β hidrolases. Neste trabalho, o lisado celular de *E. coli* expressando a esterase recombinante de *L. plantarum* foi imobilizado no suporte hidrofóbico polipropileno Accurel MP-1000 e posteriormente caracterizado bioquimicamente..

2. Material e métodos

2.1. Material

Para expressão da esterase recombinante foram utilizadas cepas *E. coli* BL21(DE3)pLysS e o plasmídeo *pET14b-Est_Lpl* contendo o gene da esterase de *Lactobacillus plantarum* (Brod et al,2010b). Para purificação da proteína recombinante foi utilizada resina de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) adquirida da Qiagen; butirato de *p*-nitrofenila, isopropil-b-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), ampicilina e cloranfenicol, provenientes da Sigma Chemical Co. As bactérias transformadas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com os antibióticos ampicilina e cloranfenicol. O suporte utilizado para imobilização foi o polipropileno microporoso (Accurel MP1000, partícula < 1,5 mm) doado gentilmente por Accurel® Systems.

2.2. Expressão de esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum*

O gene da esterase recombinante utilizada neste trabalho foi previamente isolado, clonado e a proteína expressa em *E. coli* BL21(DE3)pLysS (BROD et al,2010b). Para expressão da esterase recombinante, 50 μ L de um cultivo estoque de *E. coli* BL21(DE3)pLysS contendo o plasmídeo recombinante *pET14b-Est_Lpl* foi adicionado ao meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 μ g/mL) e cloranfenicol (50 μ g/mL). Este pré-cultivo foi mantido a 37°C

overnight sob agitação (140 rpm). Após foi realizado o cultivo onde 10 mL do pré-cultivo foram transferidos para 250 mL de meio LB líquido acrescido dos antibióticos citados anteriormente. As bactérias foram incubadas a 37°C sob agitação (120 rpm), e a densidade ótica (DO) a 600 nm foi monitorada. Quando a DO atingiu o valor de 0,8 foi iniciada a indução da expressão da proteína recombinante adicionando-se IPTG (1 mM) e submetendo o cultivo a 15°C sob agitação (120 rpm) durante 18 h. O cultivo foi centrifugado (3000 g, 15 min, 4°C), o sobrenadante descartado e o precipitado armazenado a -20°C.

2.3. Obtenção do extrato contendo a esterase recombinante

O precipitado citado anteriormente foi ressuspenso em 2 mL de tampão fosfato (50 mM pH 8.0) e 30 µL de PMSF (4 µg/mL). O precipitado foi sonificado (7 ciclos de 20 s com 40 s de intervalo) em gelo e centrifugado (10000 g, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado (10000 g, 20 min, 4°C). Em seguida, o sobrenadante (lisado celular de *E.coli* com alta expressão da esterase recombinante) foi filtrado com membrana Millipore de 0.22 µm e o extrato foi armazenado na geladeira até o momento da imobilização.

2.4. Determinação da concentração protéica

A concentração protéica do extrato foi determinada pelo método de Bradford utilizando o Bio-Rad Protein Assay Kit com albumina sérica bovina como padrão.

2.5. Imobilização em Polipropileno

O processo de imobilização foi adaptado a partir de diferentes metodologias (MINOVSKA et al., 2005; SALIS et al., 2008; SÁNCHEZ-OTERO et al., 2008) sendo realizado seguindo a proporção de 3 mL de extrato (~1mg/mL) dissolvido em PBS pH 7,0 (24mM) e 0,1 g do suporte polipropileno Accurel. Antes da adição do extrato, o suporte foi tratado com 250 µL de etanol 95° (SALIS et al., 2008) e após a adição do extrato permaneceu no agitador orbital a 120 rpm, a 24°C por 18h. Após a imobilização, o suporte foi filtrado e lavado com água ultra pura, permanecendo na geladeira filtrando por um período de aproximadamente 18h, para então ser levado a estufa a 30°C, por 6 h. O suporte contendo a enzima imobilizada foi armazenado na geladeira até o ensaio de atividade. Durante o processo, uma alíquota da solução inicial e a residual (após a imobilização) foi guardada para quantificação protéica e para os posteriores cálculos de rendimento da imobilização. A eficiência da imobilização e a quantidade de enzima retida no suporte foram calculados com as seguintes fórmulas:

Eficiência da Imobilização

$$EF = ((C_O - C_F) \times 100) / C_O$$

Quantidade de enzima retida no suporte

$$La = ((C_O - C_F) \times V) / P$$

Onde:

C_o = concentração de proteína antes da imobilização

C_F = concentração de proteína depois da imobilização

EF = eficiência da adsorção (%)

V = volume (mL) da solução (enzima+substrato+solução reacional)

P = peso do adsorvente usado (g)

La = quantidade de proteína retida no suporte (mg proteína/g suporte)

2.6. Ensaio de atividade enzimática

A atividade enzimática foi realizada em tubos cônicos de 50 mL usando como substrato o butirato de *p*-nitrofenila (pNPC₄), onde o *p*-nitrofenol liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 348nm. A reação enzimática foi composta por 30 mg de suporte contendo enzima imobilizada e 3 mL de tampão de reação (tampão fosfato 50mM pH 6.0) a 40°C, contendo 1 mM do substrato, e permaneceu no agitador orbital (100rpm) a 40°C por 30min. Em seguida, com intuito de parar a reação enzimática, 1 mL do meio reacional foi adicionado a 0,25 mL de solução Na₂CO₃ 0.1M (SÁNCHEZ-OTERO et al., 2008) e submetida a centrifugação por 5min, 24°C, 10000 rpm. Após, foi realizada a leitura de D.O. do sobrenadante no espectrofotômetro (HITACHI U2910). As leituras de D.O. foram realizadas utilizando como branco uma solução que permaneceu sob as mesmas condições da enzima imobilizada, no entanto, o suporte em contato com esta solução não possuía enzima imobilizada. O coeficiente de absorvidade molar foi determinado experimentalmente como 5487,25 M⁻¹ cm⁻¹.

Efeito da Temperatura sobre a atividade enzimática

A análise do efeito da temperatura na atividade da enzima imobilizada foi realizada em quatro diferentes temperaturas: 30, 40, 50 e 60°C. Para isto, o agitador orbital e o tampão de reação utilizado na reação enzimática encontravam-se nestas temperaturas antes da adição do suporte

contendo a enzima imobilizada. Os demais procedimentos foram realizados conforme o ensaio padrão de atividade.

Termoestabilidade

Para analisar a estabilidade térmica, foi adicionado 1 mL de tampão de reação (tampão fosfato 50 mM pH 6,0) a 80°C sobre a enzima imobilizada, e este foi incubado a 80°C por diferentes intervalos de tempo (10, 20, 30 e 60 min). Após foi adicionado 1,850 mL de tampão de reação (temperatura ambiente) e este permaneceu por 10 min a 40°C. Posteriormente foi adicionado 150 µL do substrato pNPC₄ a 20mM e as demais etapas da reação enzimática foram realizadas no agitador orbital conforme ensaio padrão.

Estabilidade operacional

A eficiência da reutilização da enzima imobilizada foi analisada conforme o ensaio padrão. No entanto, neste ensaio o volume final da reação foi de 5 mL e a quantidade de suporte imobilizado de 50 mg. Após a realização do ensaio e leitura da absorbância do *p*-nitrofenol liberado, o suporte imobilizado foi filtrado, lavado com água ultra pura, e novamente utilizado para o ensaio de atividade.

Ensaio de Dessorção

A quantidade de enzima que se desprende do suporte durante o ensaio de atividade foi analisada. Neste ensaio, 30 mg de suporte foram incubados com 2 mL de tampão de reação, sem adição do substrato, a 40°C no agitador orbital (100 rpm). Foram realizadas 3 coletas, de 40 µL, a cada 30 min. Posteriormente a quantificação protéica das alíquotas coletadas foi analisada pelo método de Bradford.

Tempo de Estocagem

Para analisar a estabilidade da enzima imobilizada e estocada a 4°C, foi realizada o ensaio de atividade, semanalmente durante 2 meses, conforme as condições do ensaio padrão.

Cinética Enzimática

A atividade enzimática foi determinada conforme o ensaio padrão, com as seguintes concentrações de substrato no meio reacional: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 1; 2 e 3 mM. Os seguintes parâmetros foram calculados K_m , V_{max} , k_{cat} usando o programa GraphPad Prism 5.01.

3. Resultados e Discussão

Para expressão da esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum* foi utilizada *E. coli* BL21(DE3)pLysS contendo o plasmídeo *pET14b-Est_Lpl* (Brod et al, *in press*). Após indução com IPTG e cultivo em meio líquido a 15°C durante 18h, o cultivo foi centrifugado, ressuspensionado em tampão fosfato e PMSF e sonificado, após o lisado celular foi filtrado em membrana Millipore. O extrato obtido contendo a esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum* solúvel foi imobilizado no suporte polipropileno Accurel MP1000.

A imobilização foi realizada utilizando a técnica de adsorção que causa menos dano na atividade catalítica das enzimas. A imobilização em polipropileno Accurel MP1000 foi realizada com sucesso, sendo que a eficiência do processo de imobilização realizado em triplicata foi de $68,7 \pm 2,9 \%$, e a quantidade de enzima adsorvida ao suporte foi de $12,4 \pm 5,4$ mg/g de suporte. O resultado de enzima adsorvida em polipropileno é maior que o valor encontrado por Sanchez-Otero *et al.* (2008), 8,7 mg/g utilizando extrato de lipase de *Geobacillus thermoleovorans*, e Minovska *et al.* (2005) que utilizou lipase de *Candida rugosa* tipo VII e obteve rendimento de 8,1 mg/g. Já em outro trabalho, que utilizou o mesmo suporte (Accurel MP-1000) e extrato protéico de esterase recombinante de *Pyrococcus furiosus* o valor de proteína adsorvida por grama de suporte foi de 35,3 mg/g (ALMEIDA et al., 2008). Segundo Almeida e colaboradores (2008), existe uma grande variação de resultados dependendo do sistema de adsorção, sendo que a característica da enzima, o tamanho da partícula, a área superficial e o tamanho do poro do suporte são variáveis que parecem desempenhar um papel importante no processo de adsorção.

3.1. Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade da enzima livre e imobilizada

O efeito da temperatura na atividade de hidrólise da enzima livre e imobilizada foi avaliado nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C (Figura 3.1). Observa-se que a enzima livre obteve atividade ótima a 30°C e que o aumento da temperatura causou diminuição na atividade. Já para enzima imobilizada a atividade se manteve constante nas temperaturas testadas, com exceção a 50°C onde a atividade máxima foi observada, sendo esta sua temperatura ótima. Como evidenciado aqui, a manutenção da atividade catalítica da enzima imobilizada em diferentes temperaturas também foi observada em outros trabalhos (KARRACHÂBOUNI et al., 2008; KUMARI et al., 2008). Diversos estudos de imobilização

mostram que em temperaturas acima de 40°C a atividade da enzima imobilizada é maior do que a da enzima livre, fato também observado neste trabalho (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2008; HUANG; CHENG, 2008; PAULA et al., 2008; DENG, et al. 2004; KUMARI et al., 2008).

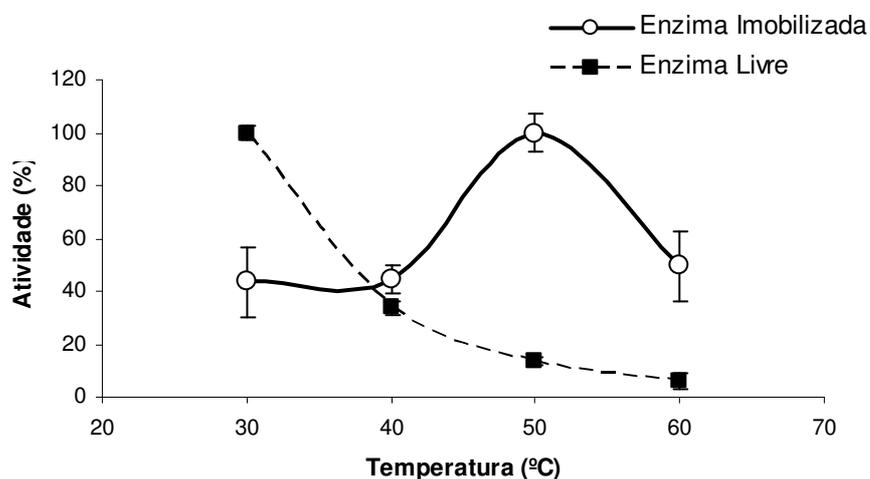


Figura 3.1. Efeito da temperatura na esterase de *L. plantarum* livre e imobilizada em polipropileno. A atividade enzimática foi determinada com pNPC₄ em pH 6,0. Os resultados representam a média ± erro padrão de 4 replicatas.

A esterase recombinante de *L. plantarum* purificada em coluna de afinidade e caracterizada anteriormente (Brod et al, 2010b) apresentou atividade ótima na hidrólise do pNPC₄ a 40°C, diferente do extrato de esterase livre empregado neste trabalho (30°C). Esta diferença de valores para atividade ótima provavelmente se deve ao fato da enzima utilizada neste trabalho não ter sido purificada. Desta forma, optou-se em avaliar as demais atividades do extrato de esterase de *L. plantarum* livre e imobilizado na temperatura de 40°C, na qual, ambas as enzimas apresentam aproximadamente 40% de atividade relativa em comparação com as suas respectivas atividades máximas observadas.

A termoestabilidade de uma enzima é um parâmetro importante e bastante explorado para aplicação industrial. Na figura 3.2 observa-se o gráfico da estabilidade térmica, onde os extratos de enzima livre e imobilizada permaneceram por diferentes intervalos de tempo incubados a 80°C. Conforme observado, após 30 min de incubação, a enzima imobilizada apresentou 91 % da atividade inicial, enquanto a enzima livre apresentou 56 %. Este resultado esta de acordo com outros trabalhos reportados, nos quais a enzima imobilizada em suportes hidrofóbicos apresentou maior estabilidade térmica que a equivalente livre (NAWANI et al., 2006; SANCHEZ-OTERO et al. 2008). De acordo com esses autores, a imobilização

proporciona restrição na mobilidade conformacional da proteína, provocando maior rigidez na estrutura da enzima que impede a desnaturação e a perda da capacidade catalítica.

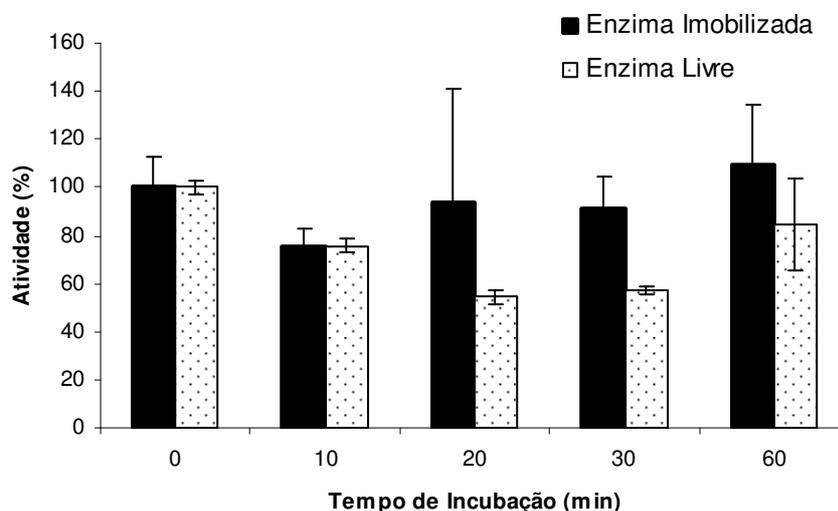


Figura 3.2. Estabilidade térmica da esterase de *L. plantarum* livre e imobilizada em polipropileno. A atividade enzimática foi determinada com pNPC₄ em pH 6,0 e a 40°C após incubação a 80°C por 10, 20, 30 e 60 min. Os resultados representam a média ± erro padrão de 4 replicatas.

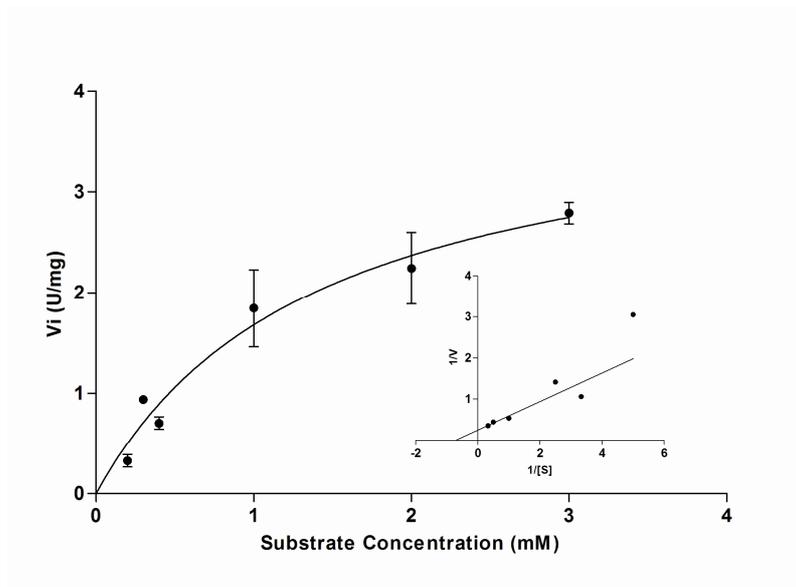
3.2. Parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada

As constantes cinéticas foram determinadas no ensaio enzimático com diferentes concentrações de pNPC₄ como substrato (Figura 3.3), e a partir do gráfico de Michaelis-Menten foram calculados os parâmetros cinéticos V_{max} , K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m (Tabela 3.1). O valor de V_{max} observado foi inferior para enzima imobilizada, conforme observado em outros trabalhos (KUMARI, 2008; LI; HU; LIU, 2004; YE et al., 2005). Após a imobilização, uma diminuição na velocidade da reação enzimática é comumente observada devido a efeitos de difusão, que ocasionam uma menor velocidade de difusão do substrato em relação a velocidade de transformação da enzima, não ocorrendo a saturação do sítio ativo (VITOLLO, 2001).

O valor de K_m para enzima livre foi menor que o da enzima imobilizada, 0,59 e 1,39 respectivamente, mostrando que após a imobilização a afinidade da enzima pelo substrato diminuiu. O aumento no K_m juntamente com a diminuição da V_{max} indica que após a imobilização ocorreu diminuição na atividade e na afinidade pelo substrato. Esta mudança na afinidade pode ser atribuído a mudanças estruturais da enzima ocasionadas pelo processo de

imobilização, que podem diminuir a acessibilidade do substrato ao sítio ativo (LI; HU; LIU, 2004). O k_{cat} , número de *turnover*, avalia o número de moléculas de substrato que o centro ativo converte em produto por segundo, já a razão k_{cat}/K_m relaciona a eficiência catalítica da enzima e sua afinidade com o substrato. A avaliação desses dois parâmetros mostrou que a enzima imobilizada apresenta valores inferiores aos encontrados para a enzima livre. O baixo valor encontrado na relação k_{cat}/K_m da enzima imobilizada está relacionado com a baixa eficiência catalítica (K_{cat}).

A



B

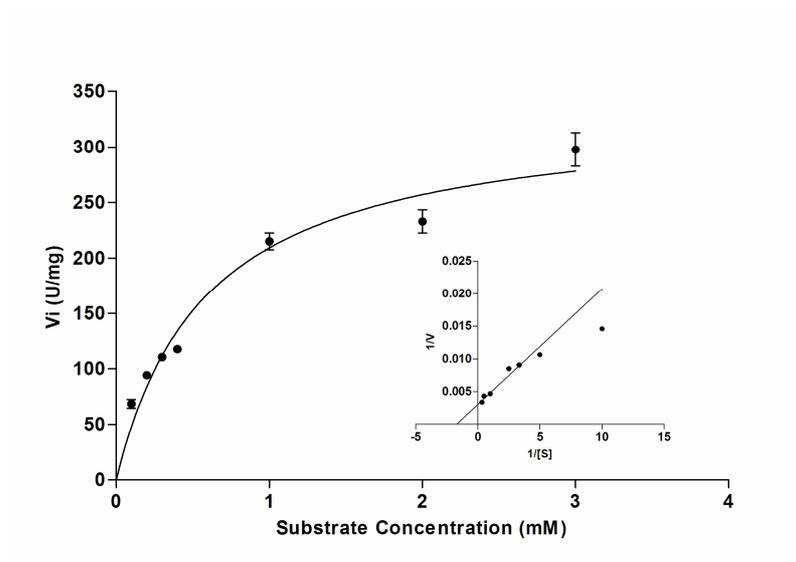


Figura 3.3. Gráficos de Michaelis-Menten de (A) esterase imobilizada em polipropileno e (B) esterase livre. O gráfico menor corresponde a representação de Lineweaver-Burk. Os dados cinéticos foram avaliados usando pNPC₄ como substrato e tampão fosfato 50 mM pH 6,0 a 40°C. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 4 replicatas.

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos da esterase recombinante de *L. plantarum*, enzima livre e imobilizada em polipropileno.

Enzima	Atividade	V_{\max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
	Específica (U.mg ⁻¹)				
Imobilizada	1,84 ± 0,33	4,02 ± 0,64	1,39 ± 0,48	2,61x10 ⁻³	1,87x10 ⁻³
Livre	215,1 ± 7,6	333,1 ± 15,10	0,59 ± 0,07	2,16x10 ⁻¹	3,65x10 ⁻¹

Os dados representam a média ± desvio-padrão de 4 replicatas.

3.3. Estabilidade operacional da esterase imobilizada

A natureza química do suporte, o processo de imobilização e as condições operacionais são fatores que influenciam no número de ciclos possíveis para reutilização da enzima imobilizada. Uma das principais desvantagens da imobilização por adsorção é que a enzima imobilizada exibe perda na estabilidade quando reutilizada, principalmente em meio aquoso (SÁNCHEZ-OTERO et al., 2008). Neste estudo o ensaio de reutilização da enzima imobilizada proporcionou a formação de um gráfico atípico até o terceiro ciclo de utilização da enzima, devido ao aumento da atividade catalítica (Figura 3.4). Em seguida, nos ciclos posteriores, ocorreu diminuição da atividade catalítica, comumente observada em outros trabalhos (YAGIZ et al., 2007; PAHUJANI et al., 2008; SÁNCHEZ-OTERO et al., 2008; YE et al., 2005). O aumento de atividade observado até o terceiro ciclo de reutilização da enzima pode ter sido causado pela falta de uma quantidade mínima de água nos primeiros ciclos, necessária para solvatação, conservação da estrutura tridimensional da enzima e manutenção da polaridade do sítio ativo (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

O ensaio de dessorção foi realizado para verificar a ocorrência de perda de proteína imobilizada ao suporte durante o processo de hidrólise do substrato. Foram analisados três ciclos, e neles não houve perda protéica capaz de ser quantificada pelo método de Bradford. A estabilidade durante o armazenamento é um atributo muito importante para as preparações enzimáticas imobilizadas. Neste trabalho a lipase imobilizada foi estocada a 4°C e sua atividade monitorada semanalmente até a oitava semana de estocagem. Conforme observado na figura 3.5, após quatro semanas estocada na geladeira, a enzima imobilizada começou a perder significativamente a atividade, passando a atividade de 82,03 % (terceira semana de estocagem) para 42,7 % (quarta semana de estocagem).

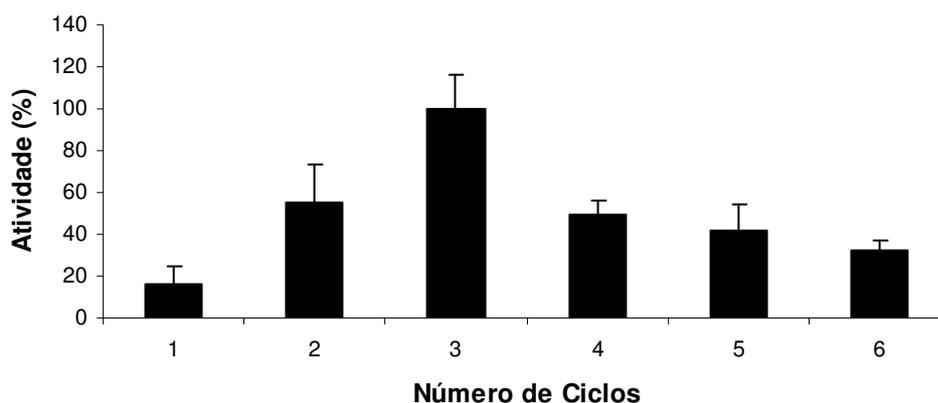


Figura 3.4. Estabilidade operacional da esterase de *L. plantarum* imobilizada em polipropileno. Atividade enzimática foi realizada com pNPC₄ em pH 6,0 e a 40°C. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 4 replicatas.

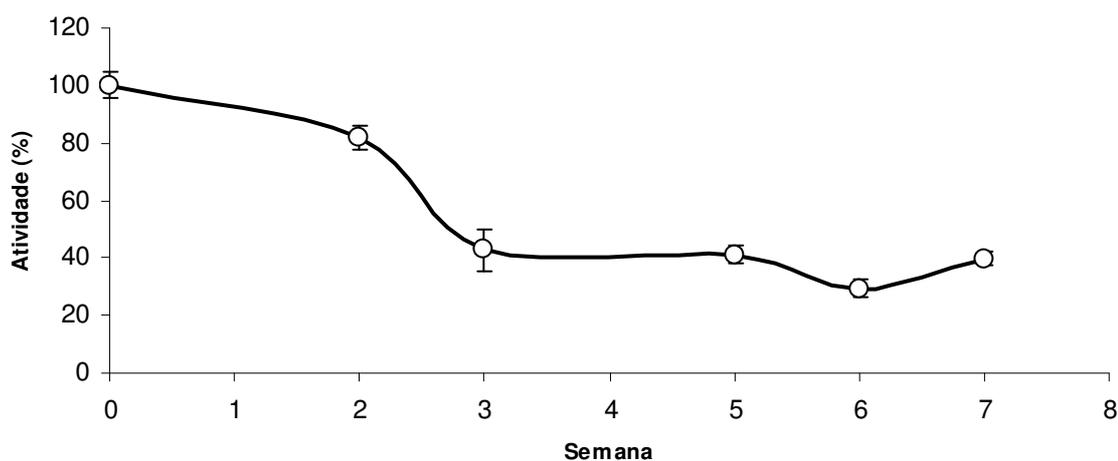


Figura 3.5. Tempo de estocagem da esterase de *L. plantarum* imobilizada em polipropileno. Atividade enzimática foi determinada com pNPC₄ em pH 6,0 e a 40°C. A enzima imobilizada permaneceu armazenada a 4°C até o momento do ensaio. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 4 replicatas.

4. Conclusão

A eficiência do processo de adsorção do extrato de *L. plantarum* ao suporte polipropileno Accurel MP1000 foi de 68,7 %. A enzima imobilizada manteve atividade constante nas temperaturas testadas, sendo ótima a 50°C, e também mostrou ser termoestável,

mantendo 91 % da sua atividade após incubada por 30 min a 80°C. A esterase de *L. plantarum* imobilizada apresentou menor afinidade ao substrato que a enzima livre, que pode ser resultado de uma mudança conformacional proporcionada pelo processo de imobilização. Não houve desprendimento de proteína do suporte após três ciclos de uso contínuo. A enzima imobilizada quando estocada a 4°C mostrou estabilidade na atividade de hidrólise por até três semanas.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo CNPq processo 552508/2007-1. DJK foi bolsista da CAPES. Gostaríamos de agradecer a Dra Elisa Helena Siegel Moecke pelas sugestões dadas para o processo de imobilização.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia utilizada para construção das lipases mutantes através da mutação sítio dirigida da lipase AF208229 de *Staphylococcus xylosus* mostrou ser eficiente e a escolha por uma DNA polimerase de alta fidelidade (*Tli* DNA polimerase) fez com que nenhuma outra modificação no DNA fosse observada. As lipases mutantes de *Staphylococcus xylosus* (Mut-Asp e Mut-Lys) apresentaram atividade específica mais elevada que a lipase recombinante selvagem (WT-Val), sendo que a maior atividade específica foi observada na lipase que continha no resíduo 309 o aminoácido básico (Mut-Lys). As três enzimas apresentaram atividade ótima a 42°C em pH 9,0, e elevada e significativa estabilidade térmica após incubação a 80°C. Desta forma, estudos adicionais, como os que avaliam a estrutura conformacional antes e após o aquecimento térmico poderão ser realizados a fim de elucidar a termo-estabilidade observada para as três lipases.

O método de imobilização da esterase de *Lactobacillus plantarum* em polipropileno foi padronizado. O suporte foi escolhido após serem testados vários suportes e metodologias. O suporte polipropileno foi selecionado por apresentar maior eficiência e atividade específica do biocatalisador. O lisado da esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum* foi imobilizado em polipropileno e a eficiência do processo foi de 68,7 %. Diferente da enzima livre, a enzima imobilizada manteve atividade constante nas diferentes temperaturas testadas e considerável estabilidade térmica após ser incubada a 80°C, fatores importantes para a possível aplicação industrial do biocatalisador. Não foi observado desprendimento de proteína do suporte após três ciclos de uso contínuo, e a enzima imobilizada apresentou estabilidade na atividade de hidrólise por até três semanas, quando estocada a 4°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFORD, J. A.; SMITH, L. Production of microbial lipases for the study of triglyceride structure. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 42, p. 1038-1040. 1965.
- ALMEIDA, R. V.; BRANCO, R. V.; PEIXOTO, B.; LIMA, S. S.; ALQUERES, S. M. C.; MARTINS, O. B.; ANTUNES, O. A. C.; FREIRE, D. M. G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal**. v. 39, p. 531-537, 2008.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**. V. 343, p. 177-183. 1999.
- AYORA, S.; GOTZ, F. Genetic and biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus*. **Molecular and General Genetics**. v 242, p. 421-430. 1994.
- AYORA, S.; LINDGREN, P. E.; GOTZ, F. Biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* involved in extracellular lipase processing. **Journal of Bacteriology**. v. 176, p. 3218-3223. 1994.
- BALCAO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X.; Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme Microbial Technology**. V. 18, p. 392-416, 1996.
- BATISTA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNADEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J. M. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 58, p. 486-493, 1998.
- BROCKERFOFF, H. Stereospecific Analysis of Triglycerides. **Lipids**. v.6, p. 942-956. 1971
- BROD, C. A.; PELISSER, M. R.; BERTOLDO, J. B.; VERNAL, J.; BLOCH, C. Jr.; TERENCEZI, H.; ARISI, A. C. M. Heterologous expression and purification of a heat-tolerant *Staphylococcus xylosus* lipase. **Molecular Biotechnology**. v. 44, p. 110-119, 2010a.
- BROD, C. A.; BERTOLDO, J. B.; VERNAL, J.; TERENCEZI, H.; ARISI, A. C. M. Cloning, expression, purification and characterization of a novel esterase from *Lactobacillus plantarum*. **Molecular Biotechnology**. v.44, p.242-249, 2010b
- BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIOSSON, B. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 14, p.546-552. 1992.
- BORNSCHEUER, U. T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 543-547. 2002.

BRZOZWSKI, A. M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z. S. DODSON, G. G.; LAWSON, D. A model for interfacial activation in lipase from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**. v. 351, p. 491-494. 1991.

CYGLER, M.; SHRAG, J. D.; SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; SILMAN, I.; GENTRY, M. K.; DOCTOR, B. P. Relationships between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. **Protein Science**. v. 2, p. 366-382. 1993

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química nova**. v. 27 (4), p. 623-630, 2004.

DE VRIES, M. C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. Lactobacillus plantarum – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**. v. 16 (9). p. 1018-1028, 2006.

DENG, Hong-Tao; XU, Zhi-Kang; LIU, Zhen-Mei; YE, Peng. Adsorption immobilization of Candida rugosa lipases on polypropylene hollow fiber microfiltration membranes modified by hydrophobic polypeptides. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 35. p. 437-443. 2004.

DEREWENDA, U.; BRZOZOWSKI, A. M.; LAWSON, D. M.; DEREWENDA, Z. S. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**. v. 31, p. 1532-1547. 1992.

DORDET-FRISONI, E.; TALON, R.; LEROY, S. Physical and genetic map of the Staphylococcus xylosus C2a chromosome. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 266, p. 184-193. 2007.

ENZYME NOMENCLATURE. Hydrolase: Acting on ester bonds. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html>> Acesso em: 10 de janeiro 2010.

ESAKKIRAJ, P.; RAJKUMARBHARATHI, M.; PALAVESAM, A.; IMMANUEL, G. Lipase production by Staphylococcus epidermidis CMST-Pi 1 isolated from the gut of shrimp Penaeus indicus. **Annals of Microbiology**. DOI 10.1007/s13213-009-0003-x, 2010.

FIorentini, A. M. **Caracterização e propriedades tecnológicas de Staphylococcus xylosus isoladas de salames artesanais e aplicação como cultura iniciadora em salame tipo milano**. 2008. 112 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

FORJAN, P.; JONSON, P. H.; PETERSEN, T. M.; PETERSEN, S. B. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. **Biochimie**. v. 82, p. 1033-1041, 2000.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Analysis of the interaction of lipases with polypropylene of different structure and polypropylene-modified glass surface. **Colloids and surfaces A**. v. 294. p. 147-155. 2007.

GALARNEAU, A.; MURESEANU, M.; ATGER, S.; RENARD, G.; FAJULA, F. Immobilization of lipase on silicas. Relevance of textural and interfacial properties on activity and selectivity. **New journal of chemistry**. V. 30, p. 562-571, 2006.

GANDHI, N. N.; PATIL, N. S.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B.; WANGIKAR, P. P.; MUDESH, D. Lipase-catalyzed esterification. **Catalysis Reviews**. v. 42. v. 4, p. 439-480. 2000.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Societ**. v.74 (6), p. 621-634, 1997.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids: Part 2. Biotransformations and biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**. v. 15, p. 470-478.1997.

GOBBETTI, M.; FOX, P. F.; SMACCHI, E.; STEPANIAK, L.; DAMIANI, P. Purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* 2739. **Journal of Food Biochemistry**. v.20, p. 277-246, 1996.

GOTZ, F.; VERHEIJ, H. M.; ROSENSTEIN, R. Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 93, p. 15-25. 1998.

GROCHULSKI, P.; BOUTHILLIER, F.; KAZLAUSKAS, R. J.; SERREQUI, A. N.; SCHRAG, J. D. Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. **Biochemistry**. V. 33, p. 3494-3500. 1994.

GUPTA, N.; RATHI, P.; SINGH, R.; GOSWAMI, V. K.; GUPTA, R. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 67, p. 648-653, 2005.

HARCHANI, H.; MOSBAH, H.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Biochemical and molecular characterization of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 56, p. 237-245, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and microbial technology**. v. 39, p. 235-251, 2006.

HOLPFAZEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal for Clinical Nutrition**. v. 73 (2). p. 365S-373S. 2001.

HUANG, L.; CHENG, Z. Immobilization of lipase on chemically modified bimodal ceramic foams for olive oil hydrolysis. **Chemical Engineering Journal**. In press. 2008.

IBORRA, J. L.; CASTELLAR, M. R.; CÁNOVAS, M.; MANJÓN, A. Picrocrocin hydrolysis by immobilized fi-glucosidase. **Biotechnology Letters**. V. 14. p. 475-480. 1992.

IRLINGER, F.; MORVAN, A.; ELSOLH, N.; BERGERE, J. L. Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 20, p. 319-328. 1997.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 10, p. 129-140. 2000.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.16, p.53-58. 2001.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**. v. 16, 396-403. 1998.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structure, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**. v. 53. p. 315-351. 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. **Current opinion in biotechnology**. v. 15, p 305-313, 2004.

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

KAZLAUSKAS, R. J. Elucidation structure-mechanism relationships in lipase: prospects for predicting and engineering catalytic properties. **Trends in Biotechnology**. v. 12, p. 464-472. 1994.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; BOUAZIZ, I.; BOUFI, S.; do REGO, A. M. B.; GARGOURI, Y. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: activity and stability studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. In press. 2008.

KENNEALLY, P. M.; LEUSCHNER, R. G.; ARENDT, E. K.; Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. **Journal of applied microbiology**. v. 84, p. 839-846. 1998.

KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; VAN KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O. P.; LEER, R.; TORCHINI, R.; PETERS, S. A.; SANDBRINK, H. M.; FIERS, M. W. E. J.; STIEKEMA, W.; LANKHORST, R. M.K.; BRON, P. A.; HOFFER, S. M.; GROOT, M. N. N.; KERKHOVEN, R.; VRIES, M. de.; URSING, B.; VOS, W. M. de.; SIEZEN, R. J. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academ of Sciences of the United States of America**. v.100(4), p.1990-1995. 2003.

KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUN, S. W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. **Structure**. v. 5 (2), p. 173-185. 1997.

KOSUGI, Y.; TAKAHASHI, K.; LOPEZ, C. Large-scale immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* bitype I and na application ofr sardine oil hydrolysis. **Journal of the American eil chemists society**. v. 72, p. 1281-1285, 1995.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; KUMAR, G. V.; BANERJEE, R. Comparative study of thermostability and Ester synthesis ability of free and immobilized lípases on cross linked sílica gel. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 31. p. 291-298. 2008.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and bioengineering**. v. 30, p. 81-87, 2004.

LANG, D. A.; MANNESSE, M. L. M.; de HAAS G. H.; VERHEIJ, H. M.; DIJKSTRA, B. W. Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. **European Journal of Biochemistry**. v. 254, p. 333-340. 1998.

LATHA, K.; RAMARETHINAM, S. Studies on lipid acyl hydrolases during tea processing. **Annual Plant Physiology**. V. 3, p. 73-78, 1999.

LEE, C. H.; LIN, T. S.; MOU, C. Y. Mesoporus materials for encapsulating enzymes. **Nano Today**. v. 4, p. 165-179, 2009.

LI, Songjun; HU, Jie; LIU, Bailing. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. **BioSystems**. v. 77. p. 25-32. 2004.

LIEBL, W.; GOTZ, F. Studies on lipase directed export of *Escherichia coli* β -lactamase in *Staphylococcus carnosus*. **Molecular and General Genetics**. v. 204, p. 166-173. 1986.

LIU, K. J.; CHANG, H. M.; LIU, K. M. Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase. **Food Chemistry**. v. 100, p. 1303-1311. 2007.

LOPES, M. F. S.; LEITÃO, A. L.; REGALLA, M.; MARQUES, J. J. F.; CARRONDO, M. J. T.; CRESPO, M. T. B. Characterization of highly thermoestable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. **International journal of food microbiology**. v. 76. p. 107-115. 2002.

LOPES, M. F. S.; CUNHA. A. E.; CLEMENTE, J. J.; CARRONDO, M. J.T.; CRESPO, M. T. B. Influence of environmental factores on lipase production by *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 51, p. 249-254, 1999.

LOTTI, M.; TRAMONTANO, A.; LONGHI, S.; FUSETTI, F.; BROCCA, S.; PIZZI, E.; ALBERGHINA, L. Variability within the *Candida rugosa* lipases family. **Protein Engineering**. v. 7, p. 531-535. 1994.

MAIA, M. D. D.; HEASLEY, A.; CAMARGO DE MORAIS, M. M.; MELO, E. H. M.; MORAIS, M. A.; Jr. LEDINGHAM, W. M.; et al. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**. v. 76. p. 23-27. 2001.

MARTIN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUES, M. T.; AYMERICH, T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positivo cocci from slightly fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**. v. 107, p. 148-158. 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ -LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques (Review). **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p.1451-1463. 2007.

MINOSVSKA, V.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. **Journal of the Serbian chemical society**. v.70, p. 609-624, 2005.

MORLEY, K. L.; KAZLAUSKAS, R. J. Improving enzyme properties: when are closer mutations better? **Trends in Biotechnology**. v. 23, p. 231-237. 2005.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; MEJDOUB, H.; DHOUIB, H.; GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1723, p. 282-291. 2005.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; BEZZINE, S.; GARGOURI, Y. Expression, purification, and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosus* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala. **Protein Expression and Purification**. v. 47, p. 516-523. 2006.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; HORCHANI, H.; GARGOURI, Y. Involvement of Gly 311 residue on substrate discrimination, pH and temperature dependency of recombinant *Staphylococcus xylosus* lipase: A study with emulsified substrate. **Protein Expression and Purification**. v. 55, p. 31-39. 2007.

MONTERO, S.; BLANCO, A.; VIRTO, M. D.; LANDETA, C.; AGUD, I.; SOLOZABAL, R.; LASCARAY, J. M.; RENOBALLES, M.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. Immobilization of *Candida rugosa* and some properties of the immobilized enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 15, p. 239-247, 1993.

NAWANI, N.; SINGH, R.; KAUR, J. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. **Electronic Journal of Biotechnology: Microbial biotechnology**. v. 9. p. 559-565. 2006.

OLLIS, D. L.; SHEA, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering Design and Selection**. v. 5, p. 197-211. 1992.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. . 3, p. 110-120. 2002.

PELISSER, Marica Regina. **Clonagem, expressão e purificação de lipase de *Staphylococcus xylosus* e detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos de origem animal**. 2008. 111p. Tese (Programa e pós-graduação em

ciência de alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

PETERSEN, M. T. N.; FORJAN, P.; PETERSEN, S. B. How do lipases and esterases work: The electrostatic contribution. **Jornal of Biotechnology**. v. 85, p. 115-147. 2001.

ROSENSTEIN, R.; GOTZ, F. Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. **Biochimie**. v. 82. p. 1005-1014. 2000.

ROSENAU, F.; TOMMASSEN, J.; JAEGER, K. E. Lipase-Specific Foldases. **ChemBioChem**. v. 5, p. 152-161, 2004.

ROSSI, F.; TOFALO, R. TORRIANI, S. SUZZI, G. Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, p. 365-371. 2001.

SABBANI, S.; HEDENSTROM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Cândida rugosa* lipase is influenced by the particle size immobilising support material Accurel. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v. 42, p. 1-9, 2006.

SAMUELSON, P.; HANSSON, M.; AHLBORG, N.; ANDREONI, C.; GOTZ, F.; BACHI, T.; NGUYEN, T. N.; BINZ, H.; UHLEN, M.; STAHL, S. Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*. **Journal of Bacteriology**. v. 177, p. 1470-1476. 1995.

SAKINÇ, T.; KLEINE, B.; GATERMANN, S. G.; Biochemical characterization of the surface-associated lipase of *Staphylococcus saprophyticus*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 274 (2), p. 335-341, 2007.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v. 54. p. 19-26. 2008.

SANCHEZ-OTERO, M. G.; VALERIO-ALFARO, G.; GARCÍA-GALINDO, H. S.; OLIART-ROS, R. M. Immobilization in the presence of Triton X-100: modifications in activity and thermostability of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 lipase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35, p. 1687-1693, 2008.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 30, p. 513-521. 1958. **Apud:** JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structure, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**. v. 53. p. 315-351. 1999.

SAYARI, A.; AGREBI, N.; JAOUA, S.; GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. **Biochimie**. v. 83, p. 863-871. 2001.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**. v. 52, p. 1-18, 2003.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; CYGLER, M.; LANG, D.; BURGDORF, T. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**. v. 5, p. 187-202. 1997.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases (Research review paper). **Biotechnology Advances**. v. 19, p. 627-662. 2001.

SHARMA. S.; GUPTA, M. N. Alginate as a macroaffinity ligand and an additive for enhanced activity and thermostability of lipases. **Biotechnology and applied biochemistry**. v. 33, p. 161-165, 2001.

SHU, ZHENG-YU; JIANG, HUAN; LIN, RUI-FENG; JIANG, YONG-MEI; LIN, LIN; HUANG, JIAN-ZHONG. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v. 62, p. 1-8, 2010.

SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta** (Review). V. 1543, p. 223-238, 2000.

TALON, R.; BUBLET, N.; MONTEL, M. C.; CANTONNET, M. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. **Current Microbiology**. v. 30, p. 11-16, 1995.

TIESSING, J. J. W.; PUDEROYEN, G. van; RANSAC, M. S. R.; DIJKSTRA, B. W. Structural basis of phospholipase activity of *staphylococcus hyicus* lipase. **Journal of molecular biology**. V. 371, p. 447-456, 2007.

VITOLO, Michele. Imobilização de enzimas, p. 391-403. In: LIMA, Urgel A., AQUARONE, Eugênio, BORZANI, Walter, SCHMIDELL, Willibaldo (Coord.). **Biotecnologia Industrial – Processos fermentativos e enzimáticos**. Editora Edgard Blücher LTDA., volume 3, 1ª ed., São Paulo, SP, 2001.

VOGEL, R. F.; GAIER, W.; HAMMES, W. P.; Expression of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* in *Lactobacillus curvatus* Lc2-c. **FEMS Microbiology Letters**. v. 69, p. 289-292. 1990.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**. v. 134, p. 262-267. 2007.

YE, Peng; XU, Zhi-Kang; CHE, Ai-Fu; WU, Jian; SETA, Patrick. Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid hollow fiber membrane for lipase immobilization. **Biomaterials**. v. 26. p. 6394-6403. 2005.

ZAKS, A.; GROSS, A. T. Production of monoglycerides by enzymatic transesterification. World organization patent 90,04,033. 1990.