

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE MUTAGÊNESE ALEATÓRIA PARA OBTENÇÃO DA
LIPASE DE *Burkholderia cepacia* COM VARIAÇÃO NAS PROPRIEDADES
CATALÍTICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell.

Co-orientadores: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Prof^a. Dr^a. Nadia Krieger.

CURITIBA
2005

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde para realizar este trabalho.

A minha mãe, que mesmo sem entender das mirabolantes estratégias da bioquímica e da biologia molecular, sempre me incentivou.

Aos meus orientadores:

Ao professor David Mitchell e a professora Nadia Krieger pelo companheirismo, atenção e confiança, não só mostrada durante a dissertação, mas desde o início, ainda na Iniciação Científica. Por tudo que aprendi, e ainda, pelo que vou aprender sou muito grato a vocês.

Ao professor Emanuel Maltempi de Souza que foi sem dúvida, para mim, a melhor surpresa desta dissertação. A sua contribuição para este trabalho foi além do que uma simples colaboração, e sem dúvida quem ganhou muito com isto fui eu. Por ter aprendido uma série de coisas novas e um jeito diferente de analisá-las. Por tudo isto é que sou muito grato a você também.

Ao Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, e em especial ao professor Fabio Oliveira Pedrosa, que permitiu que eu viesse trabalhar junto com o grupo. Se não fosse esta atitude este trabalho dificilmente seria realizado.

Aos funcionários do núcleo Dona Julieta Pie, Roseli Prado e Valter Baura.

A todos os colegas de laboratório. Em especial, gostaria de agradecer a professora Rose Adele, ao Humberto e Stefan pela ajuda com os protocolos no início do trabalho, também gostaria de agradecer a Carol que me ajudou com as eletroforeses de proteína e a Fabiane e André Luis pelo incentivo na reta final.

Aos colegas do laboratório de Fermentações, em especial, aos amigos Rodrigo Faria e Ricardo Wagner II, pelo companheirismo e sempre dispostos a conversar e dar sugestões.

Aos colegas do laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química. Em especial, a Valéria, pelas sugestões e por me chamar a atenção quando eu merecia, é uma pena que não esteja aqui trabalhando conosco, a Alessandra e Orlando, a Malu e ao ex-membro Leonardo, agora no Laboratório de Química de Fitobiomassas do Departamento de Química.

Aos amigos e colegas de turma: Lauro, Gustavo, Giovana, Juliana, Patrícia, Diogo, Graciele, Ana Helena, Tatiana e Gerusa.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial aos professores Guilherme Sasaki e Leonardo Cruz, pela amizade e por sempre estarem dispostos para conversar e dar sugestões.

Aos meus grandes amigos Adriano e Rosy. A amizade de vocês foi importantíssima não só durante este período, mas como também será para o resto da vida.

A coordenação do curso de pós-graduação.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

A todas as demais pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo.

Hermann Hesse

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURA	xii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 EVOLUÇÃO DIRIGIDA.....	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 A BIOCATÁLISE.....	4
2.2 O BIOCATALISADOR – APLICAÇÃO DE ENZIMAS... ..	7
2.3 LIPASES EM BIOCATÁLISE – APLICAÇÕES.....	8
2.4 EVOLUÇÃO DIRIGIDA – A ENGENHARIA DO BIOCATALISADOR.....	12
2.5 EVOLUÇÃO DIRIGIDA DE LIPASES.....	16
2.6 ESTRUTURA DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i>	19
2.7 O SISTEMA DE MUTAGÊNESE.....	24
3 OBJETIVO	26
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 MICRORGANISMOS, MEIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	27
4.1.1 Estirpes Bacterianas.....	27
4.1.2 Meios de Cultivo.....	28
4.1.3 Antibióticos.....	28
4.1.4 Condições de Cultivo.....	28
4.1.4.1 Cultivos em frascos de vidro.....	28
4.1.4.2 Cultivo em placas do tipo <i>Deep Well</i>	29
4.1.4.3 Cultivo em placas do tipo ELISA.....	29
4.2 MANIPULAÇÃO DE DNA.....	29
4.2.1 Plasmídeos.....	29
4.2.2 Transformação Bacteriana.....	31
4.2.2.1 Preparação de células eletrocompetentes.....	31
4.2.2.2 Eletroporação.....	32
4.2.2.3 Determinação da Eficiência de Transformação das Células de <i>E. coli</i>	32
4.2.3 Purificação de Plasmídeos por Lise Alcalina.....	33
4.2.4 Eletroforese de DNA em Gel de Ágar ou Agarose.....	33
4.2.5 Reações com Enzimas de Restrição.....	34
4.2.6 Reação de Ligação de DNA.....	34
4.2.7 Subclonagem do gene <i>lipA</i> de <i>B. cepacia</i> no vetor pET-29a.....	35
4.2.8 Reação de Inserção de Transposons e Seleção das Inserções.....	35
4.2.9 Sequenciamento de DNA.....	36

4.2.9.1	Preparação da Amostra de DNA.....	36
4.2.9.2	Reação de Sequenciamento.....	37
4.2.9.3	Edição e Análise das Seqüências.....	38
4.2.10	Mutagênese da Lipase de <i>B. cepacia</i>	39
4.3	ENSAIOS ENZIMÁTICOS E CONDIÇÕES DE <i>SCREENING</i>	40
4.3.1	Indução da Expressão da Lipase de <i>B. cepacia</i> em <i>E. coli</i>	40
4.3.2	Indução da Expressão da Lipase de <i>B. cepacia</i> em <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.....	40
4.3.3	Determinação de Atividade Lipolítica pela Hidrólise do Palmitato de <i>p</i> -Nitrofenila.....	41
4.3.4	Determinação da Absortividade Molar (ϵ L) para o <i>p</i> -Nitrofenol (pNP) em Microplacas.....	43
4.3.5	<i>Screening</i> de Transformantes com Atividade Lipolítica em Microplacas.....	43
4.3.6	<i>Screening</i> de Colônias com Atividade Lipolítica utilizando MUF-Butirato..	44
4.3.7	Ensaio de Termoestabilidade em Microplacas.....	45
4.3.8	Ensaio de Resistência a Solventes Orgânicos Miscíveis em Água.....	45
4.3.9	Confirmação dos Candidatos a Resistência a DMF 80 %.....	45
4.4	ELETROFORESE E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	46
4.4.1	Eletroforese Desnaturante de Proteínas (SDS-PAGE).....	46
4.4.2	Determinação da Concentração de Proteínas pelo Método de Bradford.....	46
5	RESULTADOS	48
5.1	ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pT-ompA-LipHp.....	48
5.2	EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>B. cepacia</i> POR <i>E. coli</i>	49
5.3	PERFIL DE ATIVIDADE DA LIPASE DE <i>B. cepacia</i> EXPRESSA POR <i>E. coli</i>	50
5.4	DEFINIÇÃO DO MODO DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>B. cepacia</i> EM <i>E. coli</i> XL-1 BLUE.....	51
5.4.1	Efeito da Temperatura Inicial de Cultivo.....	53
5.5	EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>B. cepacia</i> POR <i>E. coli</i> XL-1 BLUE EM SISTEMAS DE 96 POÇOS (<i>DEEP WELL</i>).....	55
5.6	VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ENSAIO ENZIMÁTICO EM SISTEMAS DE 96 POÇOS.....	56
5.7	EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>B. cepacia</i> POR <i>E. coli</i> EM SISTEMAS DE 96 POÇOS – PLACAS TIPO ELISA.....	57
5.8	EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>B. cepacia</i> EM <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS A PARTIR DO PLASMÍDEO pMMS-1.....	63
5.9	MUTAGÊNESE DO PLASMÍDEO pT-ompA-LipHp.....	66
5.10	ANÁLISE DA BIBLIOTECA GERADA POR MUTAGÊNESE COM <i>E. coli</i> XL-1 RED.....	67
5.11	ESTABILIDADE DA LIPASE DE <i>B. cepacia</i> A 60 °C EM MICROPLACAS.....	71

5.12 ESTABILIDADE DA LIPASE DE <i>B. cepacia</i> EM SOLVENTES MISCÍVEIS EM ÁGUA.....	73
5.13 DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO ENZIMÁTICO COM MUF-BUTIRATO.....	76
5.13.1 Determinação Qualitativa da Hidrólise de MUF-Butirato.....	78
5.13.2 Determinação Quantitativa da Hidrólise de MUF-Butirato por uma Lipase de Referência.....	79
5.13.2.1 Efeito da concentração de enzima.....	80
5.13.3 Análise Qualitativa de Atividade Lipolítica Utilizando Colônias de <i>E. coli</i> Expressando a Lipase de <i>B. cepacia</i>	84
5.14 APLICAÇÃO DO ENSAIO LIPOLÍTICO COM MUF-BUTIRATO PARA ISOLAMENTO DE LIPASE RESISTENTE A DMF.....	87
5.14.1 Primeiro <i>Screening</i> da Biblioteca de Mutantes Frente a DMF 80 %.....	88
5.14.2 Confirmação dos Candidatos.....	89
5.15 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	92
6 DISCUSSÃO	95
6.1 VETOR DE EXPRESSÃO pT-ompA-LipHp.....	95
6.2 EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>B. cepacia</i> POR <i>E. coli</i>	96
6.2.1 Expressão da Lipase de <i>B. cepacia</i> em Sistemas de 96 poços.....	100
6.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS UTILIZADOS.....	101
6.3.1 Método de Hidrólise ao pNPP.....	101
6.3.2 Método de Hidrólise do MUF-Butirato.....	103
6.4 SELEÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES AO DMF.....	105
6.5 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	108
7 CONCLUSÃO	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	NÚMERO DE PROCESSOS BIOCATALÍTICOS INDUSTRIAIS ESTABELECIDOS DESDE 1960.....	05
FIGURA 2 -	CICLO DA BIOCATALÍSE.....	07
FIGURA 3 -	COMPARAÇÃO DE MODELAGEM RACIONAL DE PROTEÍNAS (MRP) E EVOLUÇÃO DIRIGIDA (ED).....	13
FIGURA 4 -	ENSAIO APLICADO PARA DETERMINAR O AUMENTO DE ENANTIOSELETIVIDADE DA LIPASE DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> FRENTE AO 2-METILDECANOATO DE <i>p</i> -NITROFENILA.....	17
FIGURA 5 -	MODELO TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i>	22
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO DA SUPERFÍCIE MOLECULAR DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> NA REGIÃO DO SÍTIO ATIVO.....	23
FIGURA 7 -	REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO pT-ompA-LipHp.....	30
FIGURA 8 -	REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO pMMS-1.....	31
FIGURA 9 -	REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO pNPP E A FORMAÇÃO DO CROMOGÊNICO FENOLATO.....	42
FIGURA 10 -	REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO MUF-BUTIRATO E A FORMAÇÃO DO AGENTE FLUOROGÊNICO METIL-UMBELIFERONA.....	44
FIGURA 11 -	ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pT-ompA-LipHp.....	48
FIGURA 12 -	ELETROFORESE SDS-PAGE DAS CULTURAS INDUZIDAS.....	49
FIGURA 13 -	ATIVIDADE LIPOLÍTICA OBTIDA COM AS ESTIRPES XL-1 BLUE, TOP10 E DH10B, APÓS INDUÇÃO A 42 °C.....	51
FIGURA 14 -	EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> EM <i>Escherichia coli</i> XL-1 BLUE.....	52
FIGURA 15 -	EFEITO DA TEMPERATURA INICIAL DO CULTIVO NA EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> POR <i>Escherichia. coli</i> XL1 BLUE.....	54
FIGURA 16 -	EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> POR <i>Escherichia coli</i> XL-1 BLUE EM PLACAS DEEP WELL.....	55
FIGURA 17 -	VARIAÇÃO DE ATIVIDADE OBTIDA NO ENSAIO EM PLACAS DE 96 POÇOS PARTINDO-SE DE UMA CULTURA PREPARADA EXTERNAMENTE EM ERLLENMEYER.....	57

FIGURA 18 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> POR <i>Escherichia coli</i> XL-1 BLUE EM MICROPLACAS – ANÁLISE DA VARIAÇÃO POR ATIVIDADE LIPOLÍTICA.	59
FIGURA 19 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> POR <i>Escherichia coli</i> XL-1 BLUE EM MICROPLACAS.....	61
FIGURA 20 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> POR <i>Escherichia coli</i> XL-1 BLUE EM MICROPLACAS – VARIAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA.....	62
FIGURA 21 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> PELA <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	64
FIGURA 22 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> PELA <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS EM SISTEMAS DE 96 POÇOS.....	65
FIGURA 23 - NÚMERO DE GERAÇÕES DURANTE AS SUBCULTURAS DE <i>E. coli</i> XL-1 RED.....	66
FIGURA 24 - ANÁLISE DOS CANDIDATOS GERADOS PELA TRANSFORMAÇÃO DE pT-ompA-Lip-Hp MUTAGENIZADO EM <i>E. coli</i> XL1-RED.....	67
FIGURA 25 - PERFIL DE ATIVIDADE ESPECÍFICA DE 40 CANDIDATOS POSITIVOS PREVIAMENTE SELECIONADOS.....	69
FIGURA 26 - PERFIL DE ATIVIDADE ESPECÍFICA DOS CANDIDATOS POSITIVOS M1, M2, M3 E M4.....	70
FIGURA 27 - PERFIL DE ATIVIDADE ESPECÍFICA DOS CANDIDATOS NEGATIVOS M5 E M6.....	71
FIGURA 28 - ATIVIDADE RESIDUAL DA LIPASE DE <i>B. cepacia</i> APÓS 2 HORAS DE INCUBAÇÃO A 60 °C EM MICROPLACAS....	73
FIGURA 29 - ATIVIDADE RESIDUAL DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> APÓS INCUBAÇÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DMF.....	76
FIGURA 30 - ANÁLISE QUALITATIVA DA HIDRÓLISE DE MUF-BUTIRATO.....	79
FIGURA 31 - ANÁLISE QUANTITATIVA DA HIDRÓLISE DE MUF-BUTIRATO PELA LIPASE DE <i>Thermomyces lanuginosa</i>	81
FIGURA 32 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE INICIAL DA HIDRÓLISE DE MUF-BUTIRATO PELA LIPASE DE <i>Thermomyces lanuginosa</i>	82
FIGURA 33 - IMAGENS CAPTURADAS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INICIAL DA LIPASE DE <i>Thermomyces lanuginosa</i> FRENTE AO MUF-BUTIRATO.....	83
FIGURA 34 - COMPARAÇÃO DA VELOCIDADE DE REAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	84

FIGURA 35 - IMAGENS DOS ENSAIOS REALIZADOS COM COLÔNIAS DE <i>Escherichia coli</i> EXPRESSANDO A LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i>	86
FIGURA 36 - PERFIS DE ATIVIDADE RESIDUAL DOS CANDIDATOS SELECIONADOS APÓS INCUBAÇÃO EM DMF 80 %.....	90
FIGURA 37 - ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DA LIPASE DE <i>B cepacia</i> OBTIDA NESTE TRABALHO E UMA SEQUENCIA DA MESMA ENZIMA DEPOSITADA NO GENBANK.....	92
FIGURA 38 - ALINHAMENTO DA SEQUENCIA PEPTÍDEO SINAL OmpA DE <i>Escherichia coli</i> COM A SEQUENCIA PEPTÍDEO SINAL ENCONTRADA NO SEQUENCIAMENTO DO INSERTO <i>liphp</i>	93
FIGURA 39 - ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DA FOLDASE DE <i>B cepacia</i> OBTIDA NESTE TRABALHO E UMA SEQÜÊNCIA DA MESMA PROTEÍNA DEPOSITADA NO GENBANK.....	93
FIGURA 40 - ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DOS MUTANTES M5 E M6 COM A SEQUENCIA DA LIPASE E FOLDASE DETERMINADA NESTE TRABALHO.....	94
FIGURA 41 - INSERTOS DE DIFERENTES PLASMÍDEOS CONSTRUÍDOS POR QUYEN, SCHMIDT-DANNERT e SCHMID (1999).....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	APLICAÇÃO DE LIPASES PARA OBTENÇÃO DE DIVERSOS PRODUTOS.....	09
TABELA 2 -	EXEMPLOS DE BIOCATALISADORES MELHORADOS POR EVOLUÇÃO DIRIGIDA.....	15
TABELA 3 -	COMPARAÇÃO DA SIMILARIDADE DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS LIPASES DA FAMÍLIA I.2.....	21
TABELA 4 -	ESTIRPES DE <i>E. coli</i> UTILIZADAS.....	27
TABELA 5 -	MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.....	28
TABELA 6 -	ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES DE USO.....	28
TABELA 7 -	CONDIÇÕES REACIONAIS COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS.....	34
TABELA 8 -	EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO DO PLASMÍDEO pGEM EM TRÊS ESTIRPES DE <i>E. coli</i>	51
TABELA 9 -	VALORES DA MÉDIA DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA E DO DESVIO PADRÃO OBTIDO PARA CADA MODO DE INDUÇÃO EM MICROPLACAS.....	58
TABELA 10-	VALORES DA MÉDIA DE ATIVIDADE E DO DESVIO PADRÃO OBTIDO PARA CADA MODO DE INDUÇÃO EM MICROPLACAS – ANÁLISE DE VARIAÇÃO POR ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM RELAÇÃO A D.O. A 595 nm...	62
TABELA 11-	ATIVIDADE RESIDUAL DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> APÓS INCUBAÇÃO EM SOLVENTES ORGÂNICOS MISCÍVEIS EM ÁGUA.....	74
TABELA 12-	ATIVIDADES RESIDUAIS DOS CANDIDATOS SELECIONADOS NO PRIMEIRO <i>SCREENING</i> APÓS INCUBAÇÃO EM DMF 80 %.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs.	Absorvância
Abs. ₅₉₅	absorvância a 595 nm
Abs. ₄₁₀	absorvância a 410 nm
Amp	Ampicilina
Amp ^R	Ampicilina resistente
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
CCD	<i>Charged-coupled device</i>
D.O.	Densidade ótica
D.O. ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
CG	Cromatografia de fase gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cm	Cloramfenicol
Cm ^R	Cloramfenicol resistente
DMF	N,N'-dimetil formamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxiribonucleosídeos trifosfato
dPTP	6-(2-Deoxi-b-d-ribofuranosil)-3,4-dihidro-8H-pirimido-[4,5-c] [1,2]oxazin-7-ona 5'-trifosfato
8-oxo-dGTP	8-Oxo-2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E	Coeficiente de enantiosseletividade
e.e.	Excesso enantiomérico
ED	Evolução dirigida
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EZ::TN<TET>	Transposon para inserção com resistência à tetraciclina
<i>hp</i>	Gene da proteína auxiliadora ou foldase de <i>Burkholderia cepacia</i>
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
Km	Canamicina
λ	Bacteriófago lambda
<i>lip</i>	Gene da lipase de <i>B. cepacia</i>
MRP	Modelagem racional de proteínas
MUF	Metil-umbeliferila
n.d.	Não determinada
n.e.	Não existente
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDP	<i>Protein Data Bank</i>
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
pNPP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNAse A	Ribonuclease A

r.p.m	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida e SDS para eletroforese desnaturante.
Sec	<i>Secreton-mediated</i>
Sm	Estreptomicina
Sm ^R	Estreptomicina resistente
Tc ou Tet	Tetraciclina
Tet ^R	Tetraciclina resistente
Tn	Transposon
Tris	Tris hidroximetilaminometano
UFC	Unidade formadora de colônia
uv	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa	quiloDaltons
mUE	Unidade enzimática x 10^{-3}
m/v	massa/volume
V/v	Volume/volume
V/cm	Volt/centímetro

RESUMO

As lipases, classificadas como carboxilester hidrolases (E.C. 3.1.1.3), são enzimas largamente aplicadas em biocatálise. Uma das lipases com maior aplicação é a lipase de *Burkholderia cepacia*. O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver a metodologia de evolução dirigida para melhorar a estabilidade da lipase de *B. cepacia* em dimetil formamida 80 % (v/v) em água. O gene *lip* que codifica para a lipase de *B. cepacia* foi modificado *in vivo* na estirpe mutagênica *E. coli* XL-1 Red. Esta estirpe é um triplo mutante dos genes *mutS*, *mutD* e *mutT*, genes envolvidos na replicação do DNA e no reparo de erros de pareamento, e por este motivo tem a sua taxa natural de mutagênese aumentada cerca de 5000 vezes. A cada 12 h foi realizada uma subcultura com esta bactéria, totalizando 9 subculturas ou 108 h de cultivo. Os plasmídeos da última subcultura foram purificados e transformados em *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, USA). Dos transformantes obtidos 384 foram submetidos a um *screening* em DMF 80 %. Juntamente com a geração da biblioteca de mutantes, foi desenvolvido um método de *screening* utilizando o substrato fluorogênico MUF-butirato (butirato de metilumbeliferila). O ensaio baseou-se na relação do aumento da fluorescência gerado pela reação, com a intensidade luminosa detectada nas imagens. Os ensaios foram executados em placas de 96 poços irradiando-se as placas com luz UV, a 365 nm, anteriormente à captura das imagens. Para capturar as imagens utilizou-se uma câmera CCD (*charge-coupled device*) com um tempo de exposição de 6,9 segundos. A quantificação de luminosidade foi determinada utilizando o *software* LabWorks4[®]. As principais vantagens apresentadas por este ensaio foram a rapidez e sua sensibilidade, em relação ao método de hidrólise do pNPP (palmitato de *p*-nitrofenila). Da triagem inicial de 386 transformantes, não foi possível selecionar mutantes com maior estabilidade ao DMF com a população de transformantes avaliada. A análise de sequenciamento de DNA do operon *lipHP* mostrou que a lipase selvagem utilizada neste trabalho é 100 % similar a lipase previamente sequenciada (KORDEL et al, 1991). Somente para a proteína auxiliadora ou foldase é que foram encontradas alterações em duas posições, arginina13 e glutamina301. A mesma seqüência, quando submetida ao alinhamento frente seis outras proteínas foldases de espécies do gênero *Burkholderia*, apresentou homologia quanto a estes dois aminoácidos, sugerindo que a seqüência deste trabalho difere da seqüência previamente depositada no GENBANK (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1999).

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, há um grande interesse na aplicação de enzimas em processos de biocatálise. Comprovadamente, as enzimas são capazes de catalisar reações frente a um grande número de substratos diferentes, de forma seletiva, o que as torna uma ferramenta usual para a obtenção de compostos de interesse nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002). A biocatálise pode ser um importante substituto de muitos processos puramente químicos, e por isso é um ramo do que se conhece como “química verde” (WARNER; CANNON; DYE, 2004). Esta abordagem tem surgido como uma alternativa para processos poluentes, pois, estabelece os seus processos considerando as propriedades biodegradáveis dos seus componentes.

No entanto, as condições de processos em biocatálise nem sempre se assemelham às condições ótimas para as enzimas na natureza, sendo na maioria das vezes mais agressivas, como por exemplo, a utilização de temperaturas altas e de solventes orgânicos como meios reacionais. Portanto, modificações estruturais que possam melhorar o desempenho de biocatalisadores, nestas condições, podem abrir oportunidades para o surgimento de novos processos.

Uma das mais célebres ferramentas para se modificar a estrutura primária de proteínas foi publicada por Smith e colaboradores, sendo nomeada de mutagênese sítio-dirigida (SMITH, 1985). Por suas contribuições nesta área, Smith recebeu o prêmio Nobel de Química em 1993. Com esta técnica foi possível inserir mutações pontuais, utilizando oligonucleotídeos desenhados para alterar o códon de escolha no gene selvagem e conseqüentemente, alterar o aminoácido, levando, assim, a obtenção de um mutante. Com o sucesso desta técnica, pôde-se estabelecer diversas relações entre a seqüência de aminoácidos e o seu papel específico para a proteína nativa. Esta nova linha de pesquisa na química de proteínas ficaria consolidada como engenharia de proteínas.

Especificamente para enzimas, a mutagênese sítio dirigida mostrou-se uma poderosa ferramenta, para se determinar os aminoácidos importantes para a catálise.

Além disso, muitos autores acreditavam que assim, seria possível também se determinar a contribuição de alguns aminoácidos para outras propriedades, tais como termoestabilidade e estabilidade ao pH. No entanto, o entendimento de como uma alteração de aminoácidos pode gerar, ou melhorar, certas propriedades não é totalmente compreendido.

Como alternativa ao método sítio-dirigido, uma outra abordagem foi desenvolvida, o que iniciou uma nova linha no estudo de proteínas, conhecida como evolução *in vitro* ou evolução dirigida.

1.1 EVOLUÇÃO DIRIGIDA

O laborioso método de gerar variantes melhoradas de enzimas através de mutagênese sítio-dirigida trouxe à tona uma nova abordagem conhecida como evolução dirigida. Na evolução dirigida, a primeira etapa consiste em mutagenizar aleatoriamente o gene da enzima de interesse, e em uma segunda etapa selecionar, a partir de uma população de mutantes, aqueles que melhor respondem a característica desejada. Neste novo método, a preocupação principal não é determinar qual o sítio da mutação, mas sim como selecionar o mutante de interesse.

Os trabalhos de Arnold e seu grupo (CHEN; ARNOLD, 1993 e ARNOLD, 1996) são considerados os pioneiros nesta área. Nestes trabalhos, bibliotecas de mutantes foram geradas por métodos de mutagênese aleatória, e desta biblioteca poucos indivíduos que, apresentavam atividades diferenciadas, foram selecionados adotando-se uma condição específica de seleção. Por exemplo, pode-se pensar em alta ou baixa temperatura, presença de solventes orgânicos, alta pressão, alta salinidade, valores extremos de pH e enantio e regioselectividade. A seleção é feita procurando-se mutantes com as melhores propriedades, através de métodos de *high-throughput screening*. Os mutantes selecionados no primeiro ciclo podem ser sujeitos a um novo ciclo de mutagênese e seleção, e assim sucessivamente até a seleção do mutante mais bem adaptado às condições pré-determinadas.

Este tipo de processo pode ser comparado com o processo de evolução e seleção natural descrito por Darwin, no entanto a taxa de mutagênese é muito mais acelerada do que aquela que vem ocorrendo ao longo dos anos na natureza (FRANCES H. ARNOLD RESEARCH GROUP, 2005).

A evolução dirigida tornou-se uma ferramenta usual na engenharia de proteínas, tanto na pesquisa acadêmica, como na pesquisa industrial por biocatalisadores com propriedades melhoradas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A BIOCATÁLISE

Entende-se por biocatálise todos os processos biotecnológicos que usam catalisadores biológicos em etapas de conversão química. Estes catalisadores são em geral enzimas ou células inteiras de microrganismos. Além disso, também foram relatados na literatura reações catalisadas por anticorpos e um tipo específico de RNA conhecido como RNA catalíticos (WALSH, 2001).

Um grande impulso foi dado a biocatálise quando se descobriu a possibilidade de utilizar enzimas para catalisar um grande número de reações em meios não convencionais, como solventes orgânicos (KLIBANOV, 2001). Isto foi possível através das observações, inicialmente feita pelo grupo de Alexander M. Klibanov, que enzimas imobilizadas ou liofizadas catalisavam reações que não ocorreriam em meio aquoso (ZAKS; KLIBANOV, 1984 e 1988). Por exemplo, a síntese de um éster por uma lipase (triacilglicerol éster hidrolase, E.C 3.1.1.3) que, em meio aquoso, hidrolisa diversos ésteres. Além disso, outras vantagens são apresentadas, como o reconhecimento de uma grande variedade de substratos, atividade catalítica assimétrica enantiosseletiva e regioseletiva, diminuição de reações laterais e, principalmente, catálise efetiva em condições energéticas suaves (KRIEGER et al., 2004).

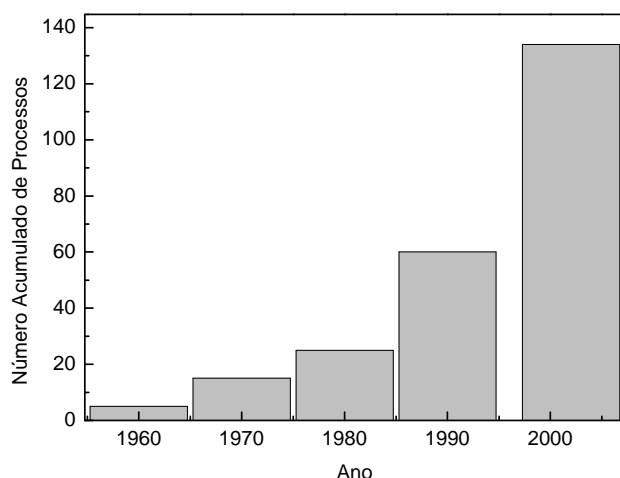
Atualmente, um grande volume de pesquisa em biocatálise vem sendo feito, principalmente na área acadêmica. Uma busca em um dos *sites* mais utilizados para localização de referências bibliográficas, o *ISI Web of Science*, utilizando a palavra *biocatalysis*, de 2000 até o início de 2005, retornou 835 artigos. Cruzando as palavras *biocatalysis* e *lipase* no mesmo período retornaram 210 artigos, o que corresponde à cerca de 25 % dos trabalhos, mostrando a importância que estas enzimas representam.

Apesar de todo o conhecimento que vem sendo produzido na área, poucos processos têm chegado à escala industrial (SCHMID et al., 2001). Muito disto deve-se a alguns problemas que não foram ainda inteiramente solucionados, como catálise lenta contra substratos não-naturais, baixa estabilidade, pouca atividade em meios não-aquosos e/ou requerimento de cofatores de custo elevado (SCHMID et al., 2001),

(SCHOEMAKER; MINK; WUBBOLTS, 2003) e (FARINAS; BULTER; ARNOLD, 2001).

Apesar das dificuldades em estabelecer novos processos, foi publicada recentemente uma revisão mostrando um aumento no número de processos industriais que usam biocatálise, chegando a um total de 134 processos conhecidos (Figura 1) (STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002).

FIGURA 1 - NÚMERO DE PROCESSOS BIOCATALÍTICOS INDUSTRIAIS ESTABELECIDOS DESDE 1960



Legenda: o total de processos em biocatálise ao final de 2002 era de 134 processos conhecidos (STRAATHOF, PANKE, SCHMID, 2002).

Muitos destes 134 processos envolvem resoluções racêmicas para a obtenção de intermediários enantiopuros, que são difíceis de serem obtidas apenas utilizando catalisadores químicos, como é usualmente feito na síntese orgânica. Um esquema, mostrando as diversas etapas, para geração de um novo processo em biocatálise, é mostrado na Figura 2.

Primeiramente, para cada processo é preciso se conhecer em detalhes como a conversão entre reagentes e produtos ocorre, qual o tipo de reação e quais os biocatalisadores que possivelmente possam ser aplicados. A próxima etapa consiste da seleção do biocatalisador. A seleção pode ser feita de um grupo de biocatalisadores já

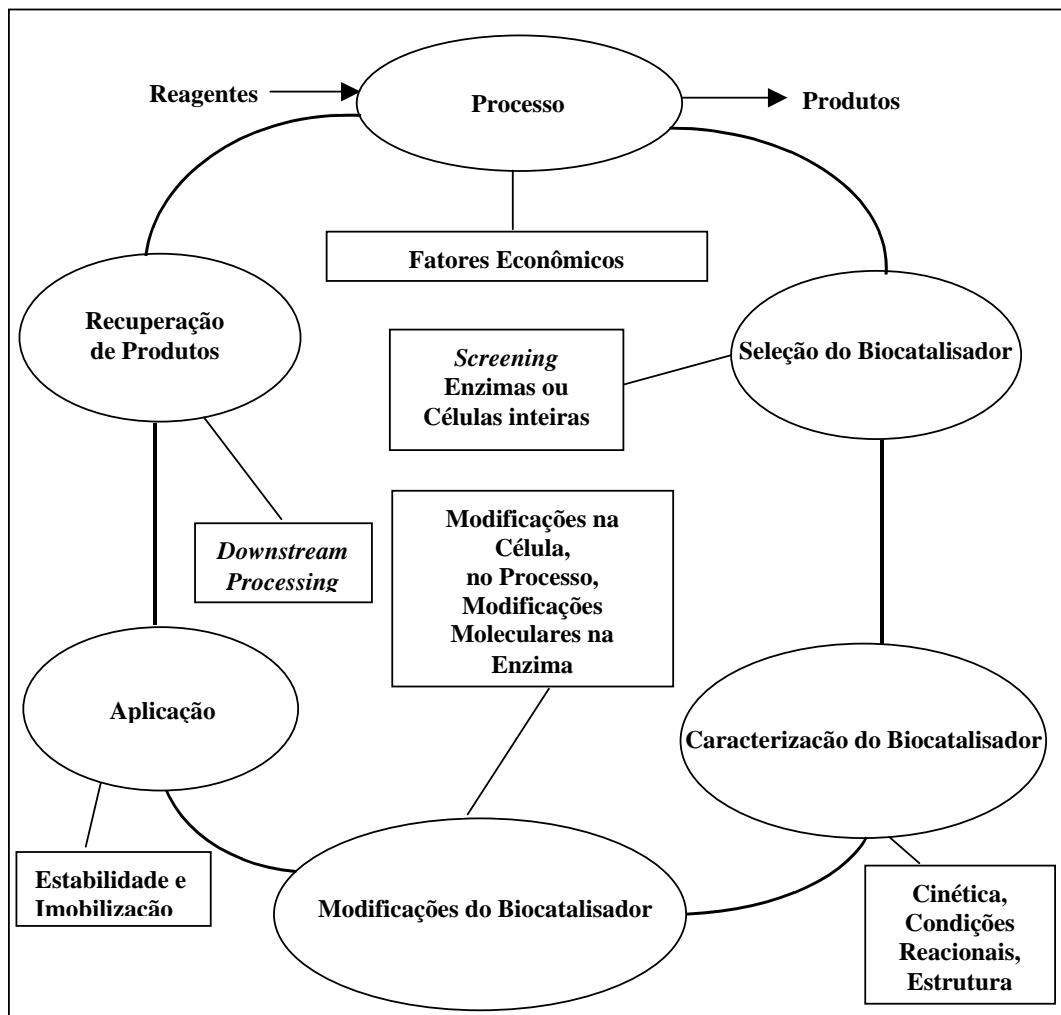
disponíveis no comércio ou mediante isolamento de uma nova enzima (ou microrganismo). Esta etapa é denominada bioprospecção e muitas vezes representa o maior gasto no estabelecimento de um novo processo. Depois de isolado, o biocatalisador passa por uma etapa de caracterização, que envolvem as condições de processo a serem utilizadas. Aquele que melhor desempenhar nestas condições é eleito à aplicação em larga escala. Algumas vezes, o número de microrganismos estudados na primeira triagem é incapaz de produzir o biocatalisador que se espera selecionar, sendo assim são necessários estudos de modificações moleculares (tal como a evolução dirigida) para sua obtenção. Com a obtenção do biocatalisador, as demais etapas visam otimizar a produção viabilizando os custos. Portanto, etapas de imobilização do biocatalisador, bem como de sua recuperação, são necessárias. Os estudos referentes a processos de recuperação do produto final, e também de recuperação do biocatalisador, são chamados de *downstream processing*, e representam grande importância para o rendimento final do processo.

Como se pode observar, analisando o ciclo da biocatálise, os processos de biocatálise podem ser perfeitamente viáveis, no entanto, o planejamento para redução de custos precisa ser priorizado. Isto porque os processos biocatalíticos diferem dos processos puramente químicos, pelo envolvimento de fatores de controle diferenciados, como a cinética do biocatalisador, a estabilidade no processo e a fisiologia do microrganismo que está sendo utilizado (SCHMID et al., 2001). Para que um processo de biocatálise seja financeiramente viável é preciso analisar cada um dos pontos apresentados neste ciclo.

Atualmente, alguns processos enzimáticos estão sendo aplicados em conjunto com processos químicos. Em alguns casos os processos enzimáticos podem substituir totalmente os processos químicos. As empresas farmacêuticas e de química fina que vêm aplicando processos enzimáticos concentram-se principalmente na Europa e Japão. Como exemplo de empresas européias pode-se citar a Ciba, Lonza, Baxeden, Avecia, Brudel Zink, BASF, Biochemie, Cereol, Chirotech, Degussa, DSM, Novartis, Windel e Roche (SCHMID et al., 2002). Ogawa e Shimizu (2002) publicaram uma revisão das empresas que aplicam processos enzimáticos no Japão e apontaram as

seguintes empresas: Ajinomoto, Kyowa Hakko Kogyo, Nissin Sugar, Mitsubishi Chemical, Shin Mitsui Sugar, The Nissin Oil Mills, Toho Rayon, e Tosoh Corporation.

FIGURA 2 - CICLO DA BIOCATÁLISE



Fonte: (SCHMID et al., 2001).

2.2. O BIOCATALISADOR – APLICAÇÃO DE ENZIMAS

Existem duas maneiras de se desenvolver um novo processo em biocatálise: (1) avaliando as propriedades dos biocatalisadores disponíveis e desenvolvendo um processo a partir destas propriedades; (2) desenvolvendo um processo a partir da demanda por certos produtos e buscando um biocatalisador capaz de produzir os compostos de interesse.

Para ambas as abordagens, porém, algumas características intrínsecas ao biocatalisador precisam ser avaliadas, como a termoestabilidade, os parâmetros cinéticos, a estabilidade a solventes orgânicos e a exigência de cofatores (SCHMID et al., 2001). No caso de o biocatalisador requerer a presença de um cofator, é mais viável a utilização de células inteiras, pois elas são capazes de regenerar o cofator exigido.

Atualmente, a tecnologia desenvolvida no campo da biologia molecular permite com que propriedades especiais sejam geradas em enzimas, ou que algumas propriedades naturais das enzimas sejam melhoradas (BORNSCHEUER; POHL, 2001). Isto pode representar um atalho para o desenvolvimento de novos processos, pois, o tempo e o gasto financeiro exigido para a descoberta de uma nova enzima com propriedades melhoradas, por bioprospecção microbiana, podem ser muito elevado.

2.3 LIPASES EM BIOCATÁLISE – APLICAÇÕES

As lipases são classificadas como triacilglicerol carboxilesterases (EC 3.1.1.3) (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Elas podem catalisar a hidrólise ou a síntese de triacilgliceróis cujos ácidos graxos sejam de cadeia longa (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Não há, ao certo, uma classificação que defina o número de carbonos de uma cadeia longa; no entanto, alguns autores costumam definir como triacilgliceróis de cadeia longa aqueles constituídos por ácidos graxos com mais de 10 carbonos. Para lipases, o substrato padrão é a trioleína (trioleilglicerol). A hidrólise ou síntese de triacilgliceróis, constituídos por ácidos graxos com menos do que 10 carbonos é catalisada com maior frequência por esterases. O substrato padrão para esterases é a tributirina (tributirilglicerol), que, entretanto, podem também ser hidrolisada por lipases (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

As aplicações biotecnológicas envolvendo lipases têm crescido significativamente, principalmente na síntese de compostos quirais, conforme pode ser observado na Tabela 1. (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999); (JAEGER; REETZ, 1998); (JAEGER; EGGERT, 2002).

TABELA 1 - APLICAÇÃO DE LIPASES PARA OBTENÇÃO DE DIVERSOS PRODUTOS

Enzima	Produto	Comentário	Referência
Lipase de <i>Candida antarctica</i>	Flavonóide (naringina) acilado	Produto mostrou atividade antibiótica	(MELLOU et al., 2005)
Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Álcool S-(α)-ciano-3-fenóxi benzoíco	Intermediário na síntese de inseticida piretróide.	(ZHOU; XU, 2005)
Lipase pancreática de porco	Florhydral [®]	Fragrância para perfumes	(ABATE et al., 2004)
Lipase de <i>Candida antarctica</i>	Biolubrificante	Produto obtido pela esterificação de óleo fúsel e ácido oléico	(DÖRMÖ et al., 2004)
Lipase de <i>Candida rugosa</i> e <i>Chromobacterium viscosum</i>	Análogos da 1 α ,25-dihidróxi-vitamina D3	Precussores quirais da vitamina D	(OVES et al., 2004)
Lipase de <i>Candida antarctica</i>	Acetatos de (+)-10-alkuil-fenotiazinil-3-cianometil.	Intermediário quiral para a síntese de fenotiazínicos	(PAIZS et al., 2004)
Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Poliéster e policarbonato	Policondensação de diferentes monômeros gerando novos polímeros	(KIM; DORDICK, 2001)

CONTINUAÇÃO DA TABELA 1 - APLICAÇÃO DE LIPASES PARA OBTENÇÃO DE DIVERSOS PRODUTOS

Enzima	Produto	Comentário	Referência
Lipase de <i>Rhizopus orizae</i> expressa em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Biodiesel	Utilização de células inteiras liofilizadas	(MATSUMOTO et al., 2001)
Lipase de <i>Pseudomonas</i> sp. (AK)	Intermediário enantiopuro da síntese de eptilonas agente antitumoral	Agente antitumoral	(ZHU; PANEK, 2001)
Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Intermediários enantiopuros da síntese de compostos antimicrobianos (S)- e (R)-elvirol e seus derivados (S)-(+)- e (R)-(-)- curcufenol	O (R)-(-)-curcufenol exibe atividade antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Vibrio anguillarum</i> , enquanto o (S)-(+)-enantiômero inibe a H ⁺ /K ⁺ -ATPase gástrica	(ONO et al., 2001)
Lipase de <i>Serratia marcescens</i>	Intermediário enantiopuro da síntese do diltiazem		(SHIBATANI et al., 2000)
Lipase de <i>Candida antarctica</i>	<i>cis</i> -4-hidróxi-D-prolina	Intermediário da síntese de vários produtos agroquímicos	(SIGMUND et al., 2001)
Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	(-)-mentol; (-)-mentil metacrilato	Polimerização do derivado metacrilato levou a obtenção de um fixador para perfumes	(ATHAWALE; MANJREKAR; ATHAWALE, 2001)

A aplicação de lipases é ampla e pode ser utilizada para obtenção de diversos produtos. Do ponto de vista econômico, a produção de compostos quirais tem se mostrado a mais interessante. Além destes, outros produtos de ampla aplicação como poliésteres e policarbonatos podem ser obtidos através de lipases. Uma linha crescente na aplicação destas enzimas é o estudo das reações de transesterificação para a obtenção de biodiesel, um produto promissor que tem ganhado bastante atenção nos últimos anos.

O sucesso na aplicação de lipases se dá, em grande parte, pela sua capacidade em catalisar reações com uma grande variedade de substratos não-naturais, permitindo o seu uso para a obtenção de diversos tipos de compostos. Além disso, lipases podem ser usadas em solventes orgânicos em que a maioria dos compostos orgânicos (substratos e/ou produtos) é solúvel. Estas vantagens, associadas à disponibilidade no mercado mundial e o preço razoável para a compra, fazem das lipases biocatalisadores em potencial para a preparação de compostos opticamente puros.

Até o momento, muito conhecimento tem sido gerado sobre a resolução ótica de álcoois, especialmente de álcoois secundários, por meio de lipases. Porém, uma outra classe importante de intermediários, constituída pelos ácidos quirais, não tem sido bem estudada. A resolução racêmica de alguns ácidos quirais (S-2-metil-cloropropionato) pode criar oportunidades para a aplicação da biocatálise preparativa em nível industrial. Existem alguns exemplos da aplicação de lipases para a obtenção de alguns intermediários na síntese de fármacos enantiopuros, como o diltiazem (YAMADA et al., 1999), naproxen (TSAI; TSAI; CHANG, 2001) e ibuprofen (XIE; LIU; CHEN, 1998).

Alguns dos processos que aplicam lipases foram estabelecidos pela empresa alemã BASF, que tem investido em muitos processos biotecnológicos para a produção de intermediários enantiomericamente puros e seus derivados (BASF BIOTECHNOLOGY, 2004). Esta empresa estabeleceu um processo de resolução racêmica de álcoois por esterificação com lipases em meio orgânico. A produção é da escala de milhares de toneladas por ano e o processo é aplicado a uma grande variedade de álcoois (SCHMID et al., 2001).

Apesar das aplicações com lipases terem sucesso, principalmente devido às propriedades de enzimas comerciais, normalmente obtidas por manipulação genética, ou daquelas encontradas na biodiversidade, ainda é possível melhorar algumas propriedades destas enzimas através de técnicas de evolução *in vitro*, juntamente com métodos de *screening* das características de interesse (BORNSCHEUER; POHL, 2001).

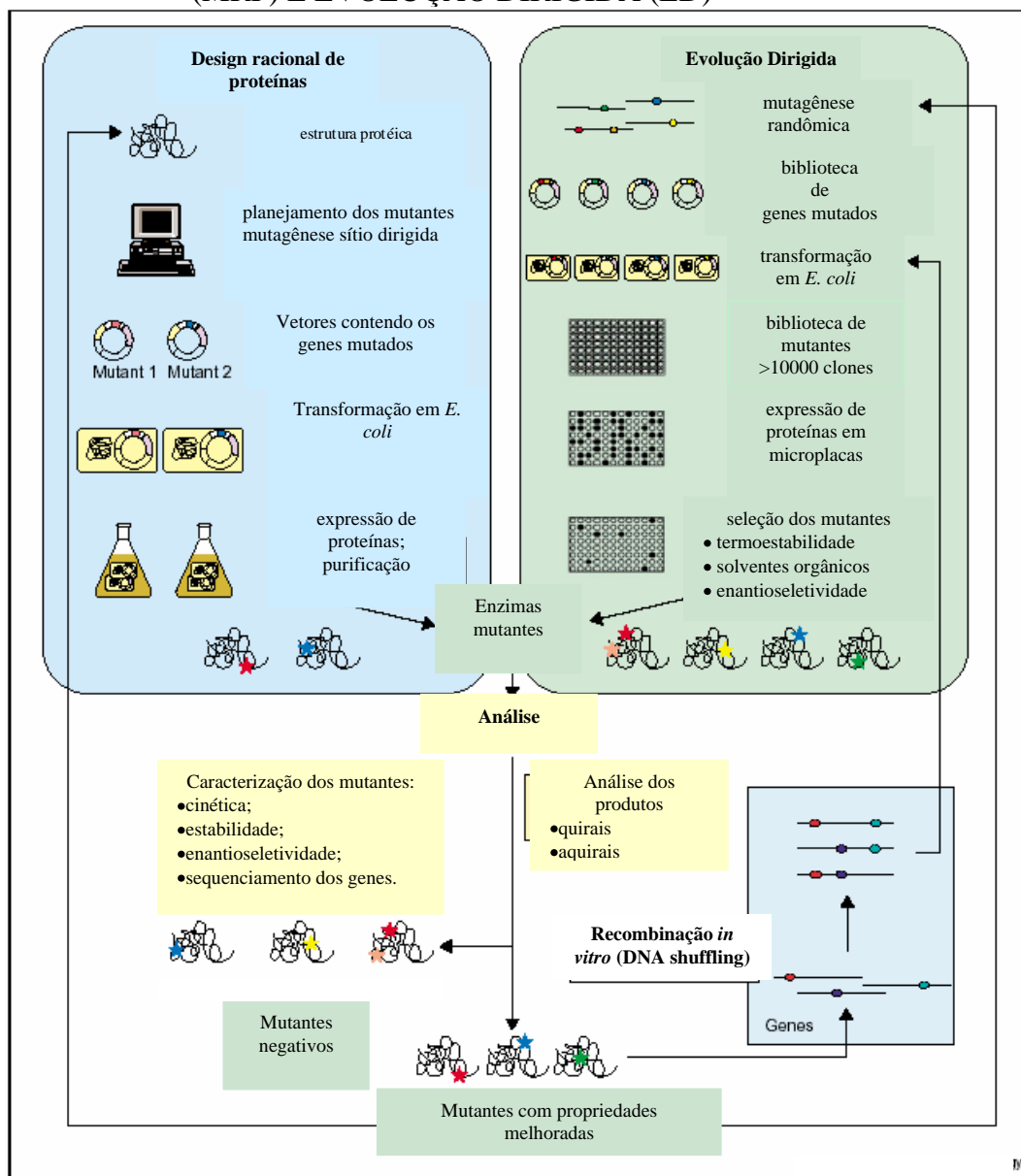
2.4 EVOLUÇÃO DIRIGIDA – A ENGENHARIA DO BIOCATALISADOR

Apesar das enzimas apresentarem diversas vantagens frente a um catalisador tipicamente químico, elas também podem apresentar certas limitações quando se pensa na utilização em grande escala (FARINAS; BULTER; ARNOLD, 2001). Algumas condições de processo em larga escala como altas temperaturas e pressões diminuem drasticamente a eficiência catalítica das enzimas.

As modificações em nível molecular de enzimas podem produzir um ganho real no desempenho do biocatalisador, pela obtenção de mutantes capazes de se adaptarem a condições adversas.

Existem basicamente duas abordagens diferentes para a modificação das propriedades do biocatalisador: (1) a modelagem racional de proteínas (MRP) e (2) a evolução dirigida (ED) (BORNSCHEUER; POHL, 2001). Ambas as abordagens tem por finalidade a obtenção de biocatalisadores com propriedades melhoradas, tais como um aumento na estabilidade térmica, na temperatura ótima para atividade, e na estabilidade frente a solventes orgânicos, entre outras. No esquema da Figura 3, é apresentada uma comparação entre as duas abordagens mais aplicadas para modificação molecular de enzimas (BORNSCHEUER; POHL, 2001). Na MRP, os mutantes são primeiramente planejados através de modelos computacionais e de informações estruturais, disponíveis em bancos de dados como o PDB (Protein Data Bank). Neste caso, as mutações são geralmente sítio-dirigidas, os vetores com genes mutagenizados são transformados em *E. coli* e a proteína expressa para análise das possíveis modificações.

FIGURA 3 - COMPARAÇÃO DE MODELAGEM RACIONAL DE PROTEÍNAS (MRP) E EVOLUÇÃO DIRIGIDA (ED)



Fonte: Adaptado de Bornscheuer e Pohl (2001).

Na ED, uma grande biblioteca de mutantes é gerada aleatoriamente, através de técnicas de mutagênese randômica, como PCR mutagênico ou mutagênese aleatória *in vivo* (*E. coli* XL-1 RED). Esta biblioteca é submetida à expressão e analisada por sistemas de *high-throughput screening* (HTS), que em português podem ser denominados de métodos de triagem de alto rendimento. Com estes sistemas de triagem é possível analisar um grande número de mutantes em espaços curtos de tempo. Os melhores mutantes selecionados podem ser submetidos a novos ciclos de

mutagênese randômica ou recombinados entre si, por uma técnica conhecida como DNA *shuffling* (STEMMER, 1994). A recombinação por DNA *shuffling* faz uso da geração *in situ* de oligonucleotídeos a partir da hidrólise aleatória dos genes mutagenizados. Em uma segunda etapa, este conjunto de oligonucleotídeos é utilizado como *primers* para uma reação de PCR convencional. Conforme o padrão de anelamento destes *primers*, podem ser obtidos variantes que possuem fragmentos diferentes de cada gene mutagenizado. Em ambos os casos, as enzimas mutantes precisam ser caracterizadas através do seqüenciamento de DNA dos genes obtidos.

Como as informações estruturais nem sempre indicam satisfatoriamente quais as posições e o tipo de modificação que deve ser feito para implementar algumas propriedades, a evolução dirigida apresenta vantagens em relação a modelagem racional, pois amplia a chance de localização do mutante de interesse. No entanto, como as possibilidades de mutações são muito amplas, o número de mutantes a ser analisado, em uma biblioteca randômica, pode representar um obstáculo para a seleção dos melhores mutantes.

Muitos autores têm elaborado métodos de evolução dirigida concentrando os esforços na qualidade da biblioteca gerada e não apenas na quantidade. Sendo assim, técnicas de mutagênese combinatória são boas ferramentas para redução do tamanho das bibliotecas a serem analisadas (LUTZ; PATRICK, 2004). Porém, o conhecimento prévio das regiões a serem mutagenizadas se faz necessário.

Com o avanço dos estudos em modelagem molecular, algumas características em comum vêm sendo observadas e destacadas como possíveis sítios de mutagênese. KAZLAUSKAS (2000) publicou uma revisão mostrando, estruturalmente, qual seria a origem da enantiosseletividade de enzimas e sugerindo possíveis alterações a partir de substratos modelos. Até o momento, poucos estudos foram feitos tentando relacionar a estrutura e propriedades como enantiosseletividade e resistência a solventes orgânicos; porém, no futuro, o conhecimento de tais relações poderá revolucionar a biotecnologia, com a geração de novos biocatalisadores.

Apesar das dificuldades discutidas até então, a evolução dirigida tem mostrado sucesso na geração de diversas enzimas com propriedades melhoradas. Na Tabela 2 são mostrados alguns dos exemplos.

TABELA 2 - EXEMPLOS DE BIOCATALISADORES MELHORADOS POR EVOLUÇÃO DIRIGIDA

Biocatalisador	Alvo da Evolução	Referência
Lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Enantiosseletividade aumentada (E=1 para 26)	(REETZ et al., 1997)
Lipases de <i>Staphylococcus hyicus</i> e <i>S. aureus</i>	Especificidade de substratos alterada, fosfolipídios contra ésteres de cadeia curta (12 vezes mais especificidade)	(van KAMPEN; EGMOND, 2000)
Esterase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Seletividade aumentada	(BORNSCHEUER; ALTENBUCHNER; MEYER, 1999)
p-Nitrobenzil esterase de <i>Bacillus subtilis</i>	Termoestabilidade aumentada	(GIVER et al., 1998)
p-Nitrobenzil esterase	Atividade aumentada em solventes orgânicos (dimetilformamida)	(MOORE; ARNOLD, 1996)
Protease de <i>Bacillus sphaericus</i>	Atividade aumentada em 10 °C	(WINTRODE; MIYAZAKI; ARNOLD, 2000)
Subtilisina de <i>Bacillus lentus</i>	Nível de expressão aumentado em 50 %	(NAKI et al., 1998)

CONTINUAÇÃO DA TABELA 2 - EXEMPLOS DE BIOCATALISADORES MELHORADOS POR EVOLUÇÃO DIRIGIDA

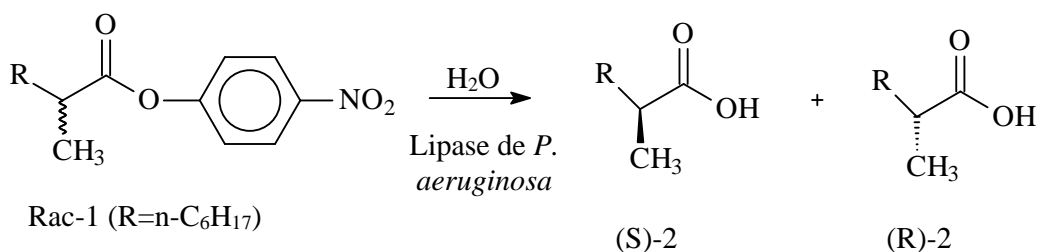
Biocatalisador	Alvo da Evolução	Referência
β -lactamase	Atividade aumentada frente cefotaxima (23.000 vezes)	(STEMMER, 1994)
Galactosidase	Mudança de atividade para fucosidase	(ZHANG; DAWES; STEMMER, 1997)
Esterase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Enantiosseletividade aumentada frente ao substrato 3-bromo-2-metil propionato	(PARK et al., 2005)
Haloalcano dehalogenase de <i>Rhodococcus</i> sp.	Ampliar atividade frente ao 1,2,3-tricloro propano	(JANSEEN, 2004)
Epóxido hidrolase de <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Aumentar enantiosseletividade frente a vários epóxidos quirais	(van LOO et al., 2004)
Anticorpo catalítico com atividade aldolásica	Aumentar a especificidade para substratos dicetônicos	(TANAKA et al., 2004)
Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aumentar a atividade frente a óleo de oliva em sistemas reacionais de duas fases (aquosa:orgânica)	(JUNG et al., 2003)

2.5 EVOLUÇÃO DIRIGIDA DE LIPASES

A maior parte dos trabalhos envolvendo evolução dirigida e lipases concentra-se na área da enantiosseletividade. O grupo de Manfred T. Reetz (Mülheim an der Ruhr, Alemanha) conseguiu obter variantes da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* com grande aumento no coeficiente de enantiosseletividade (E) utilizando o 2-metildecanoato de *p*-nitrofenila como substrato (REETZ, 2002). Os resultados desse trabalho mostraram que a evolução dirigida poderia ser aplicada com sucesso para o

aumento da enantiosseletividade de lipases. Inicialmente, a lipase de *P. aeruginosa* mostrava não ser seletiva para nenhum dos dois enantiômeros (Figura 4).

FIGURA 4 – ENSAIO APLICADO PARA DETERMINAR O AUMENTO DE ENANTIOSELETIVIDADE DA LIPASE DE *P. aeruginosa* FRENTE AO 2-METILDECANOATO DE *p*-NITROFENILA



Fonte: REETZ, 2002.

As enzimas mutantes geradas através de PCR mutagênico foram ensaiadas contra o éster de 2-metildecanoato. Este ácido possui um centro quiral no carbono 2. Cada mutante foi analisado frente ao isômero R e S separadamente, e as taxas de reação foram utilizadas para calcular o E (coeficiente de enantiosseletividade), neste caso, a relação entre a velocidade do consumo do isômero S pela velocidade de consumo do isômero R. Neste exemplo, o E pode ser considerado aparente, pois trata-se apenas de uma relação entre as velocidades das duas reações. Costuma-se utilizar um outro coeficiente denominado excesso enantiomérico (e.e.), que é uma relação calculada a partir de resultados da quantificação de cada isômero. Para a quantificação são mais utilizadas técnicas cromatográficas tal como CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e CG (cromatografia de fase gasosa).

Inicialmente, a lipase de *P. aeruginosa* não apresentava seletividade, já que o E determinado era igual a 1,1. Após uma série de mutações e etapas de seleção, os autores conseguiram chegar a um mutante com o E aumentado em cerca de 25 vezes para o isômero S.

JUNG et al. (2003) conseguiram obter, através de evolução dirigida três mutantes da lipase de *P. fluorescens* com atividades cerca de 20 vezes maiores do que a da lipase selvagem. Surpreendentemente, não foram encontradas mutações próximas

ao sítio ativo, nem mesmo nos aminoácidos envolvidos com a catálise. Os autores buscam agora uma forma de obter a estrutura tridimensional destas enzimas para poderem interpretar, em base molecular, estes resultados.

KOGA et al. (2003) modificaram a lipase de *Burkholderia cepacia* através de mutagênese combinatória. Os resíduos de leucina17, fenilalanina119, leucina167 e leucina266 foram eleitos para modificação. Estes resíduos estão localizados no “bolso” hidrofóbico da enzima e em contato com a porção acila do substrato. Todos os quatro resíduos foram substituídos por outros resíduos hidrofóbicos, sendo eles: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina e fenilalanina. A seleção dos mutantes frente à hidrólise dos isômeros R e S do éster 3-fenil butirato de *p*-nitrofenila levou ao isolamento de 32 variantes com maior atividade frente ao isômero R, enquanto a lipase selvagem mostrava baixa atividade frente a este isômero e alta atividade frente ao isômero S. Portanto, com esta estratégia de mutagênese KOGA et al. (2003) conseguiram inverter a enantioseletividade da lipase de *B. cepacia*.

ACHARYA et al. (2004) aplicaram mutagênese aleatória por PCR e métodos de *screening* para seleção de variantes termoestáveis da lipase de *Bacillus subtilis*, uma das menores lipases conhecidas com apenas 19,3 kDa. Um dos mutantes obtidos teve sua estabilidade a 55 °C aumentada em 300 vezes, quando comparada com a estabilidade da lipase selvagem. O trabalho de ACHARYA et al. (2004) trouxe um avanço para a literatura, pois os melhores mutantes obtidos foram purificados e analisados por cristalografia de raios-X, o que permitiu uma interpretação mais apurada dos resultados. Com esta análise, os autores conseguiram determinar que a substituição de um resíduo de asparagina (posição 166) por uma tirosina gerou uma interação de empilhamento hidrofóbico com outra tirosina (posição 25). Esta interação ocorre devido ao contato paralelo de orbitais π . Como estas duas tirosinas estão localizadas em hélices vizinhas, sugere-se que esta interação sirva para aumentar o empacotamento destas estruturas, levando a uma maior estabilização da enzima. No entanto, outras características importantes do ponto de vista industrial não têm sido extensivamente estudadas para lipases. Uma delas é a tolerância a solventes orgânicos. Todas as reações que aplicam lipases em solventes orgânicos, durante várias horas, necessitam de enzimas na forma imobilizada ou liofilizada, pois, na forma livre, a

enzima perde rapidamente a sua atividade. A presença de água no sistema torna a estrutura da enzima mais flexível, podendo ser facilmente desdobrada pela interação com solventes. Ao contrário, a enzima liofilizada ou imobilizada é rígida, e portanto, sofre menos a ação dos solventes. Além disso, o suporte de imobilização ou as camadas mais externas do pó liofilizado podem servir como barreira para a desnaturação por solventes. A obtenção de variantes de lipases que permaneçam ativas por mais tempo em solventes orgânicos pode favorecer ainda mais a utilização destas enzimas, já que o custo dos processos de imobilização e liofilização acaba encarecendo o produto final. Portanto, há um grande interesse em se estabelecer novos conhecimentos relacionando a estrutura de enzimas com a adaptação a condições adversas de reação (YANO; POULOS, 2003).

Alguns exemplos de estabilização de enzimas a solventes orgânicos já foram demonstrados através da evolução dirigida. CHEN e ARNOLD (1993) obtiveram um mutante da protease subtilisina E cerca de 256 vezes mais ativo do que a subtilisina E selvagem em misturas aquosas contendo 60 % de DMF. MOORE e ARNOLD (1996) obtiveram uma variante de *p*-nitrobenzil esterase com um aumento de atividade 16 vezes superior ao da esterase selvagem em DMF 30 % em água.

SONG e RHEE (2001) aplicaram mutagênese aleatória para aumentar a estabilidade da fosfolipase A₁ de *Serratia* sp. em DMSO 30 % em água. O mutante selecionado teve o seu tempo de meia-vida aumentado cerca de 4 vezes na presença de DMSO.

Apesar dos exemplos de modificação molecular para aumentar a estabilidade de enzimas em solventes orgânicos, ainda não há trabalhos empregando esta estratégia à lipase de *Burkholderia cepacia*.

2.6 ESTRUTURA DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia*

Algumas estirpes do gênero *Pseudomonas* foram reclassificadas no gênero *Burkholderia* (YABUUCHI *et al.*, 1992). Portanto, alguns trabalhos mais antigos envolvendo esta bactéria foram publicados com o nome científico *Pseudomonas cepacia*.

O gene que codifica para a lipase de *B. cepacia* foi clonada primeiramente por JØRGENSEN et al. (1991) sendo denominado como *lipA*. O tamanho do gene foi determinado em 1095 pares de base e a proteína expressa conteria 364 aminoácidos, conforme deduzido a partir da seqüência de DNA. Entretanto, KORDEL et al. (1991) publicou a seqüência de aminoácidos da lipase expressa pela estirpe de *B. cepacia* ATCC 21808, compreendendo 320 aminoácidos. Portanto, é provável que a lipase madura perca uma parte da sua porção N-terminal, que é inicialmente expressa.

Através da similaridade das seqüências de aminoácidos, ARPIGNY e JAEGER (1999) publicaram uma classificação das diversas lipases bacterianas que já haviam sido seqüenciadas. A maioria das lipases produzidas pelo gênero *Pseudomonas* foi classificada da família I, que por sua vez foi dividida em 6 subfamílias. Apesar da reclassificação de algumas espécies do gênero *Pseudomonas* em *Burkholderia*, as lipases produzidas por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* continuam sendo classificadas na família I. A lipase de *B. cepacia* faz parte da família I.2, como mostrado na Tabela 3. As similaridades foram calculadas assumindo o primeiro membro de cada família como 100 %. No caso da família I, a lipase de referência é a produzida por *P. aeruginosa*, e dentro da subfamília 2, a lipase de *B. glumae* foi selecionada como referência. Com isto, a lipase de *B. cepacia* é apenas 33 % similar com a de *P. aeruginosa*, porém, 78 % similar com a de *B. glumae*.

TABELA 3 – COMPARAÇÃO DA SIMILARIDADE DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS LIPASES DA FAMÍLIA I.2

Microrganismo produtor da lipase	Similaridade (%)	
	Família ^a	Subfamília ^b
<i>Burkholderia glumae</i>	35	100
<i>Chromobacterium violaceum</i>	33	100
<i>Burkholderia cepacia</i>	33	78
<i>Pseudomonas luteola</i>	33	77

a – homologia com a lipase de *P. aeruginosa*; b – homologia com a lipase de *B. glumae*.
 Fonte: ARPIGNY e JAEGER (1999).

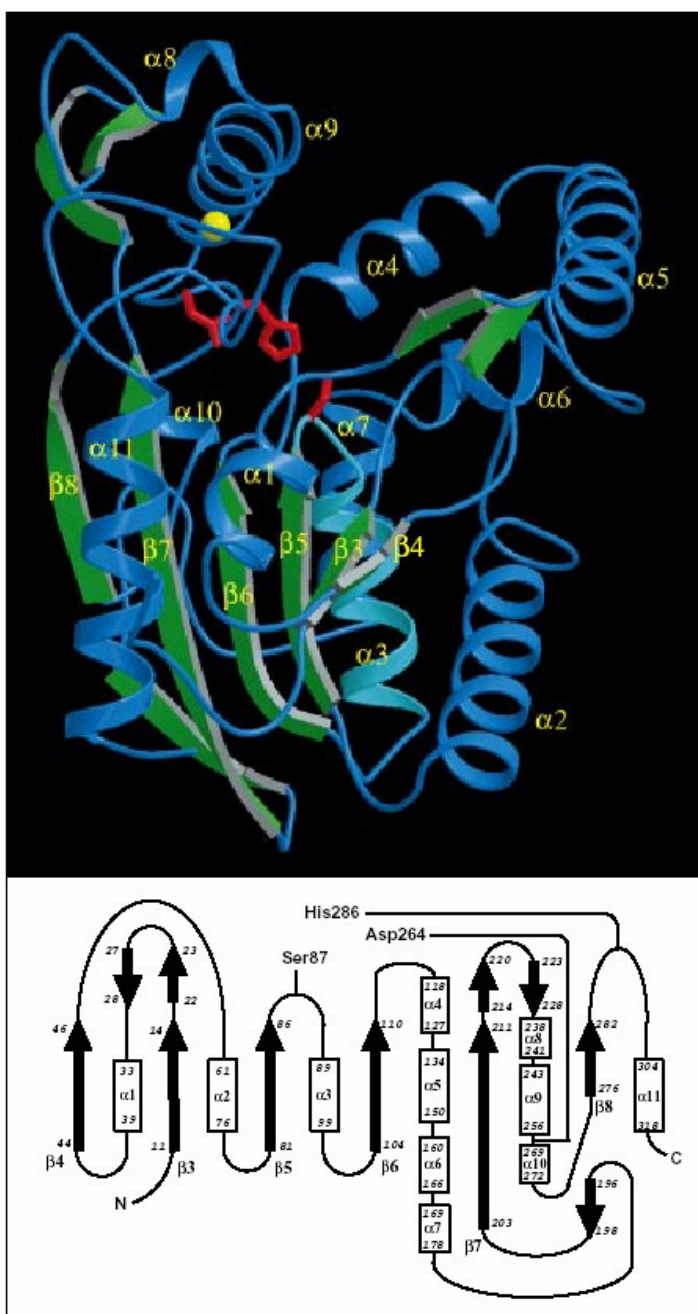
Todas as lipases da família I.2 são classificadas como lipases verdadeiras, ou seja, aquelas que mostram atividade máxima frente a triacilgliceróis, insolúveis em água (ARPIGNY; JAEGER, 1999).

A lipase de *B. cepacia* já foi cristalizada na sua conformação aberta (SCHRAG et al., 1997), (KIM et al., 1997). A estrutura determinada por SCHRAG et al. (1997), foi depositada no PDB (Protein Data Bank – www.rcsb.org/pdb/) com o código de identificação 3LIP. Com os resultados da cristalografia, os autores observaram que o sítio ativo desta enzima fica exposto ao solvente do meio reacional. Resultados da superposição da estrutura da lipase de *B. cepacia* com outras lipases como as de *B. glumae* e *C. violaceum* indicam que a alternância da conformação fechada para a aberta envolve três voltas estruturais. O movimento maior envolve o estiramento de cerca de 40 resíduos, levando ao movimento de uma hélice para forçar o acesso do sítio ativo. Além disso, é formada ao redor do sítio ativo uma fenda hidrofóbica que corresponde ao sítio de ligação da parte lipídica dos substratos.

A estrutura das lipases microbianas, até mesmo as lipases de mamíferos, tem um dobramento característico conhecido como de α/β hidrolase. De fato, este motivo estrutural é comum a uma grande variedade de outras hidrolases (OLLIS et al., 1992). Estas enzimas são serina hidrolases com a tríade catalítica similar à das proteases serínicas. Especificamente, para a lipase de *B. cepacia*, a tríade é composta pelos resíduos de Ser87, His286 e Asp264 (SCHRAG et al., 1997); (KIM et al., 1997), como mostrado na Figura 5. Foi observado que, na parte central da estrutura, há uma série de

folhas β (entre as folhas $\beta 3$ e $\beta 8$) que estão de acordo com o motivo estrutural de α/β dobramento (OLLIS et al., 1992). Na Figura 5, pode-se observar que as folhas β foram numeradas de acordo com a numeração consensual para o dobramento α/β ; deste modo, a folha $\beta 3$ é contada como sendo a primeira.

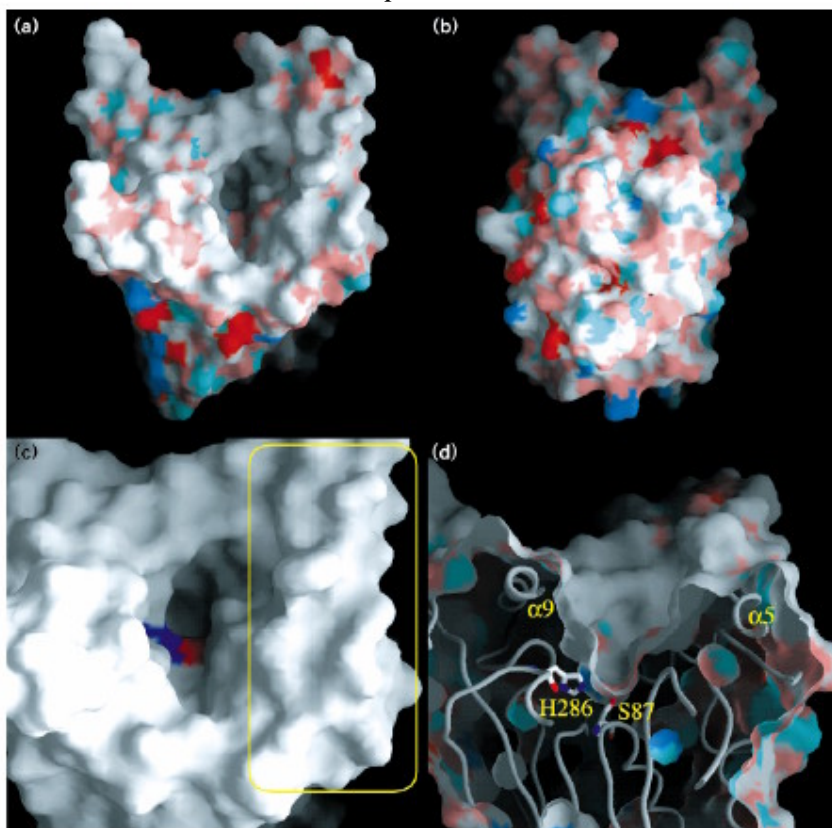
FIGURA 5 – MODELO TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia*



Legenda: Na parte superior da figura é mostrada uma representação na forma de fitas, sendo as fitas β representadas por flechas verdes e α -hélices como espirais azuis. A esfera amarela representa o íon Ca^{2+} no seu sítio de coordenação. As cadeias laterais, dos resíduos, do sítio ativo são representadas em vermelho. Na parte inferior é mostrado um diagrama esquemático da estrutura, com hélices representadas por retângulos e as fitas β como flechas. Os resíduos do sítio ativo estão destacados nas suas respectivas posições. Fonte: (SCHRAG et al., 1997).

Outra característica marcante da sua estrutura é a presença de uma série de resíduos hidrofóbicos formando o túnel que cerca o sítio ativo. Na Figura 6, é mostrada uma representação da superfície molecular da proteína, destacando a presença dos resíduos do sítio ativo.

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DA SUPERFÍCIE MOLECULAR DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* NA REGIÃO DO SÍTIO ATIVO



Legenda: (a) As cores foram utilizadas de acordo com a natureza dos átomos: oxigênios carregados (vermelho), oxigênios polares e oxigênios carbonílicos (rosa), nitrogênios (azul) e carbonos (branco). Na parte (a) sítio ativo visto de cima, (b) sítio ativo visto de lado, (c) na caixa amarela destaque para a α -hélice 5, que de fato é a tampa que cobre o sítio e (d) sítio visto de lado com destaque aos resíduos de Ser87 e His286.

Na Figura 6, também pode ser vista a tampa (ou *lid*) catalítica, que é um domínio responsável pela ativação interfacial das lipases (VERGER, 1997). Este fenômeno ocorre graças a uma mudança conformacional, quando a lipase entra em contato com uma interface água:lipídio. A *lid* interage preferencialmente com a parte lipídica da mistura, expondo o sítio ativo para o acesso do substrato.

Além dos resíduos do sítio ativo, outra região importante é o sítio de ligação de Ca^{2+} , que está coordenado por seis átomos de oxigênio, sendo quatro átomos da proteína e 2 de moléculas de água. Acredita-se que este seja um importante sítio para forçar a permanência de algumas ligações peptídicas na conformação *cis*, o que beneficiaria a proteína na manutenção de algumas ligações de hidrogênio (SCHRAG et al., 1997).

2.7 O SISTEMA DE MUTAGÊNESE

Neste trabalho, foi utilizada uma estirpe de *Escherichia coli* “mutagênica” comercializada com a marca XL-1 Red, pela Stratagene (La Jolla, Califórnia, EUA). Esta estirpe é um triplo mutante dos genes *mutS*, *mutD* e *mutT*, três genes do sistema primário de reparo de DNA.

O gene *mutS* expressa a proteína MutS, que é responsável por reparos em erros de pareamento iniciais durante a replicação. A MutS é uma ATPase que reconhece e se liga especificamente a regiões de despareamento. Após se ligar a estas regiões, esta proteína se associa a proteína MutL para ativar a proteína MutH, que é uma endonuclease responsável pela incisão do trecho defeituoso (JUNOP et al., 2003).

O gene *mutD* expressa a subunidade ϵ da DNA polimerase III responsável pela atividade exonucleásica 3'-5' desta enzima (SCHEUERMANN et al., 1983).

O gene *mutT* expressa uma pirofosfo hidrolase capaz de hidrolisar preferencialmente o 8-oxo-dGTP, um nucleotídeo mutagênico que pode parear com adenina levando a erros na replicação (MASSIAH et al., 2004).

As mutações geradas nestes três genes são capazes de aumentar a taxa de mutagênese 5000 vezes quando comparada com uma estirpe de *E. coli* tipo selvagem. A principal vantagem em se utilizar este sistema de mutagênese seria pela simplicidade em se obter as mutações se comparada a utilização de técnicas mais laboriosas como a PCR. Neste caso, apenas transformando a estirpe com um plasmídeo que contenha o gene de interesse e cultivando-a por várias gerações seria possível começar a selecionar os possíveis mutantes.

Vale ressaltar, entretanto, que este sistema também apresenta algumas desvantagens. As mutações não são limitadas somente ao gene de interesse, portanto, uma série de outros genes e regiões importantes do plasmídeo, como marca de resistência a antibióticos e origem de replicação, também podem ser mutadas e interferir na seleção dos mutantes. Além disso, as mutações também podem ocorrer no cromossomo da bactéria levando a mutações deletérias para a sua sobrevivência. Em um caso mais extremo, até mesmo pode se imaginar a reversão da característica mutagênica, por mutações nos genes previamente mutagenizados para gerar a estirpe XL-1 Red. Estas mutações fariam com que a estirpe voltasse a funcionar normalmente, revertendo completamente a característica mutagênica. Estes fatores fazem com que os fabricantes desta estirpe bacteriana não aconselhem o seu crescimento por várias gerações sucessivas, o que aumentaria significativamente a chance de tais mutações ocorrerem. Porém, alguns trabalhos encontrados na literatura têm relatado sucesso na utilização desta estirpe. A maioria destes trabalhos foi publicada por grupos que tradicionalmente pesquisam a aplicação de enzimas em biocatálise e, portanto, não estão habituados a utilização de técnicas de biologia molecular mais elaboradas.

ALEXEEVA et al. (2002) conseguiram ampliar o reconhecimento de substratos pela monoamino oxidase de *Aspergillus niger*, além de aumentar sua enantioselectividade frente a (S)- α -metil benzilamina. Foi utilizada mutagênese randômica, inseridas pela estirpe *E. coli* XL-1 Red, associada com um método de análise de alto rendimento em meio sólido. HORSMAN et al. (2003) também utilizaram a estirpe de *E. coli* XL-1 Red para aumentar a enantioselectividade da esterase de *Pseudomonas fluorescens* frente aos substratos 3-bromo-2-metil propanoato de metila e 3-fenil butirato de etila. Os autores identificaram que as mutações ocorreram longe do sítio ativo, sugerindo que melhores variantes poderiam ter sido obtidas focalizando as mutações na região próxima do sítio ativo.

3. OBJETIVO

A engenharia de proteínas é uma ferramenta atual e bastante utilizada em biocatálise. Com a sua utilização, a geração de biocatalisadores melhorados tem sido possível (KRISHNA, 2002). A utilização de técnicas de engenharia de proteínas para obtenção de biocatalisadores com propriedades melhoradas é justificada, especialmente quando a busca por novos biocatalisadores na natureza se torna exaustiva e de alto custo (STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de utilizar a técnica de mutagênese aleatória para obtenção de variantes da lipase de *Burkholderia cepacia* e também desenvolver técnicas de triagem para estes variantes. A estabilidade ao solvente dimetil formamida (DMF) foi testada como condição para a seleção dos possíveis mutantes.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar a técnica de evolução dirigida para as condições do laboratório
- Obter uma coleção de mutantes para a lipase de *B. cepacia*
- Desenvolver técnicas de triagem dos mutantes obtidos
- Selecionar mutantes por triagem da atividade enzimática
- Testar os mutantes frente à tolerância ao DMF 80 % (v/v) em água
- Caracterizar as mutações através do sequenciamento de DNA do gene mutagenizado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS, MEIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.1.1 Estirpes Bacterianas

As estirpes de *Escherichia coli* utilizadas no trabalho estão dispostas na Tabela 4.

TABELA 4 - ESTIRPES DE *E. coli* UTILIZADAS

Estirpe	Genótipo	Fornecedor
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG.</i>	(Invitrogen Co., San Diego, CA)
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara,leu) 7697 galU galK λ-rpsL (Str^R) nupG</i>	(Invitrogen Co., San Diego, CA)
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cm^R)</i>	(Novagen, EUA)
XL-1 Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lacFV [proAB+, lacIq lacZDM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	(Stratagene, La Jolla, CA)
XL-1 Red	<i>endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac mutD5 mutS mutT Tn10, Tet^R</i>	(Stratagene, La Jolla, CA)

4.1.2 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo utilizados estão dispostos na Tabela 5.

TABELA 5 - MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS^a

Meio	Composição
LB	Extrato de levedura 5 g.L ⁻¹ , NaCl 10 g.L ⁻¹ , triptona 10 g.L ⁻¹ .
LA	Extrato de levedura 5 g.L ⁻¹ , NaCl 10 g.L ⁻¹ , triptona 10 g.L ⁻¹ e agar 15 g.L ⁻¹ .
SOB	Triptona 20 g.L ⁻¹ , extrato de levedura 5 g.L ⁻¹ , NaCl 0,5 g.L ⁻¹
SOC	Triptona 20 g.L ⁻¹ , extrato de levedura 5 g.L ⁻¹ , NaCl 0,5 g.L ⁻¹ e glucose 3,6 g.L ⁻¹ .

a – Composições conforme SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989)

4.1.3 Antibióticos

Os antibióticos e as concentrações utilizadas estão dispostos na Tabela 6.

TABELA 6 - ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES DE USO

Antibiótico	Concentração no Estoque (mg.mL⁻¹)	Concentração no Meio (µg.mL⁻¹)
Ampicilina ^a	250	250
Canamicina ^a	100	50
Estreptomicina ^a	80	80
Tetraciclina ^b	10	10

a – ambos antibióticos foram preparados como soluções aquosas e filtrados por membranas de 0,45 µm; b – preparado em solução etanólica e filtrado por membrana de 0,45 µm.

4.1.4 Condições de Cultivo

4.1.4.1 Cultivos em frascos de vidro

Todos os cultivos foram iniciados a partir de inoculação na proporção de 1:50 (inóculo : meio), com um pré-inóculo crescido durante aproximadamente 16 horas em 3 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB). As estripes foram cultivadas em 10 mL de meio LB, em frascos de vidro de 50 mL, contendo o antibiótico apropriado, a 30 ou 37 °C com agitação de 160 rpm, até atingirem a D.O.₆₀₀ desejada.

4.1.4.2 Cultivo em placas do tipo *Deep Well*

As placas *deep well* (RILTER - Riplate[®]) são fabricadas com polipropileno, possuindo 96 poços com capacidade para 2,2 mL. Anteriormente ao uso, as placas foram esterilizadas por autoclavação. Em cada poço foi dispensado 1,25 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado e o meio foi inoculado com colônias isoladas, crescidas em meio LA, ou com pré-inóculos, em meios líquidos, na proporção 1:50 (inóculo : meio). As placas foram fechadas com adesivos plásticos e, ao início do cultivo, estes foram furados com agulha estéril permitindo a aeração de cada poço. O cultivo foi desenvolvido por aproximadamente 16 horas a 30 ou 37 °C, com agitação de 160 rpm.

4.1.4.3 Cultivo em placas tipo ELISA

As placas tipo ELISA (Greiner Bio-One[®]) foram preenchidas com 0,2 mL de LB mais o antibiótico apropriado, por poço. Os poços foram inoculados com colônias isoladas, crescidas em uma placa de Petri com meio LA, ou com pré-inóculos na proporção 1:50 (inóculo : meio). As placas foram inoculadas e fechadas como exposto na última seção, sendo que o cultivo foi desenvolvido da mesma maneira.

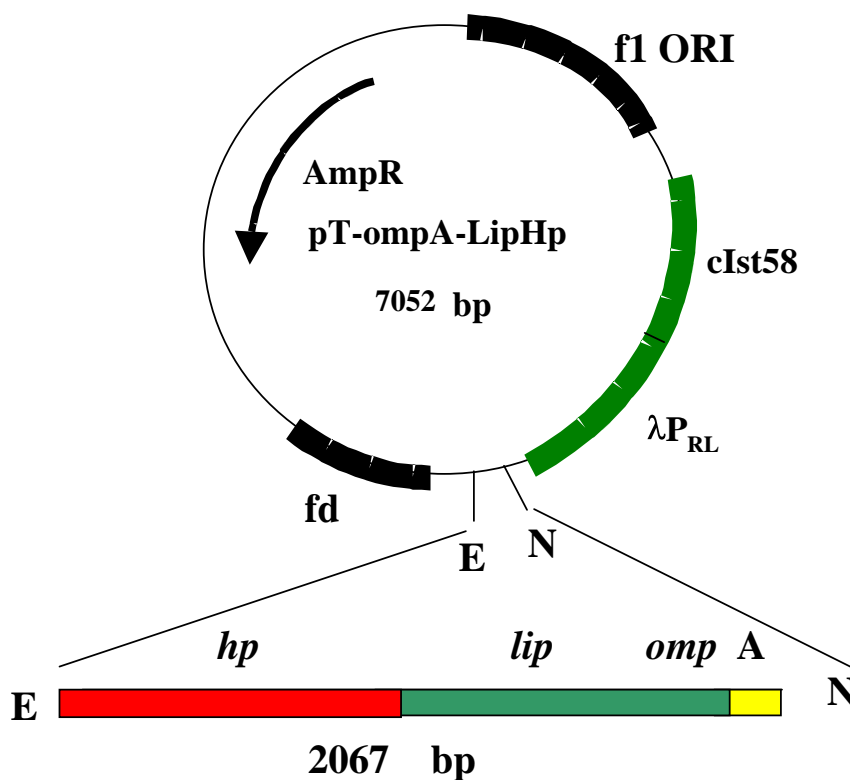
4.2 MANIPULAÇÃO DE DNA

4.2.1 Plasmídeos

A lipase de *B. cepacia* (LipA) precisa ser expressa juntamente com uma proteína foldase para efetivo dobramento da enzima. Como mostrado na Figura 7, o plasmídeo pT-ompA-LipHp apresenta os genes *lipA* e *hp* que codificam para a lipase e a foldase respectivamente, sob controle do promotor do fago λ . A presença da sequência sinal *ompA* permitiu aumentar a excreção da proteína expressa. Este

plasmídeo permitiu a expressão de boa parte da lipase na forma ativa, e foi gentilmente cedido pelo prof. Rolf D. Schmid da Universidade de Stuttgart – Alemanha. No entanto resultados previamente obtidos com este sistema de expressão em *E. coli* mostraram que cerca de 60 % da lipase é expressa como corpos de inclusão (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1999).

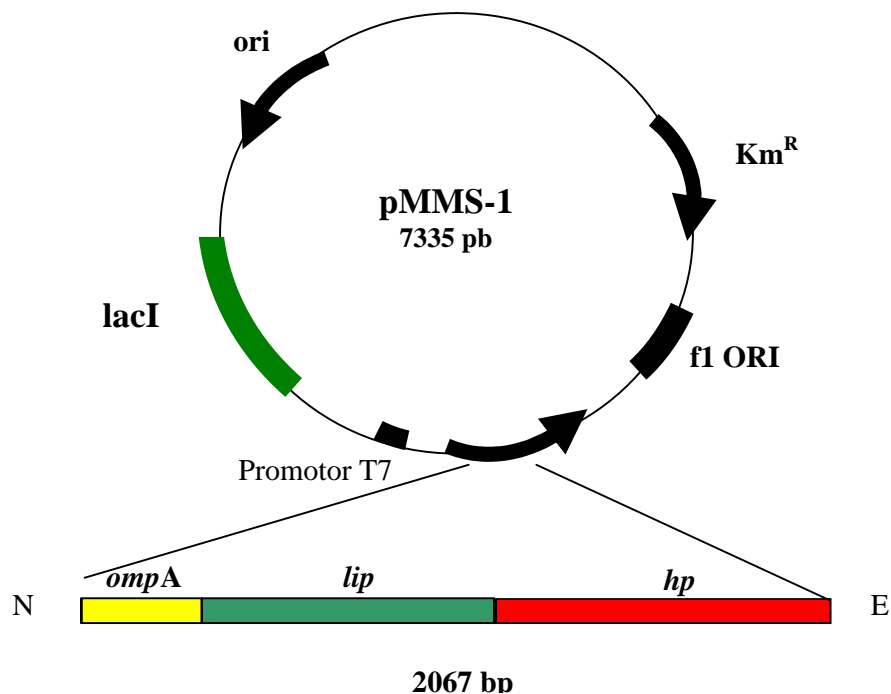
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO pT-ompA-LipHp



Legenda: plasmídeo pT-ompA-LipHp (7052 bp), operon *liphp* constituído pelo gene da lipase (970 bp) e pelo gene de uma proteína foldase (1032 bp). f1 ORI, origem de replicação; cIst58, co-repressor; λP_{RL}, promotor do fago lambda induzido por choque térmico; fd, terminador de transcrição; N e E, sítios para as enzimas de restrição NdeI e EcoRI, respectivamente; AmpR, gene da β-lactamase.

Na Figura 8, é mostrado o plasmídeo pMMS-1 obtido por subclonagem do operon *liphp* no vetor pET29a(+). Neste plasmídeo a expressão dos genes *lipA* e *hp* é dependente da RNA polimerase do fago T7.

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO pMMS-1



Legenda: plasmídeo pMMS-1 (7335 pb), subclonagem do operon *liphp* constituído pelo gene da lipase (970 bp) e pelo gene de uma proteína foldase (1032 bp). *ori*, origem de replicação; *lacI* – seqüência codificadora do gene *lacI*; N e E, sítios para as enzimas de restrição NdeI e EcoRI, respectivamente; KmR, gene de resistência a canamicina.

4.2.2 Transformação Bacteriana

4.2.2.1 Preparação de células eletrocompetentes

Colônias isoladas de *E. coli* foram inoculadas em 3 mL de meio LB. O inóculo foi incubado a 37 °C sob agitação de 160 rpm por 12 horas. Inoculou-se 100 mL de meio SOB em Erlenmeyer de 500 mL. A cultura foi incubada nas mesmas condições que o inóculo até D.O.₆₀₀ de 0,8. Quando a cultura atingiu esta D.O., foi colocada no gelo, durante 30 minutos. O meio foi transferido para os tubos de centrifuga gelados e centrifugados a 3.500 g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com o mesmo volume de água MilliQ[®] gelada. Este procedimento

foi repetido mais uma vez com meio volume de água. Após a última centrifugação, as células foram lavadas com glicerol 10 % (m/v) com 25 % do volume total do tubo e ressuspensas em 400 μL de glicerol 10 % (m/v). As células foram transferidas para tubos eppendorfs (30 μL) e armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2.2 Eletroporação

Alíquotas de 30 μL de células eletrocompetentes foram descongeladas, em banho de gelo, anteriormente à eletroporação. Na câmara de eletroporação foram pipetadas as misturas de 30 μL de células mais 1 μL da amostra contendo o DNA. As células foram submetidas a choque de 1.800 volts (25 μF e 200 Ω), e depois transferidas para 1 mL de meio SOC e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h para recuperação. Após este período, 100 μL da mistura foi plaqueado em meio LA contendo o antibiótico apropriado. Após 16 horas de crescimento, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi observada a formação de colônias. No caso da estirpe de *E. coli* XL-1 Red, cerca de 24 h de crescimento foram necessárias para se obter colônias de tamanho razoável.

4.2.2.3 Determinação da Eficiência de Transformação das Células de *E. coli*

Uma alíquota de 30 μL de *E. coli* XL-1 Blue foi eletroporada como descrito no item acima com 1 μL do plasmídeo pGEM[®]-T (Promega, Madison, WI, EUA) na concentração de $10\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. As células foram recuperadas em meio SOC e 100 μL do meio foram plaqueados em LA mais ampicilina. O número de colônias foi contado após 16 horas de crescimento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A equação abaixo foi utilizada para calcular a eficiência da transformação:

Número de transformantes/ μg de DNA plasmidial = (número de colônias/ 10 pg de DNA transformado) \times ($10^6\text{ pg/ } \mu\text{g}$) \times (1000 μL de reação de transformação/ 100 μL plaqueados)

4.2.3 Purificação de Plasmídeos por Lise Alcalina

A purificação de plasmídeos foi feita seguindo o protocolo de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). De uma cultura saturada coletou-se 1,5 mL e centrifugou-se por 1 min a 10.000 g. O precipitado foi ressuscitado em 150 µL de solução GET (glucose 50 mmol.L⁻¹, EDTA 10 mmol.L⁻¹ e Tris-HCl 25 mmol.L⁻¹; pH 8,0) e a mistura foi brevemente homogeneizada em Vortex. Acrescentaram-se 150 µL de solução de lise (NaOH 0,2 mol.L⁻¹ e SDS 1%, (m/v)) e a mistura foi homogeneizada invertendo-se o tubo lentamente até observação do aumento de sua viscosidade. Incubou-se a mistura à temperatura ambiente durante 5 minutos para ocorrer lise completa. Após a lise, adicionou-se 150 µL de Kacf (acetato de potássio 3 mol.L⁻¹ e ácido fórmico 1,8 mol.L⁻¹) e o tudo foi homogeneizado por inversão. A mistura foi incubada por 5 min em gelo e centrifugada por 5 min a 10.000 g. O sobrenadante foi coletado e, a ele 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)(v/v/v) foram adicionados. A solução foi misturada em Vortex e centrifugada por 5 minutos a 10.000 g. À fase aquosa coletada foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol e a solução foi incubada à temperatura ambiente por 25 minutos para precipitação do DNA. Centrifugou-se por 15 min a 10.000 g e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80 % (p/v) e centrifugado por 5 min a 10.000 g. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi secado a vácuo. Após secagem, o precipitado foi solubilizado em 20 µL de água MilliQ[®].

4.2.4 Eletroforese de DNA em Gel de Ágar ou Agarose

A eletroforese de DNA foi realizada de acordo com a técnica descrita em SAMBROOK et al. (1989). O gel foi preparado fundindo-se ágar 1,0 % (p/v) em tampão TBE (Tris 89 mmol.L⁻¹, ácido bórico 89 mmol.L⁻¹ e EDTA 2 mmol.L⁻¹; pH 8). Para a corrida utilizou-se o mesmo tampão. Foram adicionados 5 µL de amostras de DNA com 3 µL de FSUDS (azul de bromofenol 0,8 % (p/v); ficol 10 % (p/v); xileno cianol 0,4 % (p/v), SDS 1 % (p/v), EDTA 1,8 mmol.L⁻¹; Tris-HCl 65 mmol.L⁻¹, pH 8,0). Efetuou-se a corrida com voltagem entre 12 e 40 V, acompanhando a progressão

do corante. Após a corrida, o gel foi transferido para uma solução de brometo de etídeo a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para revelação das bandas de DNA. Incubou-se o gel por 30 min, lavando-o em água por mais 10 min para eliminação do excesso do corante. As bandas foram visualizadas em um sistema de documentação de imagens (UVP – UltraViolet Products[®]) irradiando o gel com UV no comprimento de onda de 312 nm.

4.2.5 Reações com Enzimas de Restrição

Dois sistemas foram utilizados: sistemas de 100 μL para posterior utilização do inserto liberado, ou sistemas de 20 μL para análise de restrição por eletroforese de DNA como descrito na seção anterior. Todas as reações foram feitas em Eppendorfs de 1,5 mL de capacidade. Os sistemas de 100 μL foram compostos de 73 μL de água MilliQ[®], 10 μL do tampão apropriado para a enzima, 15 μL de uma minipreparação de DNA plasmidial, 1 μL de RNase e 1 μL da enzima de escolha. Os sistemas de 20 μL foram formados pelos mesmos componentes, porém, calculando-se a quantidade para um volume final de 20 μL . As condições de reação foram modificadas de acordo com a enzima utilizada, como exposto na Tabela 7.

TABELA 7 – CONDIÇÕES REACIONAIS COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS^a

Enzima	Quantidade na Reação (U)	Temperatura de Incubação (°C)	Tempo de Incubação (h)
<i>NdeI</i>	20	37	~ 12
<i>EcoRI</i>	15	37	2-4
<i>XbaI</i>	10	37	~ 12
<i>XhoI</i>	12	37	~ 12

a - quantidades de unidade calculadas para sistemas de 100 μL .

4.2.6 Reação de Ligação de DNA

As reações de ligação foram feitas em tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidade, para volumes finais de 10 μL . O sistema continha 3,5 μL de água MilliQ[®],

2 μL do tampão de T4 ligase 5X concentrado (GIBCO™ - Invitrogen Corporation), 5 μL de inserto, 1 μL do vetor linearizado e 0,5 μL (0,5 unidades) de T4 DNA ligase (GIBCO™ - Invitrogen Corporation). O tampão de T4 ligase continha Tris-HCl 250 mmol.L^{-1} (pH 7,6), 50 mmol.L^{-1} de MgCl_2 , 5 mmol.L^{-1} de ATP, 5 mmol.L^{-1} de DTT e 25 % (m/v) de polietilenoglicol – 8000. Os tubos foram incubados aproximadamente durante 16 horas a 18 °C. Após a incubação, 1 μL da reação foi transformado em *E. coli* e plaqueado em meio LA contendo o antibiótico apropriado. Um controle negativo foi feito transformando outra alíquota da mesma bactéria com 1 μL de água MilliQ®. As colônias que cresceram no meio após incubação de 16 horas foram selecionadas para minipreparação dos seus plasmídeos e posterior análise de restrição.

4.2.7 Subclonagem do Gene *lipA* de *Burkholderia cepacia* no Vetor pET-29a

O plasmídeo pT-ompA-LipHp (Figura 7) foi tratado com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* como descrito no item 4.2.5 para um sistema de 100 μL . O plasmídeo pET-29a(+) também foi tratado com as mesmas enzimas em um sistema de 100 μL . Após a reação, os dois sistemas foram analisados por eletroforese de DNA. A ligação do plasmídeo pET-29a(+) com o inserto *ompAliphp* foi realizada como descrito no item 4.2.6. A ligação foi transformada em *E. coli* XL-1 Blue e plaqueada em LA + canamicina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As colônias que cresceram no meio foram selecionadas para purificação dos seus plasmídeos e análise de restrição com as enzimas *XbaI* e *EcoRI*. O plasmídeo resultante da ligação do inserto *liphp* ao pET29a(+) foi denominado como pMMS-1.

4.2.8 Reação de Inserção de Transposons e Seleção das Inserções

Os transposons são seqüências de DNA móveis encontradas nos genomas de procariotos e eucariotos. A inserção de transposons em uma seqüência de DNA pode ser usada para preparar estas seqüências para o sequenciamento, tendo em vista que alguns kits comerciais possuem transposons com sítios que podem ser usados para a

ligação dos oligonucleotídeos que servirão de primers para a reação de sequenciamento.

O protocolo utilizado foi o que acompanha o kit de inserção EZ::TN (TET-1), fabricado pela EPICENTRE (Madison, Wisconsin, EUA). A reação consiste de um transposon (contendo os sítios de ligação para os primers e a marca de resistência à tetraciclina), o DNA alvo e a Tn5 transposase, a enzima responsável por inserir os transposons na sequência de DNA. Esta inserção acontece de forma aleatória.

Para obter as inserções no plasmídeo pT-ompA-LipHp, as reações foram feitas com cerca de 0,2 µg de DNA, 1 µL do tampão de reação (10 vezes concentrado), 0,1 µL do transposon, 0,1 µL da Tn5 transposase e água MilliQ[®] q.s.p. 10 µL. Esta mistura foi incubada durante 2 horas a 37 °C. A reação foi parada pela adição de 1 µL de EZ::TN *Stop Solution* e aquecida por 10 min a 70 °C.

A estirpe de *E. coli* Top10 foi eletroporada com 1 µL da reação, as células foram recuperadas durante 1 h e plaqueadas em meio LA com 10 µg/mL de tetraciclina e 250 µg/mL de ampicilina.

A seleção das inserções foi feita por análise de restrição com as enzimas *XhoI* e *EcoRI*. A enzima *XhoI* não tem sítio no transposon, porém o plasmídeo pT-ompA-LipHp possui um sítio para esta enzima à montante do códon de início de transcrição do operon. Já a enzima *EcoRI* possui um sítio no começo do transposon (34 pb) e no final do operon *lipHp*. Assim, um padrão de três bandas pode ser esperado: a) um fragmento formado pela restrição *XhoI/EcoRI*; b) um fragmento liberado pela restrição *EcoRI/EcoRI* e c) o restante do vetor. Além disso, como se conhecia exatamente os sítios de restrição para as enzimas, também foi possível estimar o ponto de inserção dos transposons pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição.

4.2.9 Sequenciamento de DNA

4.2.9.1 Preparação da Amostra de DNA

Este protocolo para sequenciamento do DNA dupla fita foi adaptado do boletim técnico da Applied Biosystems (Lincoln, CA, EUA). Uma amostra de 1,5 mL de

cultura saturada, contendo células com o plasmídeo a ser seqüenciado, foi centrifugada a 10.000 g durante 1 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado tratado com 200 µL de GET (glucose 50 mmol.L⁻¹, EDTA 10 mmol.L⁻¹, Tris-HCl 25 mmol.L⁻¹; pH 8). A mistura foi brevemente agitada em Vortex. Adicionaram-se 300 µL de solução de lise (NaOH 0,2 mol.L⁻¹; SDS 1% (m/v)). Homogeneizou-se a solução invertendo-se o tubo lentamente até a visualização da lise celular, incubando-se depois por 5 min em banho de gelo. Adicionaram-se 300 µL de acetato de potássio (ou sódio) 3,0 mol.L⁻¹; pH 4,8; homogeneizando suavemente. Incubou-se por 5 min em banho de gelo. Centrifugou-se por 10 min a 10.000 g transferindo o sobrenadante para um tubo novo. Adicionou-se RNase A para concentração final de 20 µg.mL⁻¹ e incubou-se a 37 °C durante 20 min. Duas extrações com 400 µL de clorofórmio foram realizadas. Misturaram-se as fases, centrifugando-as por 1 min a 10.000 g, removendo a fase aquosa para tubos novos. Após extração, o DNA foi precipitado com isopropanol e incubado em gelo por 10 min. Centrifugou-se por 15 min a 10.000 g descartando o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70 % (v/v) e precipitado por centrifugação por 5 min a 10.000 g. O precipitado foi seco a vácuo e solubilizado em 33,6 µL de água MilliQ[®]. Adicionaram-se 6,4 µL de NaCl 5 mol.L⁻¹ e 40 µL de polietileno-glicol 8000 a 13 % (m/v). Misturou-se bem e incubou-se em banho de gelo por 60 min. Centrifugou-se a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C descartando o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70 % (v/v), centrifugando a amostra por 5 min a 10.000 g. O precipitado foi seco a vácuo e solubilizado em 20 µL de água MilliQ[®] estéril. Para se estimar a concentração do DNA purificado, foi feita uma análise visual através de eletroforese em gel de agarose em paralelo com um padrão de concentração (50 ng.µL⁻¹) do plasmídeo pGEM[®]-T da Promega Co. (Madison, WI, EUA).

4.2.9.2 Reação de Sequenciamento

O seqüenciamento de DNA foi realizado baseando-se no método descrito por SANGER *et al.* (1977), utilizando didesoxinucleotídeos fluorescentes, separação por

eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção do fluoróforo após excitação com *laser* em seqüenciador automático ABI Prism 377 DNA Sequencer, da Applied Biosystems (EUA) (KARGER *et al.*, 1991). Para incorporação dos didesoxinucleotídeos, cerca de 300 ng de DNA foram transferidos para um sistema de reação contendo 10 pmol de oligonucleotídeos sintéticos. Estes oligonucleotídeos foram construídos em intervalos para que fossem obtidos fragmentos de aproximadamente 400 pares de base, com as extremidades sobrepostas. Ao sistema adicionou-se 2 μL do reagente *DYEnamic ET terminator reagent premix*, da Amersham Biosciences (Inglaterra), para um sistema de volume total igual a 10 μL . A reação de amplificação foi feita em termociclador utilizando os seguintes ciclos: (95 °C, 2 min) x1; (94 °C, 20 s; 60 °C, 1 min) x30. O produto da reação foi precipitado adicionando-se 30 μL de isopropanol e 10 μL de água MilliQ[®] estéril deixando a solução em repouso por 30 min. A solução foi centrifugada por 30 min a 10.000 g desprezando o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80 % (v/v), centrifugando a 10.000 g por 5 min. O precipitado resultante, após secagem a vácuo, foi ressuscitado em 3 μL de tampão de aplicação (formamida desionizada : solução aquosa de EDTA 25 mmol.L⁻¹; pH 8 contendo Blue Dextran 50 mg.mL⁻¹) (5:1), desnaturado a 90 °C por 2 min, transferido para um banho de gelo até a aplicação no gel. A corrida foi efetuada em gel de poliacrilamida 5 % (m/v), a cerca de 80 V.cm⁻¹.

4.2.9.3 Edição e Análise das Seqüências

O alinhamento das seqüências obtidas foi feito pelo *software* BioEdit utilizando os recursos CAP ('*Conting Assembly Program*') para obtenção da seqüência contígua do gene da lipase de *B. cepacia* (HUANG, 1992) e CLUSTAL W para alinhamento da seqüência obtida com seqüências relacionadas disponíveis em bancos de dados públicos (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

4.2.10 Mutagênese da Lipase de *B. cepacia*

Para obter mutantes da lipase de *B. cepacia*, o plasmídeo pT-ompA-LipHp foi transformado na estirpe mutante de *E. coli* XL-1 Red e replicado por várias gerações. A *E. coli* XL-1 Red é uma linhagem deficiente em três importantes genes envolvidos no sistema de reparo do DNA, conforme genótipo apresentado na Tabela 4: o *mutS* (reparo de erro no pareamento de bases), *mutD* (deficiente em atividade exonucleásica 3'-5' da DNA polimerase III) e *mutT* (incapaz de hidrolisar o 8-oxodGTP). Estas mutações fazem com que a taxa de mutação que ocorre naturalmente na replicação do DNA aumente significativamente quando o DNA é replicado pela *E. coli* XL-1 Red. A taxa de mutação aleatória neste triplo mutante foi medida sendo aproximadamente 5.000 vezes maior que a do tipo selvagem, segundo a empresa fabricante Stratagene - EUA.

Uma alíquota de 30 µL de *E. coli* XL-1 Red eletrocompetente foi transformada com 1 µL de pT-ompALip-Hp. As células foram recuperadas em meio SOC (37 °C, 1 h, 160 rpm) e 100 µL da mistura foram plaqueados em LA com ampicilina. Após 24 horas de crescimento a 30 °C, uma colônia foi transferida para 10 mL de LB com ampicilina e cultivado durante 16 horas (30 °C, 160 rpm). Após 12 horas, 200 µL do meio saturado com células foi inoculado em meio LB com ampicilina, e crescido durante mais 12 horas. Desta maneira foram feitas nove subculturas, sendo que a cada 12 horas, 2 mL de meio foram coletados para purificação dos plasmídeos. Os plasmídeos obtidos da última subcultura foram transformados em *E. coli* XL-1 Blue para manutenção dos mesmos e início do *screening* dos possíveis mutantes.

Durante as nove subculturas, foram coletadas amostras a cada 12 horas também para a contagem do número de colônias. As gerações foram contadas através da técnica de Miles e Misra (ou técnica da microgota), gentilmente repassada pelo Doutor Humberto Ramos (RAMOS, 2002). Placas com meio LB sólido foram preparadas e divididas em quatro quadrantes. Em cada quadrante foram pipetadas separadamente 4 gotas de 10 µL de uma determinada diluição da cultura. Após 16 horas de incubação a 30 °C, as colônias puderam ser contadas com o auxílio de uma lupa. Os cálculos para correção volumétrica e da diluição foram feitos e o resultado final foi expresso em

unidades formadoras de colônia (UFC).mL⁻¹ de cultura. Os valores de UFC e do número de gerações foram calculados de acordo com a equação abaixo:

$$\text{UFC/mL} = (\text{número de colônias contadas} \times \text{fator de diluição}) / \text{volume plaqueado em mL}$$
$$\text{Número de Gerações} = [\log(\text{número de bactérias no final da cultura}) - \log(\text{número de bactérias no início da cultura})] / 0.3001$$

4.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS E CONDIÇÕES DE *SCREENING*

4.3.1 Indução da Expressão da Lipase de *B. cepacia* em *E. coli*

Após aproximadamente 16 horas de crescimento, as placas (tipo ELISA ou *Deep Well*) contendo os transformantes foram transferidas para uma estufa microbiológica a 42 °C. As placas tipo ELISA foram incubadas nesta temperatura durante 40 min sem agitação. Após este período, as placas foram transferidas para um *shaker*, a 37 °C, onde foram incubadas por mais 3 horas a 120 rpm. Quando utilizadas as placas tipo *deep well*, estas foram colocadas em banho de água por 20 min a 42 °C, sendo incubadas a 37 °C por 3 h a 120 rpm, após este choque térmico.

Quando os experimentos foram feitos com frascos de vidro, após as culturas atingirem a D.O.₆₀₀ de 0,6, as mesmas foram transferidas para um banho de água a 42 °C, durante 15 min e cultivadas por mais 3 h a 37 °C.

4.3.2 Indução da Expressão da Lipase de *B. cepacia* em *E. coli* BL21(DE3) pLysS

Para desenvolver o pré-inóculo, uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformada com o plasmídeo pMMS-1 foi transferida para 3 mL de meio LB contendo 50 µg de canamicina. Após aproximadamente 16 horas de cultivo, 10 mL de meio LB com canamicina (50 µg) foram inoculados na razão 1:50 com o pré-inóculo. Atingida a D.O.₆₀₀ de 0,4, o indutor (IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) foi

adicionado para uma concentração final de 1 mmol.L^{-1} , a partir de um estoque a 1 mol.L^{-1} . Este foi assumido como o tempo zero de indução. O crescimento foi acompanhado por mais 4 horas, a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 160 rpm de agitação. Alternativamente, lactose foi utilizada como indutora da expressão. Neste caso, lactose de um estoque a $10 \text{ } \%$ (m/v) foi adicionada para concentração final de $0,5 \text{ } \%$ (m/v). Quando foi empregado o plasmídeo pMMS-1 para expressão da lipase em microplacas, todas as concentrações acima foram mantidas, somente adaptando-as para o volume da cultura ($200 \text{ } \mu\text{L}$).

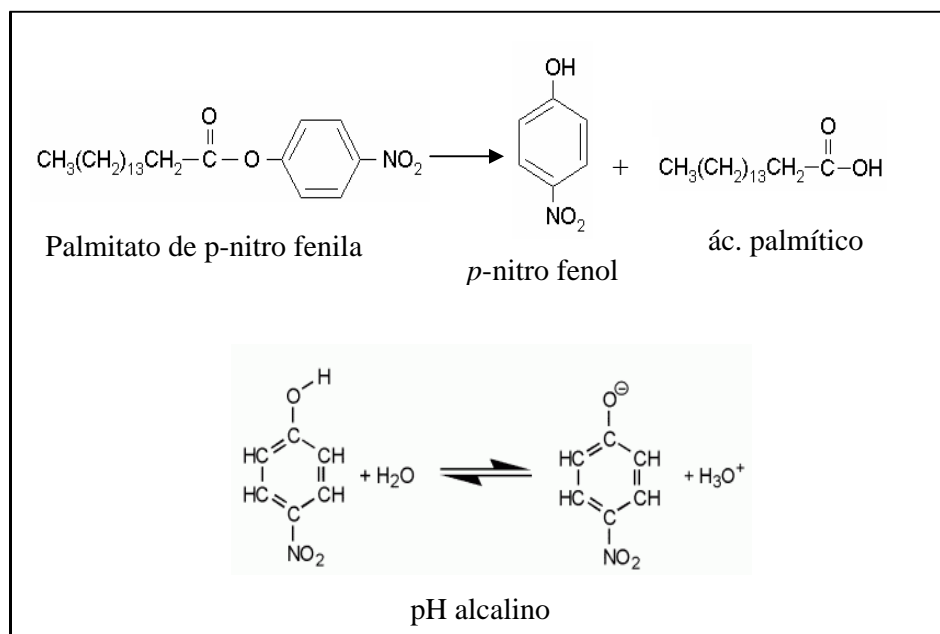
4.3.3 Determinação de Atividade Lipolítica pela Hidrólise do Palmitato de *p*-Nitrofenila

A atividade lipolítica foi determinada em microplacas, segundo a técnica previamente desenvolvida por Nadia Krieger e Nathalie Caillol no laboratório de Biocatálise e Química Fina da Universidade de la Méditerranée em Marselha – França.

Utilizou-se o pNPP (palmitato de *p*-nitrofenila) como substrato. O pNPP é um éster formado pelo *p*-nitro fenol e pelo ácido palmítico, um ácido graxo saturado de 16 átomos de carbono. Este é um substrato tradicional para a determinação de atividade lipolítica, pois a hidrólise do éster libera o *p*-nitrofenol (pNP) que possui alta absorção em 415 nm , em pH alcalino. O aparecimento do produto amarelo no meio reacional ocorre através da formação de um íon fenolato (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999), como mostrado na Figura 9.

Em cada poço foram adicionados $140 \text{ } \mu\text{L}$ de uma mistura 1:10 de pNPP (15 mmol.L^{-1} em isopropanol) e tampão de reação (Tris-HCl 66 mM , pH 8,0); Triton X-100 $0,6 \text{ } \%$ (m/v); goma arábica $0,1 \text{ } \%$ (m/v)). A mistura foi feita gota a gota com agitação em Vortex para evitar precipitação do pNPP. A cada poço foram adicionados $70 \text{ } \mu\text{L}$ de meio saturado com células induzidas.

FIGURA 9 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO pNPP E A FORMAÇÃO DO CROMOGÊNICO FENOLATO



Os seguintes controles são feitos em cada ensaio: controle do substrato (140 μL da mistura 1:10, pNPP : tampão de reação + 70 μL de Tris-Cl 100 mmol.L^{-1} , pH 8); controle da cultura (140 μL do tampão de reação + 70 μL de cultura) e controle do tampão de reação (140 μL do tampão de reação + 70 μL de Tris-Cl 100 mM, pH 8). Todas as absorvâncias foram registradas em 415 nm em leitor de microplacas marca BIO-TEK (Modelo ELX800).

A atividade foi determinada em modo cinético, com leituras ao longo do tempo, até 30 minutos. A atividade é calculada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade Volumétrica} = [(\text{DO}_{415} \text{ específica}/\text{Tempo})/\varepsilon l] * 210.10^{-6} * 1.10^9$$

onde:

$$\text{DO}_{\text{específica}415} = [\text{DO}_{\text{ensaio}415} - \text{DO}_{\text{células}415}] - [\text{DO}_{\text{substrato}415} - \text{DO}_{\text{tampão}415}]$$

tempo = tempo de reação (min).

ε = absortividade molar para o pNP (p-nitro fenol) x o comprimento óptico (mol.L^{-1}).

l = comprimento óptico.

O valor 210×10^{-6} representa o volume final no poço, (corrigido para L), e 10^9 é a conversão de mols para nmols.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que forma 1 μmol do produto por minuto. Portanto, uma mU seria a quantidade de enzima capaz de formar 1 nmol de *p*-nitro fenol por minuto.

4.3.4 Determinação da Absortividade Molar (ϵL) para o *p*-Nitrofenol (pNP) em Microplacas

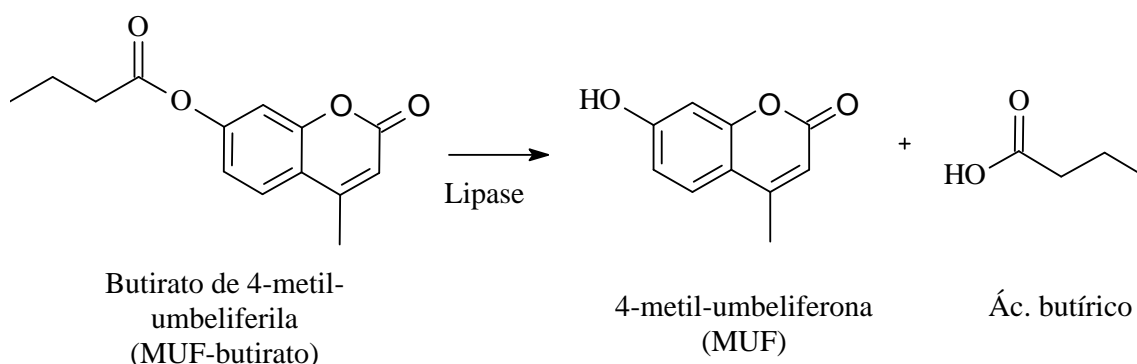
A partir de uma solução estoque de pNP (100 mmol.L^{-1} em isopropanol), foram preparados padrões: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mmol.L^{-1} . Estes padrões foram diluídos na proporção 1:10 com o tampão de reação citado no item anterior, para um volume final de 1 mL. Das amostras, 140 μL foram adicionadas aos poços da microplaca e completados para 210 μL com 70 μL de tampão Tris-HCl 100 mmol.L^{-1} , pH 8. As absorvâncias foram lidas a 415 nm em leitor de microplaca marca BIO-TEK (Modelo ELX800). O branco foi feito com isopropanol.

4.3.5 *Screening* de Transformantes com Atividade Lipolítica em Microplacas

Como alternativa ao substrato pNPP, foi utilizado um substrato fluorogênico, o butirato de 4-metil-umbeliferila, como descrito por PRIM et al. (2003). O esquema da reação está exposto na Figura 10. Nesta reação, a enzima ataca o substrato liberando ácido butírico e o agente fluorogênico metil-umbeliferona. Quando irradiado a 365 nm, este composto emite fluorescência, que pode ser quantificada, sendo assim um indicativo da atividade enzimática. Este substrato foi solubilizado em monometiléter etileno glicol na concentração de 25 mmol.L^{-1} . Anteriormente à reação, o substrato foi diluído em tampão Tris-HCl (50 mmol.L^{-1} , pH 8) para a concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Em cada poço foi adicionado 30 μL do meio contendo células do transformante a ser analisado mais 20 μL de tampão Tris-HCl (50 mmol.L^{-1} , pH 8) e 150 μL da solução do substrato. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período, foi irradiada com luz UV (365 nm) para observação dos poços

fluorescentes. A quantificação de fluorescência foi feita através de um sistema de documentação de imagens (UVP – UltraViolet Products[®]) usando a opção *dot-blots*. Com este artifício, a partir da imagem capturada, cada poço da placa pôde ser quantificado em termos de unidades arbitrárias de fluorescência.

FIGURA 10 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO MUF-BUTIRATO E A FORMAÇÃO DO AGENTE FLUOROGÊNICO METIL-UMBELIFERONA



4.3.6 *Screening* de Colônias com Atividade Lipolítica Utilizando MUF-Butirato

As colônias de *E. coli* XL-1 Blue transformadas com o plasmídeo pT-ompA-LipHp foram crescidas a 37 °C, por 16 horas em meio LA. Após o crescimento, as colônias foram transferidas para uma folha de papel filtro analítico (Whatman número 4). Esta folha de papel filtro foi transferida para uma placa de Petri contendo meio LA fresco, com as colônias voltadas para cima. A placa foi incubada a 42 °C durante 2 horas para assegurar indução da enzima. Após a indução, a folha contendo as colônias foi retirada e colocada sob uma outra folha umedecida com solução de MUF-butirato 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. As folhas foram mantidas em contato durante 5 minutos, e a folha contendo o substrato foi revelada irradiando UV a 365 nm.

4.3.7 Ensaio de Termoestabilidade em Microplacas

As culturas foram crescidas e induzidas como descrito no item 4.3.1. Após indução, uma alíquota de 70 μL , de cada poço, foi ensaiada quanto a sua atividade lipolítica como descrito no item 4.3.2. Esta atividade foi definida como atividade inicial. A alíquota restante foi transferida para placas de polipropileno (Greiner Bio-One[®]) e incubadas por 2 horas a 60 °C. Após a incubação, a atividade remanescente foi ensaiada com 70 μL de amostra. As atividades residuais foram determinadas em relação à atividade inicial como 100 %.

4.3.8 Ensaio de Resistência a Solventes Orgânicos Miscíveis em Água

As culturas de *E. coli* foram crescidas e induzidas como descrito no item 4.3.1. Após indução, uma alíquota de 40 μL da cultura foi diluída com 160 μL do respectivo solvente orgânico, em placas de polipropileno, de 96 poços. Imediatamente após a mistura, uma alíquota de 70 μL foi retirada para ensaio de atividade lipolítica, como descrito no item 4.3.3. Esta atividade foi determinada como a atividade inicial. A mistura de suspensão bacteriana e solvente foi incubada a 30 °C, durante 1 h, a 160 rpm. Após a incubação, a atividade lipolítica foi novamente determinada como mencionado acima. A atividade resultante correspondeu à atividade final. A atividade residual foi expressa como uma porcentagem, em relação à atividade lipolítica obtida após a incubação em tampão Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} na ausência de solvente orgânico. Os controles de substrato e do tampão foram feitos preparando previamente uma solução 80 % do solvente testado com tampão Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} ; pH 8,0 e adicionando 70 μL à emulsão e ao tampão respectivamente.

4.3.9 Confirmação dos Candidatos a Resistência a DMF 80 %

Os candidatos foram inoculados em 3 mL e induzidos como descrito no item 4.3.1. Após a indução, 100 μL da cultura foram transferidos para um tubo de Eppendorf contendo 100 μL de água MilliQ[®] e 800 μL de DMF. A mistura foi agitada

em Vortex brevemente e 50 μL foram coletados para determinação da atividade no tempo zero, conforme descrito no item 4.3.5. O restante da mistura foi incubado a 30 $^{\circ}\text{C}$, com agitação de 120 rpm. Amostras de 50 μL foram coletadas e ensaiadas em tempos determinados para se estimar o valor de atividade residual ao longo da incubação. A atividade residual foi calculada em relação ao valor inicial de atividade como sendo 100 %.

4.4 ELETROFORESE E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

4.4.1 Eletroforese Desnaturante de Proteínas (SDS-PAGE)

A eletroforese desnaturante de proteínas foi feita em gel de poliacrilamida segundo LAEMMLI (1970), usando o gel de empilhamento com 5 % de poliacrilamida (m/v) e o gel de separação com 12 % de poliacrilamida (p/v). As proteínas foram coradas com azul brilhante de Coomassie R-250 0,05 % (m/v). Para estimativa da massa molecular, foi utilizado um marcador de baixa massa molecular (94, 67, 43 e 30 kDa).

4.4.2 Determinação da Concentração de Proteínas pelo Método de Bradford

A concentração de proteínas foi determinada pelo reativo de Bradford como descrito no protocolo gentilmente cedido pelo doutorando Stefan Schwab, do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio, do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (SCHWAB, 2002). Volumes entre 30-125 μL de cultura saturada foram transferidos para um poço de uma placa de 96 poços de polipropileno, contendo 50 μL de NaOH (0,4 mol/L), 25 μL de H_2O destilada e meio LB para um total de 200 μL . A placa foi incubada durante 10 minutos. Após este período, 36,5 μL do lisado foi transferido para uma microplaca e misturado com 163,5 μL do reativo de Bradford (BRADFORD, 1976). O branco foi feito com os mesmos componentes, mas substituiu-se a cultura saturada por meio LB. As absorvâncias

foram registradas em 595 nm em leitor de microplacas. As atividades específicas foram calculadas a partir da determinação de proteínas feita por esta técnica.

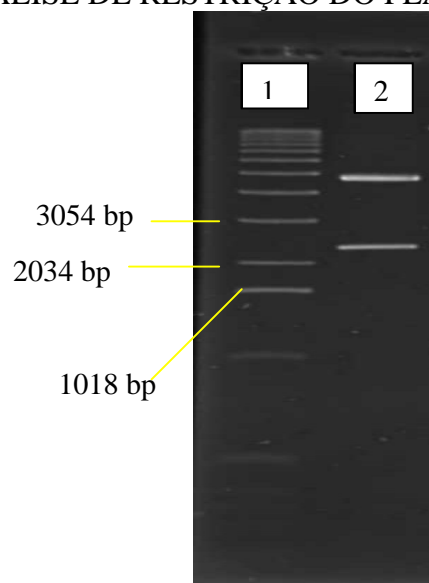
5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pT-ompA-LipHp

Como mostrado na Figura 7 da seção Material e Métodos, o plasmídeo pT-ompALip-Hp contém um inserto a jusante do promotor λP_{RL} , inserido entre dois sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*. Este inserto é composto pela seqüência sinal *ompA* de *E. coli* fusionada ao operon *liphp* de *B. cepacia*, correspondendo a 2067 pares de base. Após o tratamento do plasmídeo com as enzimas de restrição, foi obtido um fragmento de aproximadamente 2 kbp e um segundo fragmento de 5 kbp, correspondente ao plasmídeo pCYTEXP1 (BELEV; SINGH; McCARTHY, 1991).

Na Figura 11, observa-se o padrão eletroforético da restrição comparado a um marcador de massa molecular de DNA.

FIGURA 11 – ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pT-ompA-LipHp



Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TBE do plasmídeo pT-ompA-Lip-Hp digerido com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*. Linha 1: marcador de massa molecular (1 kb ladder), linha 2: plasmídeo digerido. O gel foi corado com brometo de etídeo como descrito em Material e Métodos.

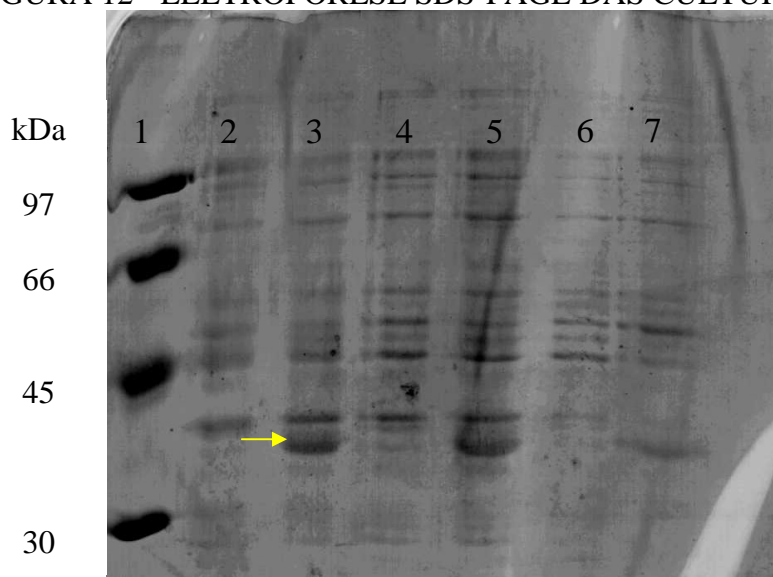
Com a análise de restrição do plasmídeo ficou demonstrado que o inserto flanqueado pelos sítios *NdeI* e *EcoRI* correspondia ao operon *lipHp*.

Para total certificação deste resultado, a superexpressão da enzima e os ensaios de atividade enzimática foram executados na seqüência do trabalho.

5.2 EXPRESSÃO DA LIPASE DE *B. cepacia* POR *E. coli*

Primeiramente, foi avaliada a expressão em três estirpes de *E. coli* (XL-1 Blue, Top10 e DH10B). As culturas foram crescidas em condições repressoras (30 °C) e induzidas por choque térmico a 42 °C (15 min), mais um cultivo de 3 h a 37 °C. Após este tratamento, as culturas foram sonicadas para obtenção da fração solúvel. As frações obtidas para cada estirpe foram analisadas por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) de proteínas, como mostrado na Figura 12.

FIGURA 12 - ELETROFORESE SDS-PAGE DAS CULTURAS INDUZIDAS



Legenda: Eletroforese de extrato celular em gel de poliacrilamida 12 % (m/v) na presença de SDS. Linha 1, marcador de massa molecular; linhas 2 e 3: DH10B, 4 e 5: Top10 e 6 e 7: XL-1 Blue. As linhas 2, 4 e 6 apresentam extratos celulares solúveis das estirpes não transformadas com pT-ompA-Lip-Hp. As linhas 3, 5 e 7 apresentam extratos celulares solúveis das estirpes transformadas com pT-ompA-Lip-Hp e induzidas por choque térmico. A seta em amarelo destaca a presença da banda da lipase superexpressa. Quantidade de proteínas por poço foi de 50 µg de proteína total conforme determinado pelo método de Bradford.

Como esperado, observou-se após a indução o surgimento de uma banda de aproximadamente 33 kDa correspondente a massa molecular da lipase de *B. cepacia* (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1999). Além disso, as estirpes DH10B e XL-1 Blue mostraram maior expressão da enzima comparando a intensidade da banda obtida com a estirpe Top10.

A proteína auxiliadora (Hp ou Lif *lipase foldase*) expressa juntamente com a lipase possui aproximadamente 37,4 kDa, calculada a partir de sua seqüência de 344 aminoácidos (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1999). No entanto, esta proteína não foi observada na fração solúvel das culturas induzidas, provavelmente, por manter-se ancorada a membrana plasmática interna por intermédio de um domínio N-terminal hidrofóbico (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1999) e (ROSENAU; JAEGER, 2000).

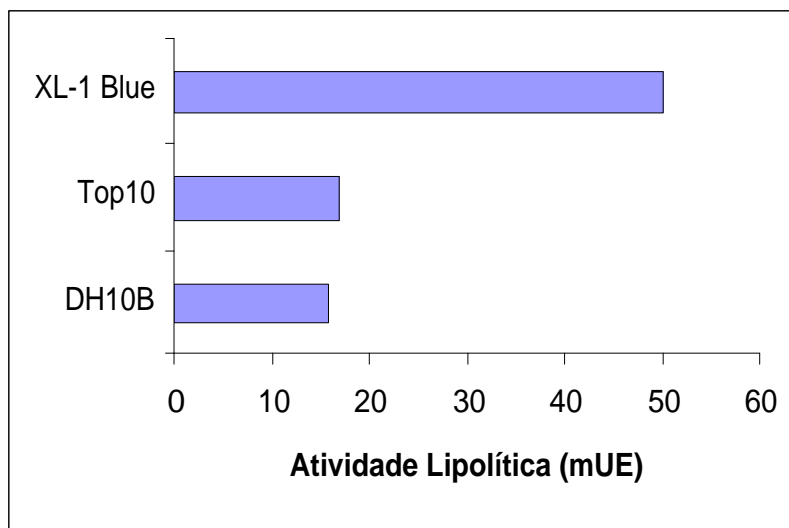
Apesar da forte evidência da expressão da lipase por *E. coli* a determinação da atividade lipolítica foi necessária para demonstrar que a enzima expressa estava na sua conformação nativa.

5.3 PERFIL DE ATIVIDADE DA LIPASE DE *B. cepacia* EXPRESSA POR *E. coli*

As culturas das três estirpes de *E. coli* foram induzidas como descrito no ítem 4.3.1 para cultivos feitos em frascos de vidro de 50 mL. Após a indução foi determinada a atividade lipolítica de cada cultura, em placas tipo ELISA, utilizando o sobrenadante com células, rendendo o perfil de atividade apresentado na Figura 13.

A estirpe *E. coli* XL-1 Blue apresentou a maior atividade lipolítica após a indução, sendo cerca de três vezes maior do que a atividade obtida com as estirpes *E. coli* Top10 e DH10B. Além disso, os resultados de eficiência de transformação mostrados na Tabela 8 mostraram que a estirpe *E. coli* XL-1 Blue, além de apresentar a maior atividade, também mostrou a maior eficiência de transformação do plasmídeo pGEM (Amp^R), sendo igual a $1,0 \times 10^{10}$ transformantes por μg de DNA plasmidial. Com base nestes resultados, esta estirpe foi selecionada para transformação, expressão da lipase selvagem e análise da biblioteca de mutantes geradas no decorrer do trabalho.

FIGURA 13 - ATIVIDADE LIPOLÍTICA OBTIDA COM AS ESTIRPES XL-1 BLUE, TOP10 E DH10B, APÓS INDUÇÃO A 42 °C



Legenda: o ensaio de atividade foi realizado em microplacas como descrito no item 4.3.3, usando o palmitato de *p*-nitrofenila como substrato.

TABELA 8 - EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO DO PLASMÍDEO pGEM EM TRÊS ESTIRPES DE *E. coli*

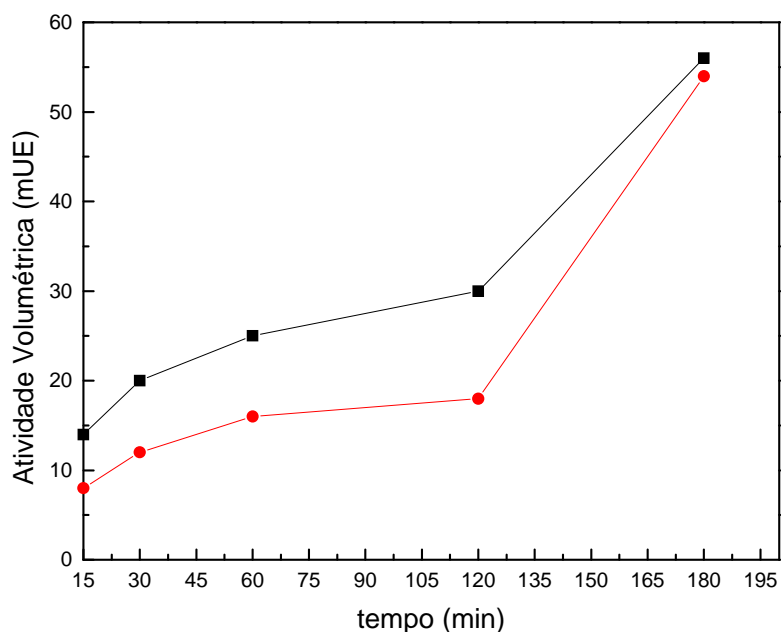
Estirpe	Eficiência (Transformantes/ μ g DNA)
XL-1 Blue	1×10^{10}
Top10	1×10^7
DH10B	1×10^8

5.4 DEFINIÇÃO DO MODO DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA LIPASE DE *B. cepacia* EM *E. coli* XL-1 BLUE

Dados da literatura sugerem que a indução máxima, em sistemas controlados pelo promotor λP_{RL} , ocorre a 42 °C (REMAUT; STANSSENS; FIERS, 1979). No entanto, no início da parte experimental desta dissertação observou-se que, mesmo incubando a cultura a 37 °C, era possível detectar atividade lipolítica, porém, em um nível mais baixo do que quando a cultura era induzida por choque a 42 °C. Com isto, imaginava-se que, incubando a cultura a 42 °C, poderia ser obtida uma maior atividade enzimática. Porém, sabe-se que a exposição de culturas de *E. coli* a temperaturas de 45 °C pode desencadear processos de agregação de proteínas termolábeis, podendo levar

a uma perda de rendimento na expressão (MOGK et al., 1999). Além disso, outros resultados da literatura mostram que algumas proteases do tipo *lon* podem ser expressas quando a cultura é exposta a temperaturas de 42 °C (PHILIPS; VAN BOGELEN; NEIDHARDT, 1984). Associando as idéias de obter um bom nível de expressão, mas também mantendo uma boa situação fisiológica para a bactéria, testou-se um modo alternativo de indução. Nesse modo, a bactéria é cultivada normalmente a 37 °C, quando atinge a D.O.₆₀₀ de 0,6, é transferida para um banho de água a 42 °C e incubada durante 15 min. Nesta etapa, o repressor que se liga ao sítio para a RNA polimerase é desnaturado. Após a desnaturação, a cultura retorna a ser cultivada a 37 °C, assim assegurando boa parte da desnaturação do repressor sem comprometer o estado fisiológico da bactéria.

FIGURA 14 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* EM *Escherichia coli* XL-1 BLUE



Legenda: (■) – atividade de hidrólise do pNPP da cultura induzida somente a 42 °C, (●) – atividade de hidrólise do pNPP de culturas induzidas pelo modo de indução alternativo como descrito acima.

A Figura 14 mostra os diferentes perfis de atividade obtidos para cada modo de indução comparado quando foi dado o choque a 42 °C apenas. Após o choque térmico, alíquotas do meio com células foram retiradas e analisadas como descrito no item 4.3.3.

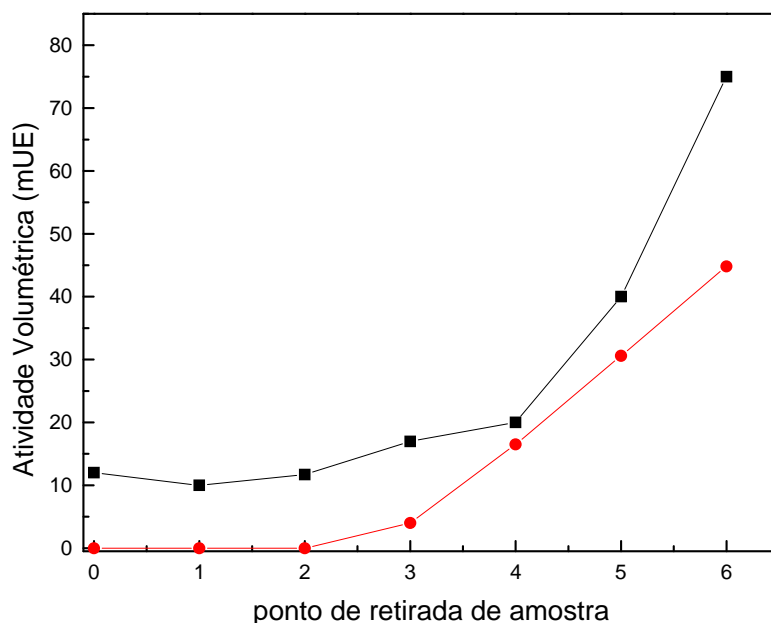
Os resultados mostraram que a manutenção da cultura a 42 °C após o choque térmico não causou um aumento significativo da atividade, comparada com a atividade final da cultura que retornou a 37 °C. Quando a cultura foi incubada a 42 e depois retornou a 37 °C, a atividade final foi igual a 54,4 mUE, enquanto que mantendo-a a 42 °C, a atividade final alcançada foi de 56 mUE.

Como conclusão deste experimento, adotou-se o modo de indução alternativo para o restante do trabalho.

5.4.1 Efeito da Temperatura Inicial de Cultivo

O sistema de expressão utilizado neste trabalho é um sistema heterólogo, ou seja, que expressa a proteína do microrganismo original em outro microrganismo que não o de origem. Algumas vezes, a proteína superexpressa pode não ser tolerada pelo microrganismo receptor, o que em situações extremas poderia levar a uma drástica redução no crescimento. Portanto, fez-se necessário avaliar se a expressão inicial da lipase interferiria no crescimento de *E. coli*. Para isto, dois cultivos foram feitos paralelamente a 30 e 37 °C, com posterior choque térmico, e ambas culturas foram avaliadas quanto a suas atividades lipolíticas ao longo do tempo. Crescendo a bactéria a 30 °C, nenhuma expressão da lipase foi observada, enquanto que a 37 °C foi possível detectar atividade lipolítica já no tempo zero, como mostra a Figura 15.

FIGURA 15 - EFEITO DA TEMPERATURA INICIAL DO CULTIVO NA EXPRESSÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* POR *Escherichia. coli* XL1 BLUE



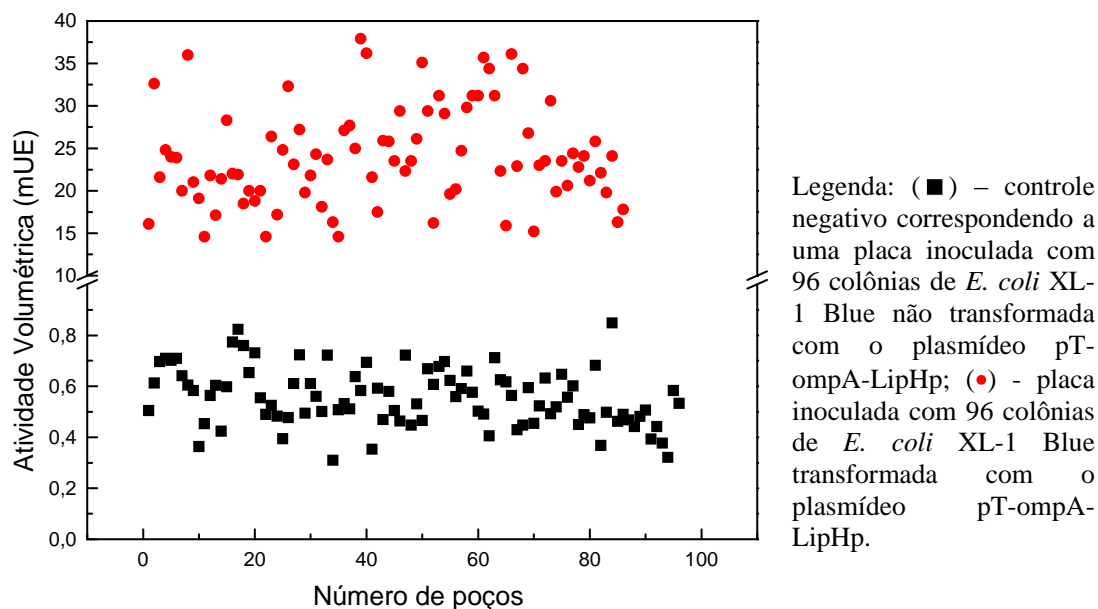
Ponto 0 – amostra coletada após inóculo, ponto 1 – amostra coletada quando a cultura atingiu densidade óptica igual a 0,6 a 600 nm, ponto 2 – amostra coletada após choque térmico de 15 min a 42 °C; pontos 3 a 6 – amostras coletadas a cada hora após o choque térmico; de 1 h até 4 h. (■) – cultivo a 37 °C; (●) – cultivo a 30 °C.

Os valores de atividade já no início do cultivo podem ter sido detectados pelo remanescente de enzima vindo do pré-inóculo. Anterior ao choque a 42 °C, mesmo para o cultivo a 37 °C, baixa atividade foi determinada. No caso do cultivo a 30 °C, apenas após o choque a 42 °C foi detectada atividade lipolítica. Com estes resultados, foi possível determinar que o nível de expressão inicial alcançado a 37 °C não interferiu no crescimento da bactéria, e aumentou a atividade lipolítica final. Assim, determinou-se que o crescimento a 37 °C, seguido de choque a 42 °C (15 min) e 3 h de cultivo a 37 °C, foi a melhor condição para indução da expressão da enzima. Essa condição foi selecionada para a continuação do trabalho.

5.5 EXPRESSÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* POR *Escherichia coli* XL-1 BLUE EM SISTEMAS DE 96 POÇOS (*DEEP WELL*)

Como neste trabalho, buscava-se uma estratégia para análise de uma biblioteca de mutantes foi necessário otimizar o sistema de expressão da lipase em placas de 96 poços. Primeiramente, avaliou-se a expressão da enzima selvagem em placas do tipo *deep well*. Estas placas possuem capacidade de até 2,2 mL por poço. As placas *deep well* podem ser utilizadas como alternativa para as placas tipo ELISA (300 μ L por poço) em algumas situações. Quando a cultura precisa entrar em contato com um banho de água para indução, as placas *deep well* seriam a melhor alternativa, pois permitem que a placa seja imersa. Sendo assim, a nossa primeira tentativa de expressão da enzima em um sistema de 96 poços foi feita com placas *deep well*, que permitiram um choque térmico a 42 °C em banho de água. A Figura 16 mostra os resultados de atividade lipolítica obtidos quando a bactéria foi crescida e induzida em placas *deep well*.

FIGURA 16 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* POR *Escherichia coli* XL-1 BLUE EM PLACAS *DEEP WELL*

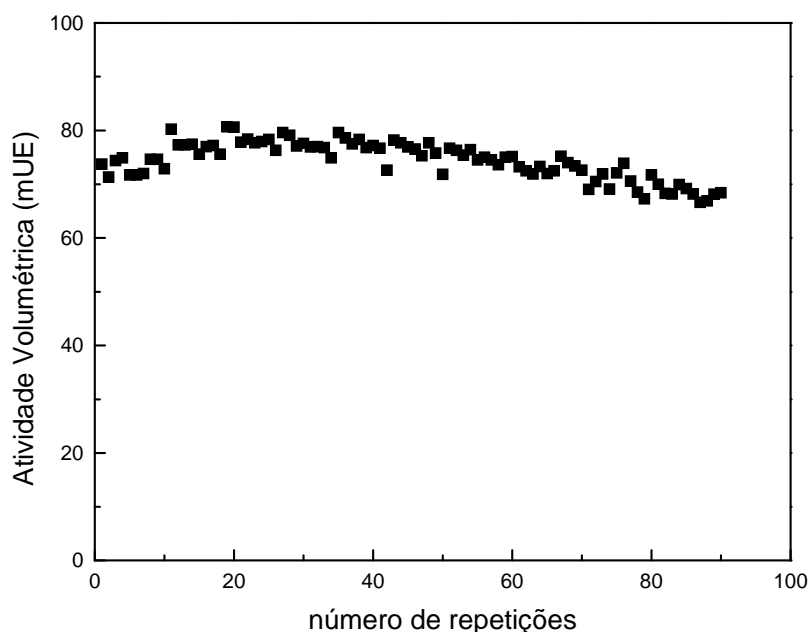


Observando os resultados para o controle negativo, percebe-se que a média dos valores obtidos, tanto para o controle positivo quanto para a placa que expressava a enzima, apresentaram uma dispersão de cerca de 25 %. A média para o controle negativo foi de 0,55 mUE, com um desvio padrão de $\pm 0,11$ mUE, enquanto que para o controle positivo, foi de 24 mUE com desvio padrão de $\pm 5,77$ mUE. No entanto fez-se necessário determinar se esta era uma variação do sistema de expressão ou do ensaio de atividade propriamente dito. Além disso, os valores médios de atividades encontrados, quando se fez a expressão em placas *deep well*, correspondem à aproximadamente metade dos ensaios anteriores, realizados com placas tipo ELISA.

5.6 VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ENSAIO ENZIMÁTICO EM SISTEMAS DE 96 POÇOS

Para avaliar a variação do ensaio, foi induzida uma cultura, crescida em frasco de vidro como descrito no item 4.3.1. Determinou-se a atividade da cultura, como descrito no item 4.3.3, com 88 repetições, usando 88 poços de uma microplaca. Os oito poços restantes foram utilizados para os controles de substratos e tampão. A média de atividade mostrou-se pouco dispersa, sendo igual a $74,4 \text{ mUE} \pm 3,5 \text{ mUE}$, como mostrado na Figura 17. A variação correspondeu a 4,7 % do valor da média, indicando que o método utilizado para determinação de atividade, não é provavelmente, a fonte de variação que foi observada previamente. Além disso, ficou claro que a expressão da lipase é diminuída quando se fez a cultura em placas *deep well*, pois aqui a atividade média é de aproximadamente 3 vezes a atividade obtida anteriormente.

FIGURA 17 - VARIAÇÃO DE ATIVIDADE OBTIDA NO ENSAIO EM PLACAS DE 96 POÇOS PARTINDO-SE DE UMA CULTURA PREPARADA EXTERNAMENTE EM ERLLENMEYER



Legenda: atividade de hidrólise do pNPP determinada em placas tipo Elisa.

5.7. EXPRESSÃO DA LIPASE DE *B. cepacia* POR *E. coli* EM SISTEMAS DE 96 POÇOS – PLACAS TIPO ELISA

Para verificar a possibilidade de expressar a lipase, sem uma grande variação nos resultados de atividade, realizou-se um experimento, observando os melhores tempos de indução (Figuras 18 e 19).

Todos os cultivos foram realizados em microplacas a 30 °C e 160 rpm de agitação. No entanto, foram variados os tempos de choque térmico a 42 °C. Além disso, com o objetivo de verificar se o crescimento da cultura interferiria no valor de atividade, os resultados deste experimento também foram expressos como relações entre a atividade lipolítica em mUE e a densidade óptica a 595 nm (D.O.₅₉₅) (Figura 19).

Como o sistema *deep well* mostrou uma grande dispersão da atividade durante a cultura, um método alternativo, utilizando placas tipo ELISA, foi testado. Apesar de

terem sido testados três modos diferentes de indução com as microplacas, os resultados não foram favoráveis. Como mostrado na Figura 18, os modos de indução testados mantiveram a dispersão alta, no intervalo de 25 a 40 % do valor da média.

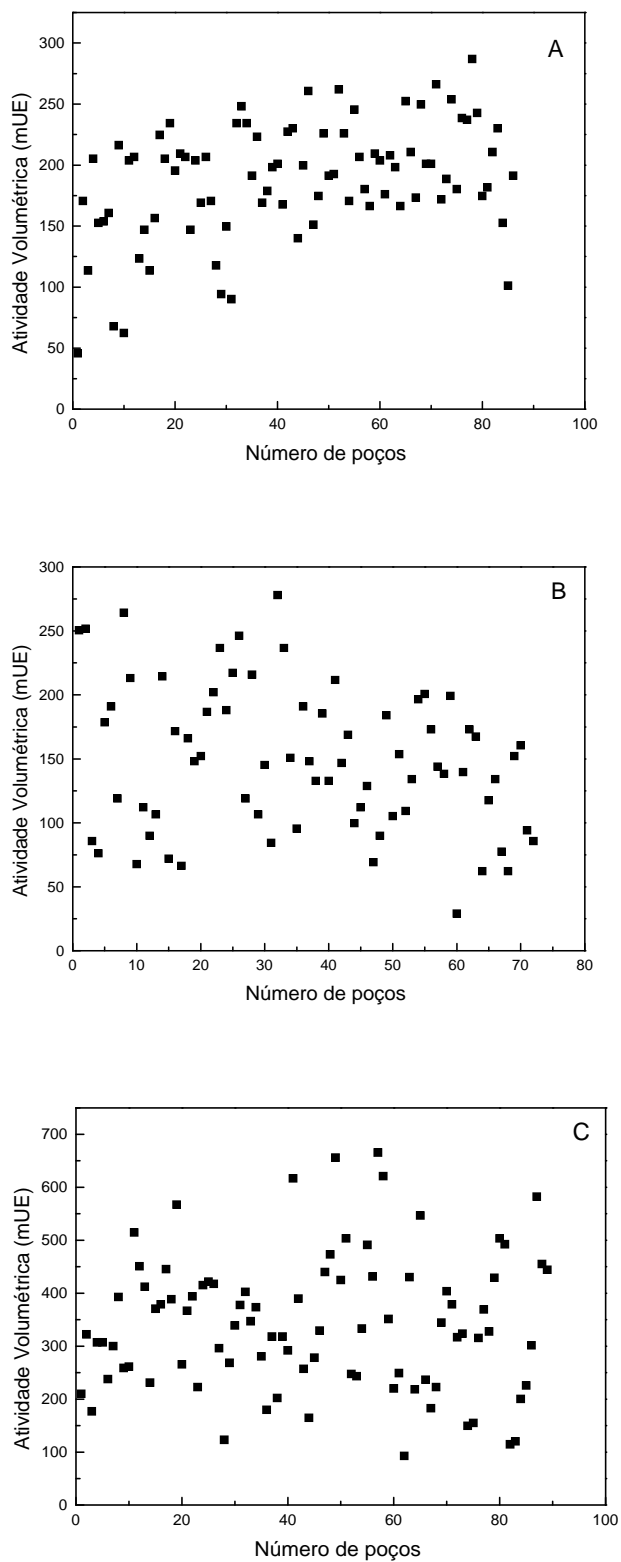
Os valores médios de atividade com os respectivos desvios padrões são apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 – VALORES DA MÉDIA DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA E DO DESVIO PADRÃO OBTIDO PARA CADA MODO DE INDUÇÃO EM MICROPLACAS

Modo de indução^a	Média da Atividade Lipolítica (mUE)	Desvio padrão	% do desvio da média
A	188,1	47,54	25,27
B	148,8	56,58	38
C	342	127	37,2

a – a classificação dos modos de indução está de acordo com aquela apresentada na legenda da Figura 18. Os valores foram calculados a partir dos resultados apresentados na Figura 18.

FIGURA 18 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* POR *Escherichia coli* XL-1 BLUE EM MICROPLACAS – ANÁLISE DA VARIAÇÃO POR ATIVIDADE LIPOLÍTICA



Legenda: Todos os cultivos foram realizados em microplacas a 30 °C e 160 rpm de agitação. A – indução durante 2 h a 42 °C; B – indução durante 20 min a 42 °C mais 3 h a 37 °C e C – indução durante 40 min a 42 °C e mais 3 h a 37 °C.

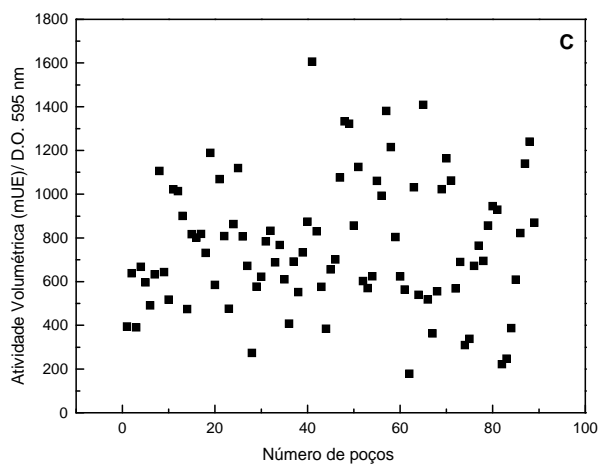
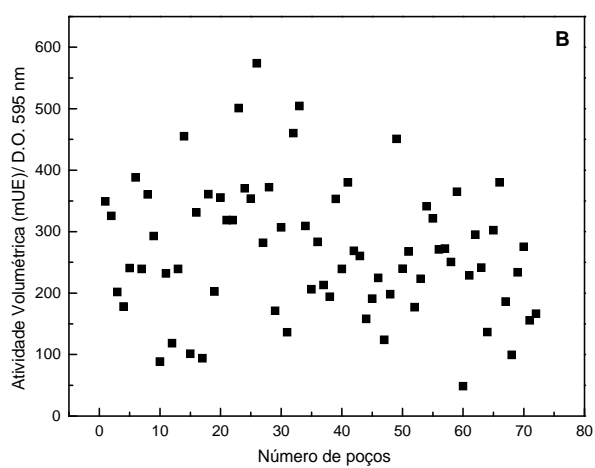
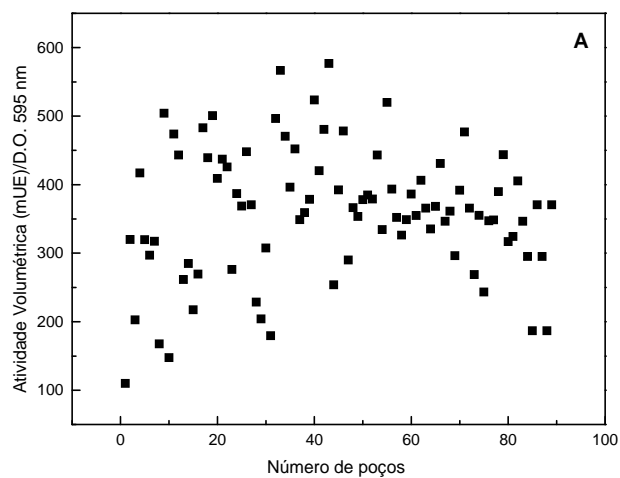
As culturas foram desenvolvidas a 30 °C, ao invés de 37 °C, pois nesta temperatura já havia sido observada a ausência de atividade lipolítica (Figura 15). Sendo assim, todos os passos partiram de um valor zero de atividade no início da indução, evitando alguma interferência por *background*.

O modo de indução C (indução durante 40 min a 42 °C e mais 3 h a 37 °C) foi o que apresentou o maior nível de atividade lipolítica, apesar de ter a porcentagem de desvio mais alta do que o modo A (indução durante 2 h a 42 °C). No entanto, como baixas atividades podem levar a erros no ensaio enzimático, optou-se por seguir com o modo de indução A.

Quando os valores de atividade lipolítica foram normalizados com a D.O. a 595 nm, não houve uma grande melhora nas porcentagens dos desvios da média (Figura 19 e Tabela 10), mostrando que de fato este é um problema de indução da expressão enzima e não da variação de atividade devido ao crescimento da bactéria. Uma alternativa, um pouco mais apurada, foi determinar a quantidade de proteína para cada poço, e assim expressar os valores como atividades específicas.

Para tanto, realizou-se um novo experimento, utilizando-se o modo de indução C e determinando-se a concentração de proteínas pelo método de Bradford, como descrito no item 4.4.2. Na Figura 20, é mostrada a variação de atividade específica para o modo de indução C em microplacas.

FIGURA 19 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* POR *Escherichia coli* XL-1 BLUE EM MICROPLACAS



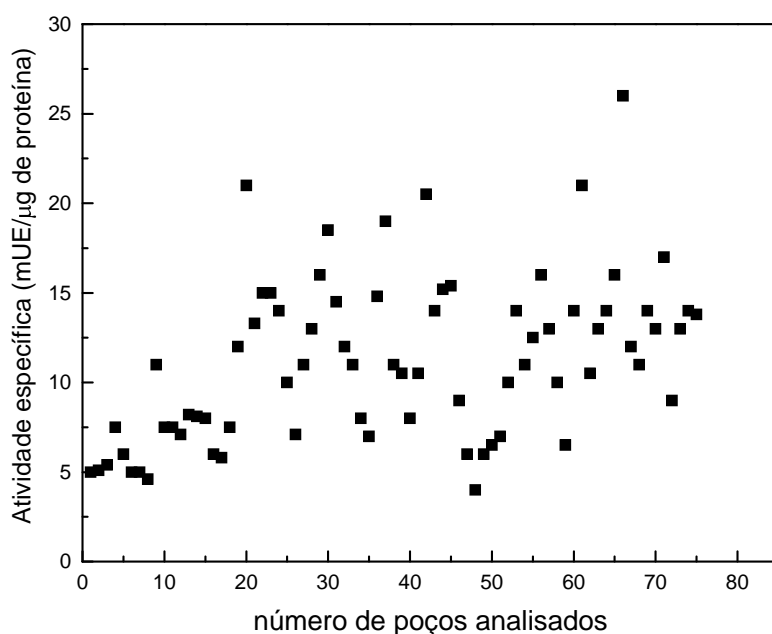
Legenda: Todos os cultivos foram realizados em microplacas a 30 °C e 160 rpm de agitação. A – indução durante 2 h a 42 °C; B – indução durante 20 min a 42 °C mais 3 h a 37 °C e C – indução durante 40 min a 42 °C e mais 3 h a 37 °C.

TABELA 10 – VALORES DA MÉDIA DE ATIVIDADE E DO DESVIO PADRÃO OBTIDO PARA CADA MODO DE INDUÇÃO EM MICROPLACAS – ANÁLISE DE VARIAÇÃO POR ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM RELAÇÃO A D.O. A 595 nm

Modo de indução ^a	Média da Atividade (mUE)/ D.O. 595 nm	Desvio padrão	% do desvio da média
A	362,9	94,1	25,9
B	268,8	106,7	39,7
C	760,6	294,7	38,7

a – a classificação dos modos de indução está de acordo com aquela apresentada na legenda da Figura 19. Os valores foram calculados a partir dos resultados apresentados na Figura 19.

FIGURA 20 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* POR *Escherichia coli* XL-1 BLUE EM MICROPLACAS – VARIAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA



A análise de variação obtida para atividade específica continuou a mostrar os resultados observados anteriormente. O valor médio de atividade específica foi igual a

11,2 mUE/mg de proteína com um desvio padrão de $\pm 4,56$ mUE/mg de proteína. Este valor de desvio corresponde a 40 % do valor da média, o que está de acordo com a análise feita previamente pela atividade lipolítica/D.O.₅₉₅ (Tabela 10).

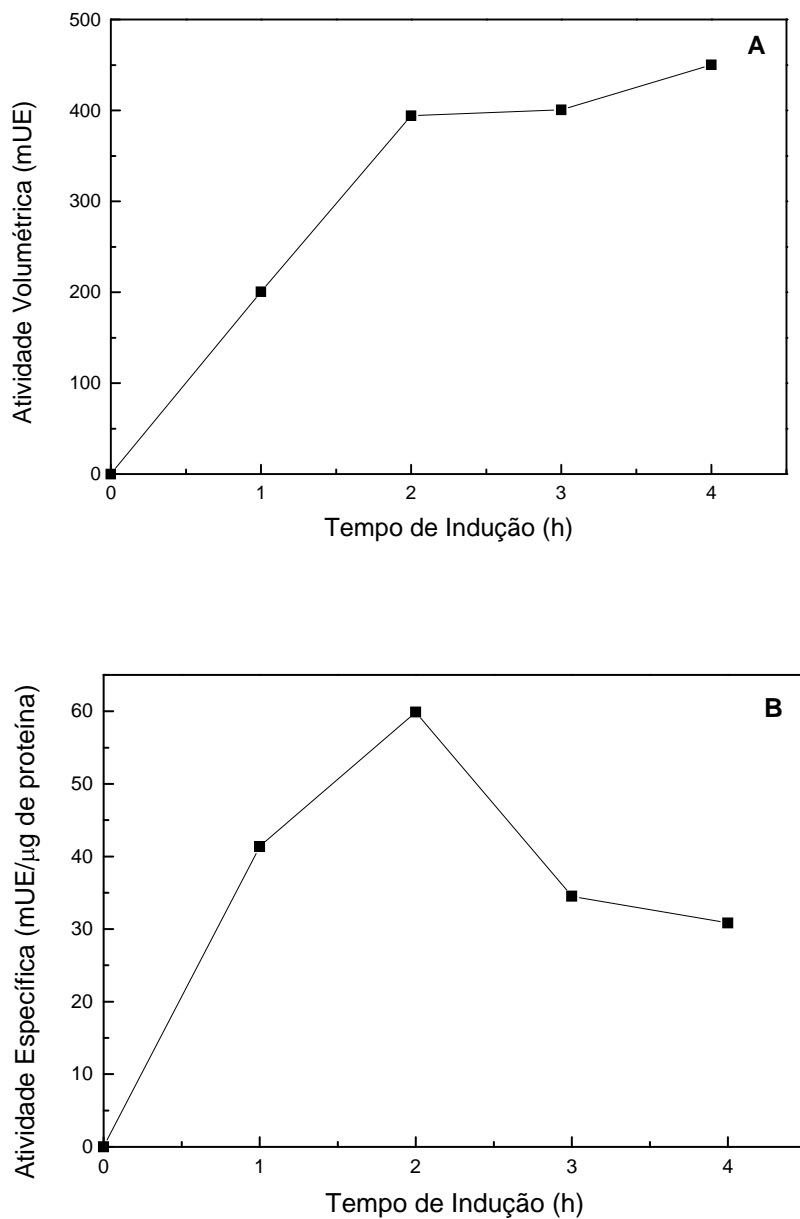
5.8 EXPRESSÃO DA LIPASE DE *B. cepacia* EM *E. coli* BL21(DE3) pLysS A PARTIR DO PLASMÍDEO pMMS-1

Quando se trabalhou somente com a lipase selvagem de *B. cepacia* não foi possível obter médias de atividade com baixa dispersão, mesmo testando várias formas de indução, conforme mostrado anteriormente. Uma outra possibilidade para se tentar amenizar este fator foi subclonar o inserto *ompAliph* em um outro vetor de expressão, com indução controlada por outro promotor, que não o de choque térmico. Para tal, o inserto *ompAliph* foi subclonado em pET-29a(+) conforme descrito no item 4.2.7 de Material e Métodos. Este vetor controla a expressão de proteínas através do promotor da RNA polimerase do fago T7. Como mostrado na Figura 21, expressando a lipase e sua proteína auxiliadora a partir do plasmídeo pET29a, maiores atividades foram obtidas em comparação ao plasmídeo pT-ompA-LipHp (Figura 13).

Quando a enzima foi expressa por choque térmico (utilizando o plasmídeo pT-ompA-LipHp), após 5 horas de cultivo determinou-se uma atividade de 75 mUE, enquanto com o plasmídeo pMMS-1 com quatro horas de indução foram alcançadas 450 mUE. Estes resultados mostraram que, para a expressão da lipase de *B. cepacia*, o promotor para a RNA polimerase T7 foi mais eficiente do que o promotor de choque térmico λP_{RL} .

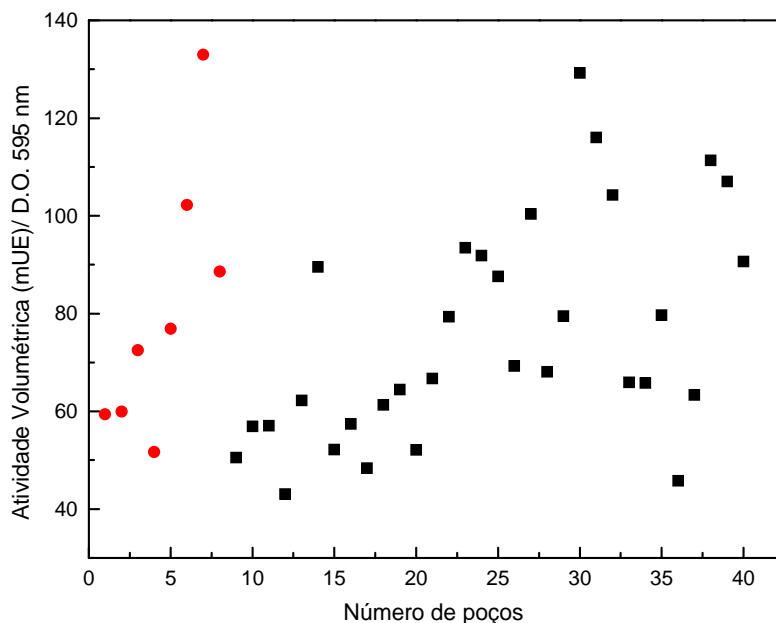
Confirmada a expressão da enzima, a segunda parte consistiu em avaliar a variação da expressão da lipase em sistemas de 96 poços. Na Figura 22, é mostrado o perfil de atividade obtido após indução com dois indutores: IPTG e lactose.

FIGURA 21 – EXPRESSÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* PELA *E. coli* BL21 (DE3) pLysS



Legenda: atividade de hidrólise do pNPP em placas tipo ELISA, de uma cultura de *E. coli* BL21(DE3) pLys induzida com IPTG 1 mmol.L^{-1} . A – valores de atividade volumétrica determinados durante o período de indução e B – os valores determinados em A, porém, em relação a concentração de proteínas de cada amostra.

FIGURA 22 - EXPRESSÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* PELA *E. coli* BL21 (DE3) pLysS EM SISTEMAS DE 96 POÇOS



Legenda: a primeira coluna da placa foi induzida com IPTG 1 mmol.L^{-1} (●), constituindo um controle positivo. As outras quatro colunas foram induzidas com lactose na concentração final de 0,5 % na cultura (■).

Apesar de não se ter encontrado um modo de indução que conseguisse gerar bons níveis de enzima ativa e com boa reprodutibilidade, a seleção dos candidatos foi feita com o sistema que se considerou mais robusto e também o mais prático.

A alteração no tipo de promotor da enzima também não foi capaz de diminuir a dispersão do valor médio de atividade no sistema. As induções com IPTG e com lactose tiveram porcentagens de desvio na média de 30,4 % e 30 %, respectivamente, um valor que ainda é considerado muito elevado.

Sendo assim, de todos os modos testados, a indução no modo C com o plasmídeo pT-ompA-LipHp foi o selecionado por expressar o maior nível de enzima e necessitar de apenas um cultivo.

Para expressar a lipase a partir do plasmídeo pMMS-1, um pré-cultivo teve que ser realizado pois só foi possível induzir a expressão da enzima quando a cultura ainda estava no início da fase exponencial de crescimento. Portanto, uma placa foi

incubada durante 14 horas e serviu de inóculo para um novo cultivo, que foi seguido até a D.O. 600 de 0,4.

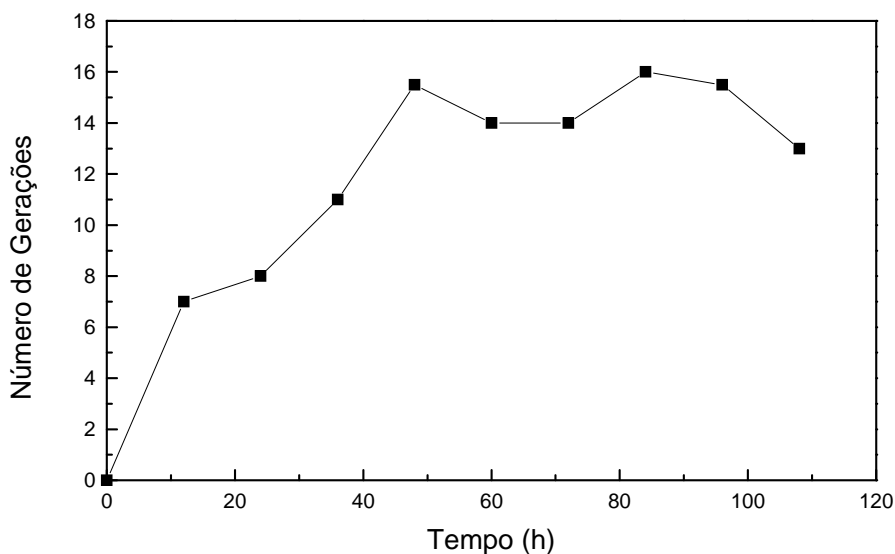
5.9 MUTAGÊNESE DO PLASMÍDEO pT-ompA-LipHp

Após ter definido o modo de indução da lipase em sistemas de 96 poços, os mutantes foram gerados para o início da seleção.

Primeiramente, a estirpe de *E. coli* XL-1 Red foi transformada com pT-ompA-LipHp e cultivada durante 12 horas, sendo transferida para uma nova cultura a cada 12 horas, durante 4 dias e meio.

Durante as subculturas, amostras foram coletadas para extração dos plasmídeos mutagenizados e, também, para determinação do número de gerações pela técnica de Miles-Misra, como descrito no item 4.2.10. Após a contagem do número de gerações foram obtidos os perfis mostrados na Figura 23.

FIGURA 23 – NÚMERO DE GERAÇÕES DURANTE AS SUBCULTURAS DE *E. coli* XL-1 RED



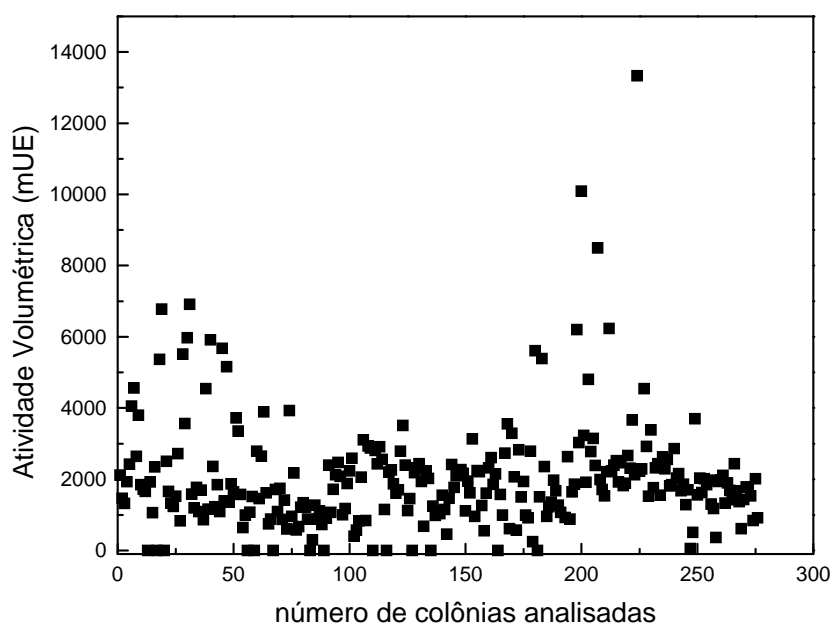
Legenda: número de gerações contadas através da técnica de Miles-Misra conforme descrito em Material e Métodos.

No término das subculturas, o número total foi de 114 gerações. Acredita-se que este número seja o suficiente para obtenção de uma grande biblioteca de mutantes, já que com o protocolo padrão desta estirpe é possível obter mutantes somente com 12 horas de cultivo. Os plasmídeos da última subcultura (correspondente a 108 h) foram extraídos e transformados em *E. coli* XL-1 Blue para início da seleção dos mutantes.

5.10 ANÁLISE DA BIBLIOTECA GERADA POR MUTAGÊNESE COM *E. coli* XL-1 RED

Após a transformação da última subcultura, as colônias foram cultivadas em placas de Petri contendo LA e ampicilina, durante 12 h a 37 °C. Então, várias colônias foram coletadas e inoculadas nas microplacas contendo meio LB e ampicilina. Após a indução da expressão da lipase a atividade lipolítica foi dosada, sendo os resultados apresentados na Figura 24.

FIGURA 24 – ANÁLISE DOS CANDIDATOS GERADOS PELA TRANSFORMAÇÃO DE pT-ompA-Lip-Hp MUTAGENIZADO EM *E. coli* XL-1 RED



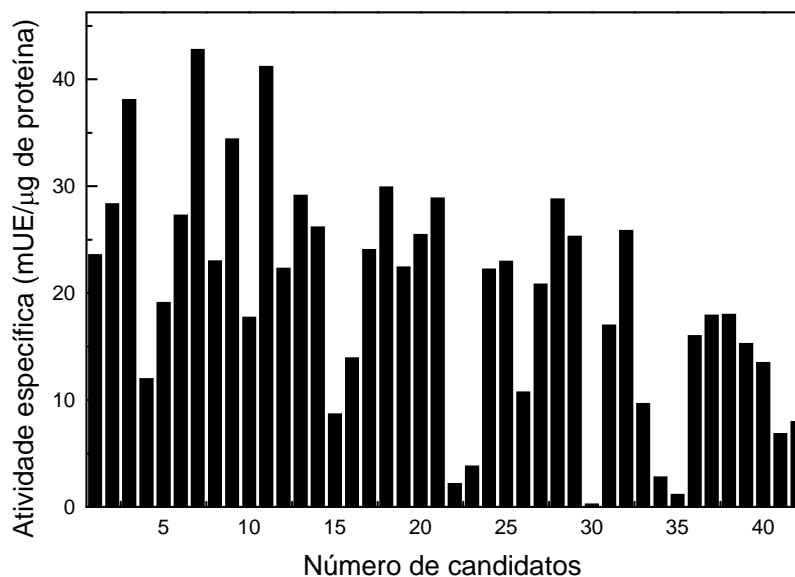
Os mutantes que apresentaram valores de atividade mais afastados da média, tanto para maior ou menor atividade, foram selecionados para posterior confirmação da atividade, ou seja, para realização de um cultivo em frascos de vidro.

Os resultados apresentados na Figura 24 foram obtidos da análise de três microplacas com 88 colônias cada. As análises foram sempre feitas em grupos de três microplacas até totalizarem um pouco mais do que 1.000 colônias analisadas. Em cada placa, quatro poços foram reservados para a lipase selvagem, e a sua média de atividade serviu como um valor de referência. O critério de seleção dos mutantes foi calculado a partir da média da lipase selvagem, descontando ou acrescentando o desvio padrão da média, multiplicado por dois. Este artifício fez com que apenas os valores mais afastados da média fossem coletados.

Após a seleção pelos valores de atividade lipolítica, duas placas estoques, em glicerol 50 %, foram feitas tanto com os candidatos positivos (aumento de atividade), quanto os negativos (decréscimo de atividade). Os candidatos positivos foram crescidos em 3 mL de meio LB e induzidos como descrito no item 4.1.4.1 da seção Material e Métodos, para confirmação dos resultados.

Os valores de atividade foram expressos como atividades volumétricas e específicas, e um controle positivo com a lipase selvagem foi utilizado para comparação. Na Figura 25, é mostrado o perfil de atividade dos 40 primeiros candidatos pré-selecionados no *screening* em microplacas.

FIGURA 25 – PERFIL DE ATIVIDADE ESPECÍFICA DE 40 CANDIDATOS POSITIVAMENTE SELECIONADOS



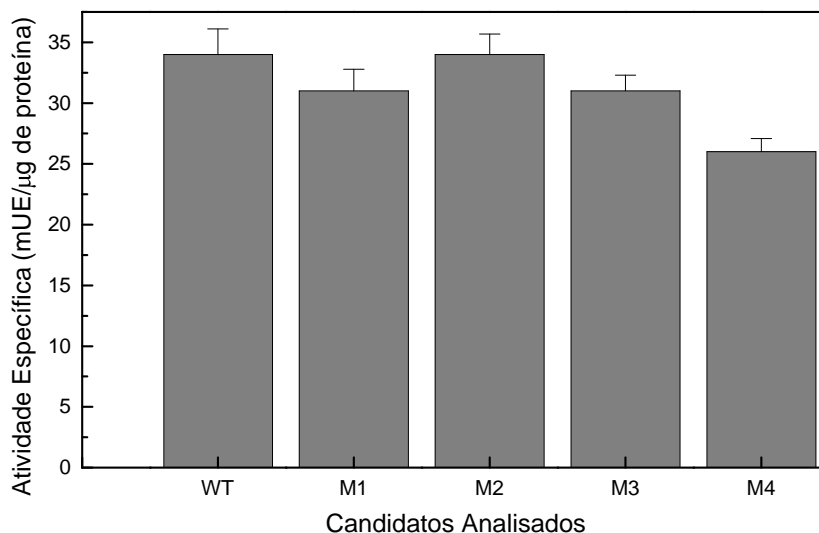
Legenda: as duas primeiras colunas correspondem a atividades específicas obtidas para a lipase selvagem. As atividades específicas de hidrólise do pNPP foram determinadas em placas tipo Elisa.

A média de atividade específica para a lipase selvagem correspondeu a 26 mUE/ μg de proteína ($\pm 3,4$). Quatro candidatos apresentaram atividades específicas acima deste nível: 38,1; 42,8; 34,4 e 41,2 respectivamente. Estes candidatos foram selecionados para estudos posteriores.

Os candidatos selecionados foram nomeados como M1, M2, M3 e M4, e passaram por mais uma etapa de confirmação das atividades, sendo que cada candidato foi cultivado e induzido, em cinco cultivos independentes, conforme descrito no item 4.3.1 de Material e Métodos.

Apesar de todos os candidatos terem apresentado, na primeira etapa de seleção, maior atividade que a lipase selvagem, estes mesmos candidatos tiveram atividades muito baixas na etapa de confirmação das atividades. Este fato pode ser justificado pela ocorrência de falsos-positivos durante a reação, já que o substrato pNPP pode sofrer ação de outros compostos e hidrolisar espontaneamente.

FIGURA 26 – PERFIL DE ATIVIDADE ESPECÍFICA DOS CANDIDATOS POSITIVOS M1, M2, M3 E M4



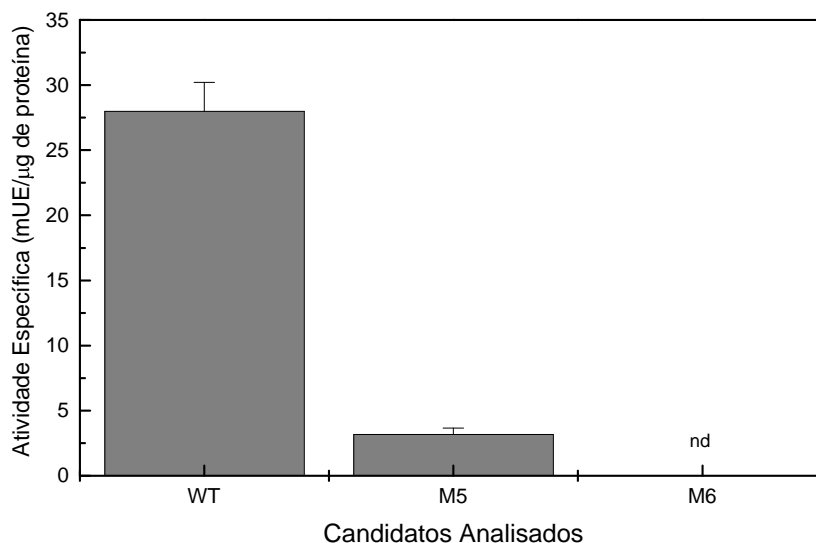
Legenda: as atividades específicas de hidrólise do pNPP foram determinadas em placas tipo Elisa.

As médias de atividade específica foram iguais a $34 \pm 2,1$ (lipase selvagem), $31 \pm 1,8$ (M1), $34 \pm 1,7$ (M2), 31 ± 3 (M3) e $26 \pm 1,1$ (M4) mUE/ μg de proteína. Sendo assim, as atividades específicas obtidas previamente para os candidatos não se mostraram superiores à atividade da lipase selvagem, o que mostra a dificuldade em selecionar com precisão um mutante com atividade aumentada.

No entanto, para verificar se a estirpe *E. coli* XL-1 Red inseriu alguma mutação nos genes da lipase e da proteína auxiliadora, reações de inserção foram feitas nos plasmídeos dos candidatos M1-M4 e no plasmídeo pT-ompA-LipHp. Apenas o gene selvagem e o candidato M1 foram parcialmente seqüenciados por esta técnica e os resultados serão apresentados a seguir.

Apesar da tentativa para obter mutantes com atividade aumentada não ter sido bem sucedido, quando se cultivou as cepas em frascos de vidro, dois candidatos negativos (M5 e M6) foram confirmados através de suas atividades específicas, como mostrado na Figura 27.

FIGURA 27 – PERFIL DE ATIVIDADE ESPECÍFICA DOS CANDIDATOS NEGATIVOS M5 E M6.



Legenda: as atividades específicas de hidrólise do pNPP foram determinadas em placas tipo Elisa.

Os resultados mostraram que, houve uma redução considerável da atividade específica quando esta foi comparada à atividade da lipase selvagem para os dois candidatos. O candidato M5 apresenta cerca de 8,8 vezes menos atividade que a lipase selvagem, enquanto que com o candidato M6 nenhuma atividade pode ser detectada. Com base nestes resultados foi possível afirmar que estes dois mutantes tenham sofrido algum tipo de mutação deletéria.

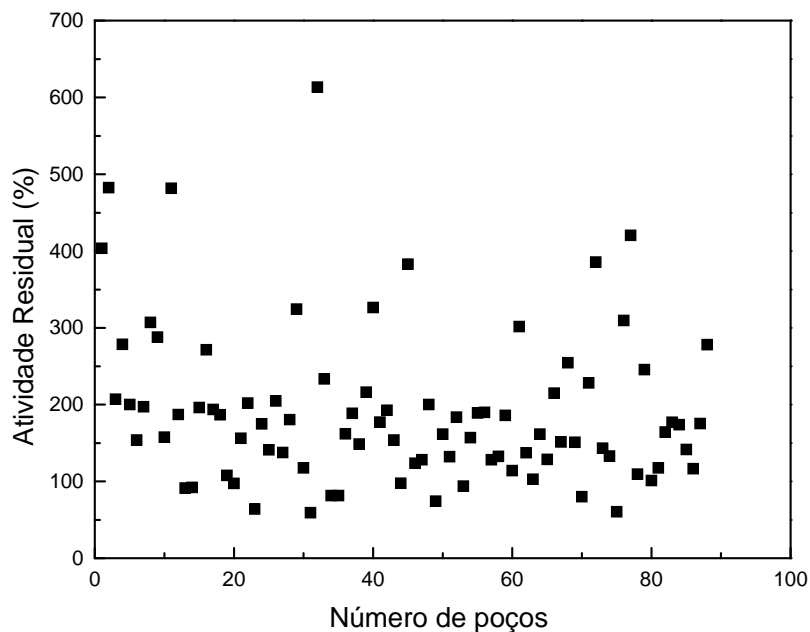
5.11 ESTABILIDADE DA LIPASE DE *B. cepacia* A 60 °C EM MICROPLACAS

Um alvo bastante importante para a evolução de biocatalisadores é a termoestabilidade. Enzimas que mantenham suas propriedades catalíticas, porém, mas resistam a temperaturas por mais tempo, são extremamente atrativas do ponto de vista econômico e da aplicação.

Nesta seção será apresentado um ensaio preliminar para se avaliar a possibilidade de utilizar a incubação a 60 °C como uma condição de *screening* para termoestabilidade. Resultados preliminares da Amano (Nagoya, Japão), empresa que comercializa a lipase de *B. cepacia* e que primeiramente a caracterizou, mostraram que esta lipase perde cerca de 50 % da sua atividade após 1h de incubação a 60 °C (AMANO ENZYMES, 2005). Portanto, um ensaio com incubação durante 2 h a 60 °C foi utilizado para selecionar mutantes com melhor termoestabilidade. Este tempo de incubação seria suficiente para reduzir bastante a atividade da lipase, sendo que qualquer mutante que apresentasse uma atividade mais elevada do que a da lipase selvagem, poderia ser facilmente distinguindo dos demais. No entanto, como mostrado na Figura 28, mesmo avaliando apenas a lipase selvagem, a enzima presente na grande maioria dos poços manteve a atividade.

Este resultado mostra que a enzima não sofreu ação desnaturante do calor na temperatura de 60 °C, sendo que o valor médio de atividade residual foi igual a 190 %, até mesmo mostrando que alguns poços tiveram um aumento da atividade. Previamente, já havia sido observado que no sistema de microplacas, incubando-as a 60 °C só depois de 1 h a temperatura em cada poço atinge 60 °C. Isto não justifica inteiramente o resultado apresentado, pois, como o tempo de incubação foi mantido por mais 1 hora, de acordo com os resultados apresentados pela Amano, a lipase deveria perder pelo menos cerca de 50 % da sua atividade inicial. No entanto, foram utilizadas células inteiras de *E. coli* para fazer este experimento e que a maior parte da enzima estava contida no espaço intermembranas da bactéria, já que esta lipase não é transportada para o espaço extracelular em *E. coli* (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1999). Assim, é possível sugerir que o fato da enzima estar protegida pelo espaço intermembranas pode ter amenizado o efeito de desnaturação pelo aquecimento.

FIGURA 28 – ATIVIDADE RESIDUAL DA LIPASE DE *B. cepacia* APÓS 2 HORAS DE INCUBAÇÃO A 60 °C EM MICROPLACAS



Legenda: os valores de atividade residual (%) representam uma razão das atividades de hidrólise do pNPP após 2 h e no início da incubação.

Com as observações apresentadas, optou-se por não utilizar este método para seleção de mutantes gerados pela *E. coli* XL-1 Red.

5.12 ESTABILIDADE DA LIPASE DE *B. cepacia* EM SOLVENTES MISCÍVEIS EM ÁGUA

Primeiramente, foram testados os seguintes solventes miscíveis em água: n-propanol, etanol, metanol, acetona, acetonitrila e DMF (N,N'-dimetil formamida). As atividades residuais, após 2 h de incubação em presença dos solventes, foram calculadas como porcentagens da atividade após incubação na ausência de solvente. Os resultados das atividades residuais obtidas com a lipase selvagem para cada solvente estão dispostos na Tabela 11.

TABELA 11 – ATIVIDADE RESIDUAL DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* APÓS INCUBAÇÃO EM SOLVENTES ORGÂNICOS MISCÍVEIS EM ÁGUA^a

Solvente Orgânico	Atividade Residual (%)
Etanol	209
Metanol	206
Propanol	131
Acetonitrila	45
DMF	38
Acetona	zero

a - a suspensão de células foi incubada durante 2 h a 30 °C em misturas de solventes a 80 % com H₂O (v/v), com agitação de 160 rpm. As atividades residuais foram determinadas pelo método de hidrólise do pNPP em placas de 96 poços. As atividades são expressas como percentagens das atividades obtidas após a incubação da suspensão em tampão Tris-HCl, 50 mmol.L⁻¹; pH 8,0.

Para todos os álcoois testados observou-se um aumento na atividade após o período de incubação, sendo a atividade residual superior em 31 % para o n-propanol, o etanol 109 % e para o metanol 106 %. A causa para tal efeito não foi determinada. Entretanto, pode-se sugerir que a presença do solvente pode contribuir para aumentar a solubilidade do substrato durante o ensaio. A acetonitrila e o DMF reduziram a atividade da enzima, sendo que a atividade residual com a acetonitrila foi de 45 % e com DMF de 38 %. Ambos solventes são classificados como solventes apróticos. O solvente mais agressivo para a lipase foi acetona, pois após a incubação nenhuma atividade foi detectada. No entanto, durante os ensaios, observou-se que a acetona atacava as placas de poliestireno utilizadas para a determinação de atividade. Portanto, este solvente foi excluído para a continuidade do trabalho.

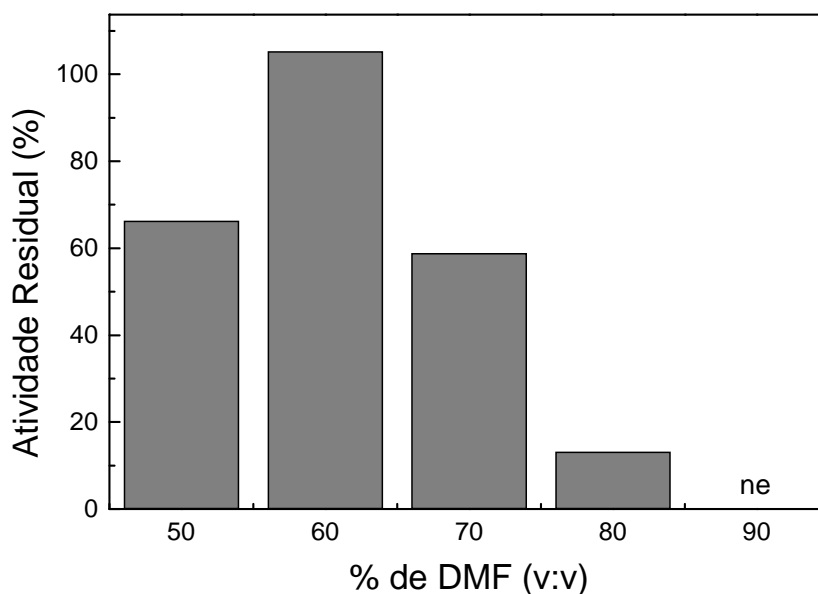
Como hipóteses para escolha do solvente restaram, portanto, apenas a acetonitrila e o DMF. Optou-se por trabalhar com o DMF para a seleção dos mutantes. Na literatura, há um trabalho em que os autores obtiveram mutantes de uma protease resistente ao DMF através de evolução dirigida (CHEN; ARNOLD, 1993). Além

disso, outra possibilidade seria testar os mutantes resistentes ao DMF em outros solventes como acetonitrila, DMSO e solventes não-polares.

Após a decisão de se utilizar o DMF como condição de seleção, outras concentrações de DMF em mistura com água foram testadas. Como mostrado na Figura 29, quando a cultura foi incubada em DMF 50 % (v/v), observou-se uma redução da atividade residual para 66 %. No entanto, quando a mesma cultura foi incubada em DMF 60 % (v/v) não foi observado o mesmo efeito, pois não houve perda da atividade durante a incubação. Em concentrações de 70, 80 e 90 %, houve uma perda gradual da atividade, sendo igual a 40, 87 e 0 %, respectivamente para cada condição.

Com estes resultados, optou-se pela concentração de 80 % de DMF para posterior seleção de mutantes resistentes a este solvente. A concentração de 90 % mostrou-se muito agressiva; portanto, a seleção de um mutante que se adapte a esta condição tornar-se-ia mais difícil. Uma abordagem mais razoável seria selecionar mutantes em condições mais brandas, e após, sujeitá-los a condições mais agressivas, como o DMF a 90 %. Embora também se tenha observado uma desnaturação significativa com 70 % de DMF, seria possível que nesta faixa de atividade fossem encontrados falso-positivos gerados por variação na indução da enzima. Porém, trabalhando na faixa de 20 a 10 % de atividade residual, como a obtida para 80 % de DMF, a seleção dos mutantes poderia ser mais satisfatória, pois valores na faixa de 50 % a 100 % de atividade residual sugeririam fortemente a presença de uma enzima melhor adaptada à condição.

FIGURA 29 – ATIVIDADE RESIDUAL DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* APÓS INCUBAÇÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DMF



Legenda: ne – não existente.

5.13 DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO ENZIMÁTICO COM MUF-BUTIRATO

Como apresentado anteriormente, o método de hidrólise do pNPP mostrou boa reprodutibilidade quando a cultura foi feita em frascos agitados e a atividade também foi dosada após o cultivo em placas de 96 poços (Figura 17). No entanto, algumas características foram observadas durante os ensaios: a) mesmo no controle somente com o substrato e tampão, foi observada, algumas vezes, a hidrólise do pNPP, o que poderia levar a seleção de falso-positivos; b) a mistura de pNPP com o tampão não era totalmente homogênea, formando uma solução turva semelhante a uma emulsão que, por sua vez era difícil, de ser obtida homogeneamente evitando a precipitação do substrato e c) trabalhando com concentrações reduzidas da enzima, o ensaio com o pNPP demandava até 1 hora para ser concluído. Estes fatores fizeram com que uma nova forma de determinação da atividade lipolítica fosse pesquisada para substituição do ensaio do pNPP no decorrer do trabalho.

No primeiro momento, para seleção dos mutantes de forma qualitativa, empregaram-se métodos clássicos de *screening* de atividade lipolítica. Os métodos aplicados foram: (1) método de hidrólise da tributirina, que é desenvolvido em meio de cultura sólido observando o halo de hidrólise em volta das colônias que expressam lipases (ATLAS, 1996) e (2) método de hidrólise da trioleína na presença de Rodamina B. Neste caso, o ácido oléico liberado pela hidrólise enzimática é capaz de formar um complexo fluorescente com a Rodamina B, que pode ser visualizado irradiando as placas com luz UV (KOUKER; JAEGER, 1987).

O primeiro método quando testado demonstrou ser perfeito para aplicação na seleção de mutantes. As suas principais vantagens foram que a elaboração do meio era mais simples e as colônias não precisavam ser irradiadas com luz UV. Entretanto, o fato de as colônias de *E. coli* XL-1 Blue (não transformadas) também apresentarem halos de hidrólise fez com que este método fosse descartado. Como a tributirina não é um substrato específico para lipases, sugere-se que o *background* apresentado no controle negativo possa ter ocorrido por ação de outras enzimas tais como as esterases.

O método com o corante Rodamina B apresentou desvantagens que foram observadas no decorrer dos ensaios: (a) as colônias precisavam ser irradiadas diretamente com luz UV (365 nm) e (b) quando a trioleína era misturada com o meio sólido, observava-se a formação de gotas de óleo que nem sempre se espalhavam uniformemente.

Quando as colônias são irradiadas diretamente por luz UV, o risco de danos celulares é eminente; sendo assim, tanto em nível molecular quanto fisiológico, seria arriscado trabalhar com colônias que tenham sido irradiadas, já que não é possível garantir a integridade das células após este tratamento.

A má distribuição da trioleína, quando misturada com o meio LB sólido fez com que fossem observados halos de hidrólise apenas onde existiam agregados de óleo. Com isso, muitas colônias que cresciam numa região onde não havia nenhum destes agregados poderiam ser erroneamente classificadas como não lipolíticas. Portanto, este método também se mostrou inadequado para a seleção dos mutantes.

PRIM et al. (2003) publicaram um método para a determinação da atividade de lipases usando substratos fluorogênicos tais como o MUF-butirato (butirato de 4-metil-

umbeliferila). O MUF-butirato é um composto fluorogênico obtido pela esterificação de 4-metil-umbeliferona com ácido butírico. O princípio deste método baseia-se na determinação indireta da atividade enzimática através do aumento de fluorescência gerado pelo produto de hidrólise, a 4-metil-umbeliferona. Este composto também é nomeado como 7-hidróxi-4-metil cumarina, fazendo parte de um importante grupo de fitocompostos. As cumarinas, quando excitadas a 365 nm emitem uma forte fluorescência azul em 450 nm e em pH alcalino (ao redor de 10) a fluorescência emitida torna-se mais intensa (MOLECULAR PROBES – INVITROGEN DETECTION TECHNOLOGIES, 2004). Porém, estudos prévios realizados com substratos conjugados a 4-metil-umbeliferona mostraram que, durante a reação, já é possível observar o aumento de fluorescência em pH acima de 6,5 (GODDARD; REYMOND, 2004).

As principais vantagens do método segundo PRIM et al. (2003) são a sensibilidade, a rapidez e a simplicidade na triagem de microrganismos lipolíticos. De fato, utiliza-se uma quantidade reduzida de substrato, além deste ser totalmente solúvel em tampões aquosos, o que representa uma ampla vantagem em relação aos outros métodos que utilizam triacilgliceróis ou ésteres de ácidos graxos pouco solúveis em soluções aquosas.

Considerando estas observações, buscou-se uma forma alternativa de *screening* utilizando o substrato MUF-butirato. Para tal, determinou-se a atividade lipolítica, através da quantificação de fluorescência, das imagens capturadas durante o ensaio. O aumento de fluorescência representa a hidrólise do MUF-butirato e o surgimento do agente fluorogênico 4-metil-umbeliferona.

Os resultados que serão apresentados a seguir descrevem como se observou a possibilidade de utilização da análise de imagens para validação desta técnica.

5.13.1 Determinação Qualitativa da Hidrólise de MUF-Butirato

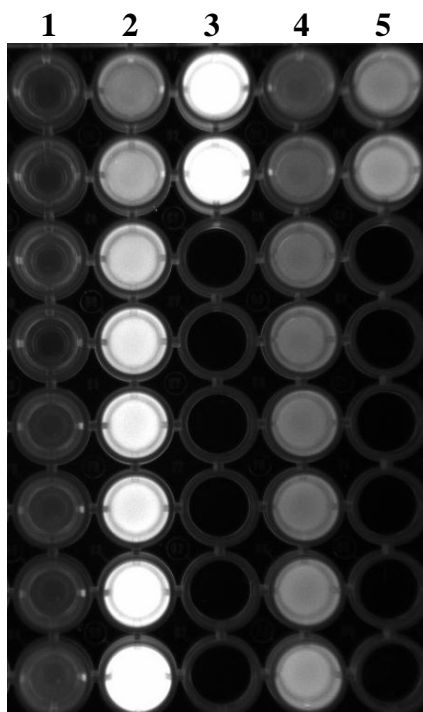
Os primeiros testes realizados com o MUF-butirato mostraram que, nos poços onde foram adicionadas alíquotas de cultura líquida de *E. coli* expressando a lipase de *B. cepacia*, desenvolveu-se fluorescência azul quando a placa era irradiada com luz

UV a 365 nm (Figura 30). Este era um resultado que indicava a ocorrência de hidrólise do MUF-butirato. Nos poços que continham apenas tampão Tris-HCl junto com o substrato ou cultura de células que não continham o plasmídeo, não se observou a mesma fluorescência. Portanto, verificou-se a partir destes resultados, que seria possível utilizar o acompanhamento da hidrólise do MUF-butirato em placas de 96 poços para a análise qualitativa da biblioteca de mutantes.

5.13.2 Determinação Quantitativa da Hidrólise de MUF-butirato por uma Lipase de Referência

Para validar o ensaio de forma quantitativa, foi utilizada primeiramente, uma preparação comercial da lipase de *Thermomyces lanuginosa*, (Lipolase[®] TM, Novozymes Latin America, Curitiba, Brasil). A quantificação foi realizada pela medida das unidades arbitrárias de fluorescência das imagens, denominadas como UAF.

FIGURA 30 – ANÁLISE QUALITATIVA DA HIDRÓLISE DE MUF-BUTIRATO



Legenda: Coluna 1, controle do substrato; colunas 2 e 3, ensaio enzimático e colunas 4 e 5, controle negativo com culturas de *E. coli* XL-1 Blue. Controle do substrato: 50 μL de tampão Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} ; pH 8 e 150 μL de MUF-butirato 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Ensaio enzimático: volumes crescentes do meio de cultura contendo lipase, de 5 a 50 μL , foram diluídos para volumes finais de 50 μL com tampão Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} . O ensaio foi desenvolvido com 150 μL de MUF-butirato 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Controle negativo: executado da mesma maneira que o ensaio, no entanto substituiu-se a cultura expressando a enzima por uma cultura de *E. coli* XL-1 Blue não transformada com o pT-ompA-LipHp.

5.13.2.1 Efeito da concentração de enzima

Primeiramente foram testadas diluições da lipase de *Thermomyces lanuginosa* com concentrações de proteína total de 4.500 e 8,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, conforme determinado pelo método de BRADFORD (1976). Os resultados da Figura 31 mostram que com uma concentração de proteína tão alta quanto 4,45 mg.mL^{-1} , após 4 min de reação foi atingido o valor máximo de fluorescência ($5,5 \times 10^6$). Por outro lado, com concentrações de proteína reduzidas (8,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), foi possível acompanhar a reação durante 18 min, atingindo um valor máximo de densidade óptica igual a $4,5 \times 10^6$.

Optou-se assim, por ensaiar uma série de diluições da enzima, compreendendo concentrações de proteína de 0,55 a 8,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, no intervalo de tempo de até 2 min.

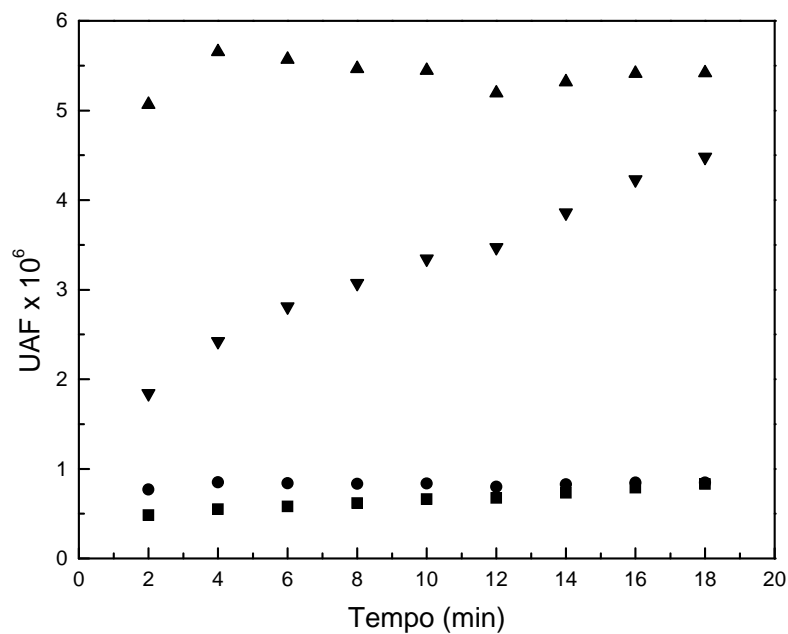
Como esperado, os resultados mostraram que as maiores concentrações de enzima catalisaram maior liberação de 4-metil-umbeliferona e, por conseqüência, renderam maiores valores de DO quantificada na análise das imagens (Figuras 32 e 33).

Na Figura 33, observa-se que, durante a reação, as diluições que contém uma maior concentração da enzima apresentam maior fluorescência quando comparadas com as diluições de baixa atividade lipolítica.

Uma análise de comparação entre a atividade lipolítica e a concentração de enzima foi então realizada. Como mostrado na Figura 34, um comportamento linear pode ser observado.

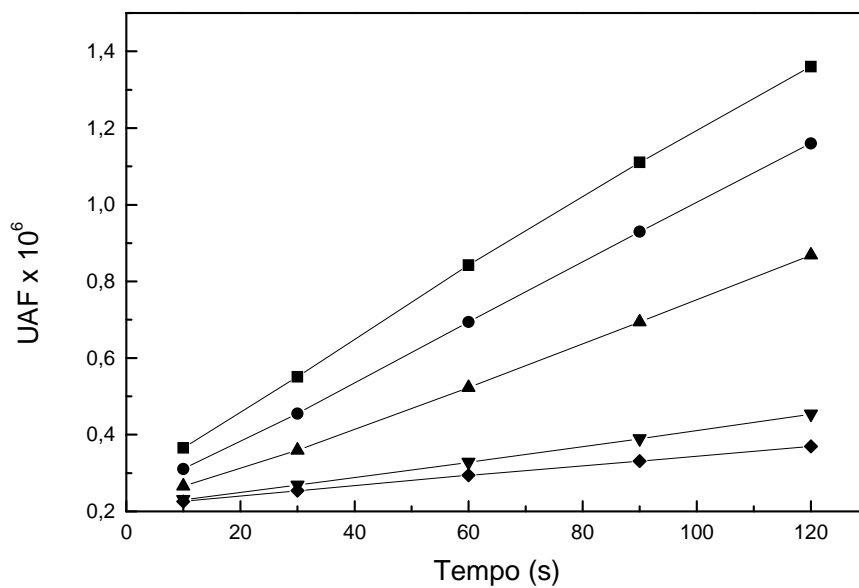
A principal vantagem deste método é a de poder determinar de forma rápida e precisa a velocidade inicial de lipases, mesmo em concentrações de enzima relativamente baixas.

FIGURA 31 – ANÁLISE QUANTITATIVA DA HIDRÓLISE DE MUF-BUTIRATO PELA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosa*



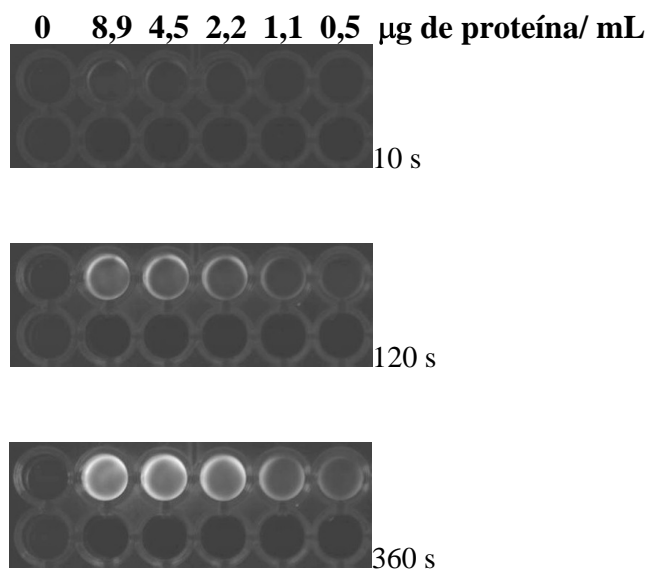
Legenda: os ensaios foram desenvolvidos em pH 8,0 a 24 °C. Concentrações de proteína : (▲) – 4.450 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; (▼) – 8,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Controles: (●) – controle da enzima (4.450 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e (■) – controle do substrato (MUF-butirato a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

FIGURA 32 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE INICIAL DA HIDRÓLISE DE MUF-BUTIRATO PELA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosa*



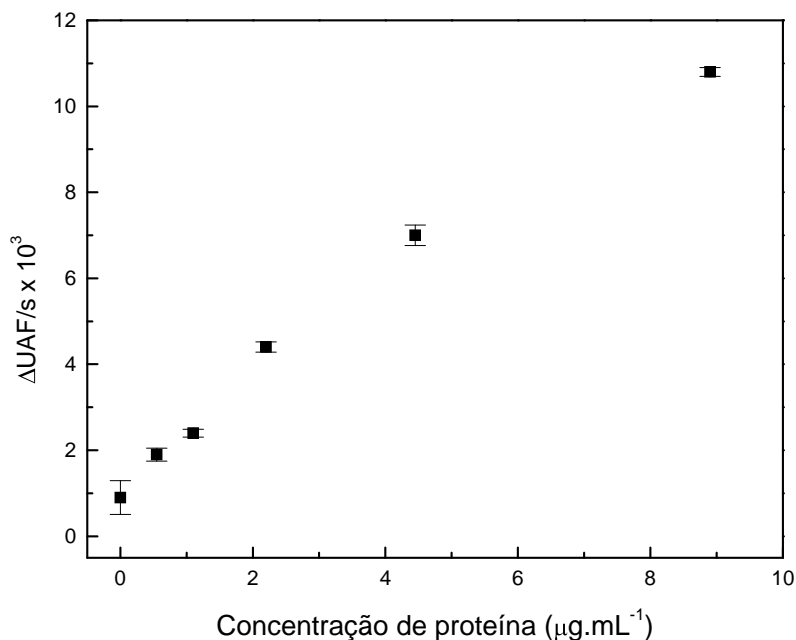
Legenda: os experimentos foram realizados com 100 µmol.L⁻¹ de MUF-butirato, em pH 8,0 a 24 °C. Concentração de proteína: (■) – 8,9 µg.mL⁻¹; (●) – 4,45 µg.mL⁻¹; (▲) – 2,2 µg.mL⁻¹; (▼) – 1,1 µg.mL⁻¹ e (◆) – 0,55 µg.mL⁻¹.

FIGURA 33 – IMAGENS CAPTURADAS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INICIAL DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosa* FRENTE AO MUF-BUTIRATO



Legenda: a linha superior mostra os ensaios feitos com diferentes diluições da lipase de *Thermomyces lanuginosa*, com concentrações decrescentes de 8,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 4,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 2,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 1,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína total, da esquerda para a direita. No primeiro poço desta linha está o controle do substrato. A linha inferior foi reservada ao controle da enzima, contendo as amostras de enzima, porém na ausência do substrato.

FIGURA 34 – COMPARAÇÃO DA VELOCIDADE DE REAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL



Legenda: as velocidades de reação foram obtidas por regressão linear das retas obtidas na Figura 32. A inclinação de cada reta corresponde à velocidade da reação em unidades de UAF por segundo de reação.

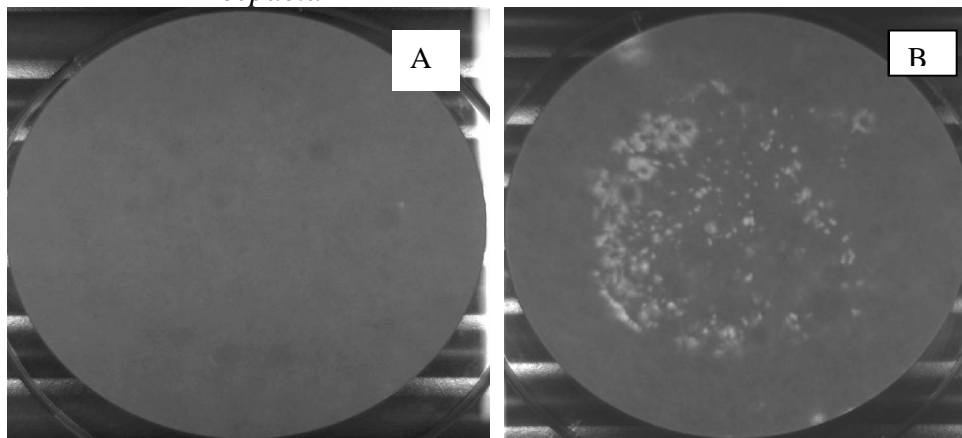
5.13.3 Análise Qualitativa de Atividade Lipolítica Utilizando Colônias de *E. coli* Expressando a Lipase de *B. cepacia*

A análise de colônias diretamente do meio sólido é uma abordagem interessante, pois aumenta o rendimento das análises, possibilitando a descoberta e/ou o isolamento de enzimas melhoradas mais rapidamente do que no cultivo em microplacas. No caso deste trabalho, enquanto em uma microplaca foi possível analisar no máximo 88 colônias, em uma placa de Petri de 12 cm de diâmetro, seria possível analisar entre 200 a 300 colônias. Seguindo esta lógica, PRIM et al. (2003) publicaram um método simples e bastante prático para a determinação de microrganismos lipolíticos crescendo em meio sólido, através do uso de substratos fluorogênicos como o MUF-butirato. Utilizando este trabalho como base, foram feitos alguns testes para tentar reproduzir os resultados publicados por PRIM et al. (2003).

Primeiramente, quando se tentou reproduzir a técnica inteiramente como havia sido publicada, dois problemas foram observados: (a) o meio sólido Luria-Bertrani apresentava um alto *background*, observado através de fluorescência azul ao ser irradiado com luz UV a 365 nm e b) quando se cultivou apenas *E. coli* XL-1 Blue não transformada com o plasmídeo pT-ompA-LipHp, foi observada uma fluorescência azul que impedia distinguir entre as colônias que expressavam a enzima e o controle negativo. Com estas primeiras observações, concluiu-se que tanto o meio como as colônias de *E. coli* XL-1 Blue interferem no ensaio proposto. Portanto, optou-se por desenvolver uma estratégia que isolasse a interferência do meio e das próprias colônias bacterianas. Nesta abordagem, as colônias foram transferidas para um papel de filtro e, após a indução da expressão da lipase, revelou-se as regiões de atividade colocando o papel em contato com o substrato. Desta maneira, foi possível isolar o *background* que era observado com as colônias de *E. coli* XL-1 Blue sem deixar de detectar as colônias que expressavam a lipase.

Na Figura 35, são mostradas duas imagens capturadas após a revelação com MUF-butirato utilizando a técnica de PRIM et al. (2003) modificada. Quando as colônias de *E. coli* expressaram a lipase de *B. cepacia*, halos de luminosidade puderam ser observados após a revelação. Estes halos representam regiões com maior quantidade do agente fluorescente 4-metil-umbeliferona livre, ou seja, regiões de atividade lipolítica. Porém, quando as colônias não expressaram a lipase, nenhum halo de fluorescência pode ser observado, indicando ausência de atividade lipolítica.

FIGURA 35 – IMAGENS DOS ENSAIOS REALIZADOS COM COLÔNIAS DE *Escherichia coli* EXPRESSANDO A LIPASE DE *Burkholderia cepacia*



A – controle negativo: apenas colônias de *E. coli* XL-1 Blue não transformadas com o plasmídeo pT-ompA-LipHp. B – controle positivo: ensaio a partir de colônias de *E. coli* que expressavam a lipase selvagem de *B. cepacia*. Ambas colônias foram crescidas em meio LA contendo tetraciclina no caso A e ampicilina no caso B.

O fato das colônias de *E. coli* XL-1 Blue apresentarem fluorescência azul após entrarem em contato com o substrato MUF-butirato é difícil de ser explicada. Pode se tratar de uma atividade hidrolítica residual constitutiva da cepa, pois quando se tentou utilizar outro meio sólido com ágar e tributirina para *screening*, também se observava certa atividade desta estirpe frente a este substrato.

Estirpes de *E. coli* com atividade lipolítica já foram descritas na literatura. No entanto, até o presente momento a estirpe *E. coli* XL-1 Blue não foi estudada quanto a expressão destas enzimas.

Resultados desta dissertação sugerem fortemente que esta estirpe não possui atividade lipolítica, pelo menos nas condições utilizadas para o seu crescimento (Figura 16). Quando o meio saturado com células de *E. coli* XL-1 Blue foi ensaiado pela hidrólise do pNPP (palmitato de *p*-nitrofenila), nenhuma atividade foi detectada. Mesmo quando a cultura saturada foi ensaiada pela hidrólise do MUF- butirato também nenhuma atividade foi detectada (Figura 30). Ambos resultados mostram um achado bastante interessante, ou seja, apenas quando a estirpe está crescendo em meio sólido apresenta a interferência relatada.

Existem alguns trabalhos na literatura que utilizam diretamente as colônias de bactérias para fazer o *screening* de enzimas que sofreram alguma mutação benéfica.

CHEN e ARNOLD (1993) utilizaram a transferência de colônias de *Bacillus subtilis* para membranas de nitrocelulose para *screening* de possíveis variantes da protease subtilisina E resistentes a DMF. Mais recentemente, SONG e RHEE (2001) selecionaram mutantes da fosfolipase A1 de *Serratia* sp. MK1 resistentes a DMSO, através de um ensaio diretamente com colônias de *E. coli* XL-1 Blue imobilizadas em membranas de *nylon* e expressando estas enzimas modificadas. O método baseia-se na reação da enzima frente ao seu substrato, a fosfatidilcolina, na presença de 30 % de DMSO. À medida que a enzima hidrolisa a fosfatidilcolina, halos transparentes surgem no meio sólido indicando que aqueles mutantes provavelmente mantêm a atividade após incubação com o solvente orgânico.

Com estas abordagens de *screening*, associadas ao uso de equipamentos automatizados, para coleta de colônias e pipetagem de soluções, a demanda de tempo para a seleção de novos biocatalisadores é reduzida significativamente.

5.14 APLICAÇÃO DO ENSAIO LIPOLÍTICO COM MUF-BUTIRATO PARA ISOLAMENTO DE LIPASE RESISTENTE A DMF

A biblioteca de mutantes da lipase de *B. cepacia* gerada por mutagênese aleatória foi testada frente à resistência a DMF 80 % em água. Como havia sido determinado pelos experimentos de resistência da lipase selvagem frente a alguns solventes polares, a enzima apresentou baixa estabilidade em soluções de DMF 80 % (v/v) após 3 h de incubação (Figura 29).

A rapidez na determinação e também a facilidade na manipulação durante o ensaio fez com que para seleção destes mutantes fosse aplicado o ensaio com MUF-butirato, desenvolvido durante este trabalho. Uma das principais vantagens que puderam ser observadas durante o ensaio, foi a captura de imagens das microplacas, pois todos os poços foram analisados ao mesmo tempo. Quando o leitor de microplacas foi utilizado, como no ensaio de hidrólise do pNPP, a leitura total da placa leva em torno de 45 segundos o que impedia que o início e término da reação fossem determinados com precisão.

Além disso, o *software* utilizado para análise das imagens dispõe de uma saída para arquivos de extensão *xls* que são manipulados em planilhas eletrônicas do tipo Microsoft EXCEL[®]. Com este artifício a manipulação dos dados e sua análise tornam-se significativamente mais rápidas e práticas.

5.14.1 Primeiro *Screening* da Biblioteca de Mutantes Frente a DMF 80 %

Primeiramente, para se testar a estratégia de seleção dos possíveis mutantes, apenas 384 transformantes do último ciclo de mutagênese (após 108 h de cultivo com a *E. coli* XL-1 Red) foram analisados. As colônias foram crescidas e induzidas como descrito nas seções 4.1.4.3 e 4.3.1 de Material e Métodos. Após indução foram transferidas para microplacas contendo DMF 80 % e incubadas por 3 horas, como descrito na seção 4.3.8. As atividades lipolíticas frente ao MUF-butirato foram determinadas (em placas tipo ELISA) no tempo zero e após 3 horas de incubação. Através da análise de atividade residual em DMF 80 %, após o primeiro *screening*, seis candidatos foram selecionados. Na Tabela 12, são mostradas as atividades residuais obtidas para cada candidato.

TABELA 12 – ATIVIDADES RESIDUAIS DOS CANDIDATOS SELECIONADOS NO PRIMEIRO *SCREENING* APÓS INCUBAÇÃO EM DMF 80 %

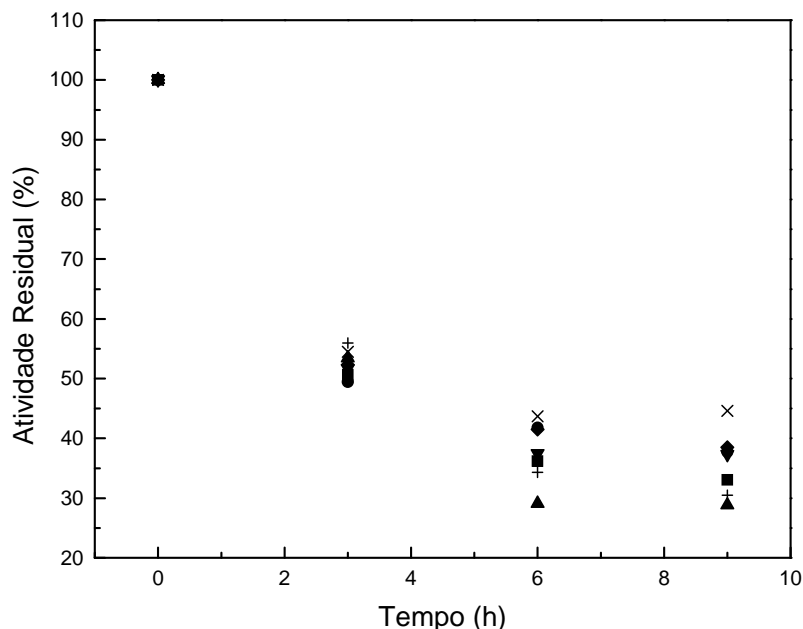
Candidato	Atividade Residual (%)
M7	40
M8	45
M9	51
M10	41
M11	52
M12	60

A atividade residual da lipase selvagem neste caso foi igual a zero.

5.14.2 Segundo *Screening* – Confirmação dos Candidatos

Nos ensaios acima, o volume máximo nas microplacas era de 200 μL , e a quantidade de enzima por poço era de 20 μL , adicionada de 180 μL de DMF, para atingir 80 % (v/v) do solvente. Como quantidades reduzidas de enzima poderiam aumentar a chance de erros no ensaio foi realizado um novo experimento para confirmação das atividades residuais mostradas na Figura 36. Os candidatos foram testados em volumes finais de 1 mL, com 100 μL da cultura contendo a enzima. Além disso, sabia-se que a expressão da lipase obtida nas microplacas era menor do que quando a cultura era crescida e induzida em frascos de vidro. Sendo assim, os candidatos foram previamente cultivados em 3 mL de meio LB e induzidos a partir desta cultura, e em seguida submetidos à incubação com DMF por 9 h e dosagem da atividade residual.

FIGURA 36 - PERFIS DE ATIVIDADE RESIDUAL DOS CANDIDATOS SELECIONADOS APÓS INCUBAÇÃO EM DMF 80 %



(■) – lipase selvagem; (●) – candidato M7; (▲) – M8; (▼) – M9; (◆) – M10; (+) – M11 e (×) – M12.

Os resultados mostraram que em geral não houve diferença significativa entre os candidatos testados e a lipase selvagem (Figura 36). Observando-se os perfis de decaimento da atividade ao longo do tempo, verifica-se que, após seis horas de incubação, o candidato M12, manteve a atividade residual levemente superior a lipase selvagem e até mesmo exibindo uma pequena ativação no tempo de nove horas em relação ao último ponto. Estes resultados fizeram com que este candidato fosse mais uma vez testado juntamente com a lipase selvagem servindo de controle no experimento seguinte.

Os resultados do segundo experimento para confirmação dos perfis de atividade residual para a lipase selvagem e o candidato M12 após 12 h de incubação em DMF 80 % não mostraram diferença entre a atividade residual da lipase selvagem e do candidato testado (44,5 % e 42,6 % para a lipase selvagem e o candidato M12, respectivamente).

Apesar do insucesso na seleção de um mutante resistente à condição testada, acredita-se que o sistema de *screening* aplicado tem potencial para seleção de novas lipases. Primeiramente, é preciso considerar que a porção da biblioteca analisada é muito pequena, com apenas 384 colônias. Outras técnicas, como *error prone* PCR em condições ajustadas para baixas taxas de mutação, costumam exigir a análise de um grande número de colônias para se obter mutantes com propriedades melhoradas. CHEN e ARNOLD (1993) analisaram cerca de 4.000 colônias para isolar uma protease com melhor desempenho catalítico em presença de 35 % de DMF. SONG e RHEE (2001) utilizaram *error prone* PCR para gerar uma biblioteca de mutantes da fosfolipase A₁ e analisaram 5.000 colônias para obterem nove mutantes com estabilidade aumentada frente ao DMSO 30 %. Estes são apenas dois exemplos de evolução dirigida aplicada à estabilização de enzimas em solventes orgânicos. Outros exemplos que envolvem enantiosseletividade e termoestabilidade costumam analisar bibliotecas tão grandes quanto estas ou até mesmo maiores (REETZ, 2002).

Por outro lado, Lutz e Patrick (2004) publicaram uma revisão discutindo novos métodos para evolução dirigida, aqueles que se baseiam na qualidade e não na quantidade das bibliotecas geradas. De fato, esta é uma tendência cada vez maior, principalmente com a utilização de modelos moleculares para prever as mutações. Porém, para que estas abordagens possam vir a ter sucesso, algumas propriedades precisam ser mais bem conhecidas em nível molecular, como por exemplo, a estabilização de enzimas em solventes orgânicos. Como ainda não é possível planejar com precisão as mutações para melhorar esta propriedade, justifica-se o emprego de uma técnica de mutagênesealeatória.

5.15 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os genes *lip* e *hp* foram seqüenciados a partir do plasmídeo pT-ompA-LipHp usando oligonucleotídeos sintéticos como descrito previamente (item 4.2.9.2, Material e Métodos).

A seqüência obtida foi traduzida e alinhada com a lipase de *B. cepacia* ATCC 21808 anteriormente seqüenciada e depositada com o código 5LIP, no Protein Data Bank. Na Figura 37, é mostrado o alinhamento entre as duas seqüências.

FIGURA 37 – ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DA LIPASE DE *B. cepacia* OBTIDA NESTE TRABALHO E UMA SEQUENCIA DA MESMA ENZIMA DEPOSITADA NO GENBANK

```

      5           15           25           35           45           55
1.  ADNYAATRYP IILVHGLTGT DKYAGVLEYW YGIQEDLQQR GATVYVANLS GFQSDDGPNG
2.  ADNYAATRYP IILVHGLTGT DKYAGVLEYW YGIQEDLQQR GATVYVANLS GFQSDDGPNG
    *****
      65           75           85           95           105          115
1.  RGEQLLAYVK TVLAATGATK VNLVGHSQGG LTSRYVAAVA PDLVASVTI  GTPHRGSEFA
2.  RGEQLLAYVK TVLAATGATK VNLVGHSQGG LTSRYVAAVA PDLVASVTI  GTPHRGSEFA
    *****

     125          135          145          155          165          175
1.  DfVQGVLAYD PTGLSSTVIA AFVNVFGILT SSSNNTNQDA LAALKTLTTA QAATYNQNYP
2.  DfVQGVLAYD PTGLSSTVIA AFVNVFGILT SSSNNTNQDA LAALKTLTTA QAATYNQNYP
    *****

     185          195          205          215          225          235
1.  SAGLGAPGSC QTGAPTETVG GNTHLLYSWA GTAIQPTISV FGVTGATDTS TIPLVDPANA
2.  SAGLGAPGSC QTGAPTETVG GNTHLLYSWA GTAIQPTISV FGVTGATDTS TIPLVDPANA
    *****

     245          255          265          275          285          295
1.  LDPSTLALFG TGTVMVNRGS GQNDGVVSKC SALYGQVLST SYKWNHLDEI NQLLGVRGAN
2.  LDPSTLALFG TGTVMVNRGS GQNDGVVSKC SALYGQVLST SYKWNHLDEI NQLLGVRGAN
    *****

     305          315
1.  AEDPVAVIRT HANRLKLAGV
2.  AEDPVAVIRT HANRLKLAGV
    *****

```

Linha 1 e 2 (destacadas em azul) representam a seqüência deste trabalho e a obtida do banco de dados respectivamente. Os asteriscos indicam que os resíduos alinhados são iguais.

Com o alinhamento apresentado na Figura 37, observou-se que não houve nenhuma alteração na seqüência de aminoácidos da lipase utilizada neste trabalho, com a lipase de *B. cepacia* ATCC 21808, que já havia sido seqüenciada (KORDEL et al., 1991).

Além disso, com a seqüência obtida foi possível definir a presença da seqüência peptídeo sinal OmpA de *E. coli*, como mostrada na Figura 38.

FIGURA 38 – ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA PEPTÍDEO SINAL OmpA DE *Escherichia coli* COM A SEQÜÊNCIA PEPTÍDEO SINAL ENCONTRADA NO SEQUENCIAMENTO DO INSERTO *liphp*

```

                5           15
1.  MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A
2.  MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A
    ***** *

```

Legenda: linha 1 e 2 (destacadas em azul) representam a seqüência deste trabalho e a obtida do banco de dados respectivamente. Os asteriscos indicam que os resíduos alinhados são iguais.

Também foi seqüenciado o gene *hp* (ou *lif*) da proteína auxiliadora foldase. A seqüência obtida neste trabalho foi alinhada com a seqüência da foldase de *B. cepacia* ATCC 21808 que já havia sido publicada (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1999) (Figura 39).

FIGURA 39 - ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DA FOLDASE DE *B. cepacia* OBTIDA NESTE TRABALHO E UMA SEQÜÊNCIA DA MESMA PROTEÍNA DEPOSITADA NO GENBANK

```

                5           15           25           35           45           55
1.  MTAREGRAPL ARRAVYGVV GLAAIAGVAM WSGAGWHRGT GTAGELPDAA AAGGAAAAPP
2.  MTAREGRAPL ARCAVYGVV GLAAIAGVAM WSGAGWHRGT GTAGELPDAA AAGGAAAAPP
    ***** ** ***** ***** ***** ***** *****
                65           75           85           95           105          115
1.  QAALPASTGL PSSLAGSSAP RLPLDAGGHL AKSRAVRDFF DYCLTAQSDL SAAALDAFVV
2.  QAALPASTGL PSSLAGSSAP RLPLDAGGHL AKSRAVRDFF DYCLTAQSDL SAAALDAFVV
    ***** ***** ***** ***** ***** *****
                125          135          145          155          165          175
1.  RQIAAQLDGT VAQAEALDVW HRYRAYLDAL AKLRDAGAVD KSDLGALQLA LDQRASIAYR
2.  RQIAAQLDGT VAQAEALDVW HRYRAYLDAL AKLRDAGAVD KSDLGALQLA LDQRASIAYR
    ***** ***** ***** ***** ***** *****
                185          195          205          215          225          235
1.  TLGDWSQPFV GAEQWRQRYD LARLKIAQDR TLTDAQKAER LAALEQQMPA DERAAQQRVD
2.  TLGDWSQPFV GAEQWRQRYD LARLKIAQDR TLTDAQKAER LAALEQQMPA DERAAQQRVD

```

```

*****
          245          255          265          275          285          295
1.  QQRAAIDRIA  QLQKSGATPD  AMRAQLTQTL  GPEAAARVAQ  MQQDDASWQS  RYADYATQRA
2.  QQRAAIDRIA  QLQKSGATPD  AMRAQLTQTL  GPEAAARVAQ  MQQDDASWQS  RYADYATQRA
*****

          305          315          325          335
1.  QIESAGLSPQ  DRDAQIAALR  QRTFTKPGEA  VRAASLDRGA  GSAQ
2.  EIESAGLSPQ  DRDAQIAALR  QRTFTKPGEA  VRAASLDRGA  GSAQ
: *****

```

Legenda: linha 1 e 2 (destacadas em azul) representam a seqüência deste trabalho e a obtida do banco de dados respectivamente. Os asteriscos indicam que os resíduos alinhados são iguais.

Os resíduos destacados em vermelho, na Figura 39, indicam posições onde foram encontradas alterações entre a seqüência deste trabalho e a previamente depositada no GENBANK. Duas substituições foram encontradas em relação a seqüência feita por Quyen et al. (1999): C13R (uma arginina pela cisteína 13) e E301Q (uma glutamina pelo glutamato 301).

FIGURA 40 – ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DOS MUTANTES M5 E M6 COM A SEQUENCIA DA LIPASE E FOLDASE DETERMINADA NESTE TRABALHO

Mutante M5

```

WT 20  DKYAGVLEYWYGIQEDLQQR  40      WT 171  QAATYNQNYPSAGLGAPGSCQT  192
M5 20  DKYAGVLEYWCGIQEDLQQR  40      M5 171  QAATYNQNYPSAGLGAPGSCQT  192

```

Mutante M6

```

280 SYKWNHLDEINQLLGVIRGAN  300
280 SYKWNHLQINQLLGVIRGAN  300

```

Legenda: a linha denominada WT refere-se a seqüência da lipase e foldase determinada neste trabalho.

6 DISCUSSÃO

A discussão deste trabalho será feita relacionando-se os resultados mais relevantes, observados em cada tópico da seção de Resultados.

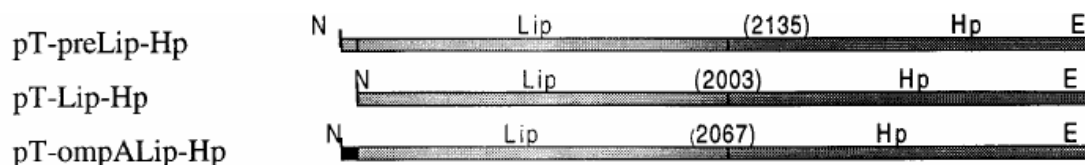
6.1 VETOR DE EXPRESSÃO pT-ompA-LipHp

Os resultados da análise de restrição mostraram que de fato o operon *liphp* estava flanqueado por dois sítios *NdeI* e *EcoRI*, conforme descrito por QUYEN, SCHMITD-DANNERT e SCHMID (1999). Estes autores haviam descrito que um bom nível de atividade lipolítica só foi alcançado quando o gene *lip* foi fusionando à seqüência líder *ompA*. Por exemplo, foi relatado que a atividade lipolítica por grama de células era de 293 U/g quando a lipase foi superexpressa a partir do plasmídeo pT-preLip-Hp, que continha a seqüência líder original da lipase de *B. cepacia*. No entanto, quando a seqüência líder da lipase foi substituída pela OmpA de *E. coli*, a atividade obtida foi de 547 U/g de células, mostrando uma maior eficiência na expressão da enzima ativa. Além disso, análises de eletroforese desnaturante mostravam que, com a seqüência líder original da enzima, menos de 1 % da lipase era expressa, enquanto que com a seqüência líder *ompA*, cerca de 40 % da enzima foi expressa. Estes resultados justificaram a inserção da seqüência OmpA, pelo grupo do Prof. R. Schmid, para aumento da expressão da lipase de *B. cepacia*.

Segundo o trabalho de QUYEN, SCHMIDT-DANNERT e SCHMID (1999), foram feitas apenas três construções contendo o operon *liphp* com sítios *NdeI* e *EcoRI*. A primeira delas foi o plasmídeo descrito acima - pT-preLip-Hp; a segunda foi o plasmídeo pT-Lip-Hp sem seqüência líder e a última, o plasmídeo utilizado neste trabalho - pT-ompA-Lip-Hp.

Nestas três construções, o inserto contendo o operon *liphp* varia de tamanho, como mostrado na Figura 41.

FIGURA 41 – INSERTOS DE DIFERENTES PLASMÍDEOS CONSTRUÍDOS POR QUYEN, SCHMIDT-DANNERT e SCHMID (1999)



Pelos resultados da análise de restrição obtidos neste trabalho, a possibilidade do plasmídeo ser o pT-Lip-Hp foi descartada, restando apenas duas possibilidades. Como o ensaio utilizado por QUYEN, SCHMIDT-DANNERT e SCHMID (1999) para determinação da atividade lipolítica não foi igual ao utilizado neste trabalho, a comparação de atividade para definir qual o sistema de expressão estava sendo utilizado foi descartada. Além disso, não se dispunha de um plasmídeo controle, por exemplo, pT-preLip-Hp, para se fazer as comparações necessárias.

Sendo assim, a confirmação de que o plasmídeo inicialmente utilizado foi o pT-ompA-Lip-Hp deveria ser feita por sequenciamento do inserto e principalmente das regiões flangeadoras. Os resultados de alinhamento obtidos da seqüência peptídeo sinal obtida pelo sequenciamento de DNA confirmaram que o plasmídeo em questão tratava-se do pT-ompA-LipHp (Figura 38).

6.2 EXPRESSÃO DA LIPASE DE *B. cepacia* POR *E. coli*

A primeira parte deste tópico trata da expressão da lipase a partir do promotor λP_{RL} , que foi o promotor utilizado na construção do plasmídeo pT-ompA-Lip-Hp. Este é um promotor conhecido pela indução a partir da desnaturação térmica do repressor cIst857. Vários vetores de expressão já foram construídos usando este promotor (REMAUT; STANSSENS; FIERS, 1979). De fato, o promotor é composto por duas partes, sendo elas: a) o repressor cIst857 e b) um sítio de ligação para RNA polimerase. Quando expresso, o repressor cIst857 liga-se ao sítio de reconhecimento da RNA polimerase, impedindo que a enzima inicie a transcrição. Quando a cultura é aquecida a 42 °C, o repressor é desnaturado e perde a capacidade de se ligar a este sítio, permitindo, portanto, que a RNA polimerase inicie a transcrição (REMAUT;

STANSSENS; FIERS, 1979). Este promotor é conhecido por induzir fortemente a transcrição e, também, por ser de fácil controle em cultivos submersos. Em se tratando de sistemas heterólogos, o controle muitas vezes precisa ser preciso, pois o produto da expressão pode ter propriedades tóxicas ao hospedeiro ou mesmo se agregar no interior da célula, levando a danos celulares (GLICK, 1995). No intuito de observar o efeito da expressão em *E. coli*, três estirpes foram testadas. A estirpe *E. coli* XL-1 Blue mostrou o melhor desempenho, sendo que a atividade lipolítica alcançada foi mais de 50 % da obtida com as outras duas estirpes. Com estes resultados, pôde-se confirmar que uma proteína de 33 kDa estava sendo superexpressa, e que provavelmente fosse a responsável pela atividade lipolítica na cultura. Além disso, coletando apenas o sobrenadante da cultura, livre de células, nenhuma atividade lipolítica foi observada. Acredita-se que a maior parte da lipase expressa tenha formado corpos de inclusão no interior das células, e que apenas uma pequena parte tenha sido excretada para o periplasma e conseguiu ser devidamente dobrada pela foldase. Como descritas por ROSENAU e JAEGER (2000), as lipases de *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *B. glumae* e *Acinetobacter calcoaceticus* são secretadas para o espaço intermembranas através de transportadores do tipo *Secreton-mediated* (Sec). Os sistemas Sec são complexos protéicos que são capazes de reconhecer as seqüências peptídicas sinais e enviar as proteínas para o espaço intermembranas (ROSENAU; JAEGER, 2000). Em *E. coli*, este sistema foi relatado como um complexo de proteínas multimérico contendo um dímero solúvel da proteína SecA e um complexo construído com as proteínas SecY, E, D, G e F envolto pela membrana interna (DUONG et al., 1997). Um sistema similar já foi descrito em espécies de *Bacillus* (ROSENAU; JAEGER, 2000). Em espécies de *Pseudomonas*, a presença de proteínas do tipo Sec foi descrita por MA et al. (2003), a partir de análises dos genomas das bactérias *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*. Apesar do sistema ser composto da mesma maneira que em *E. coli*, os autores não fizeram uma comparação da seqüência primária das proteínas de ambos sistemas MA et al. (2003). Portanto, ainda não é claro se há alguma diferença em todos, ou ao menos em um dos componentes do complexo Sec de *B. cepacia*, que pudesse levar a uma redução da eficiência de transporte da lipase para o periplasma. DUONG et al. (1997) sugeriram, além da presença das proteínas do complexo Sec, o

envolvimento de algumas chaperonas no mecanismo de translocação de proteínas, do citoplasma para o periplasma. Para o sistema de expressão das lipases de *Pseudomonas*, já foi descrita a presença da foldase durante a translocação da lipase. Sugere-se que esta proteína seja similar a alguma chaperona. Uma segunda hipótese seria que algum componente além do complexo Sec não esteja presente em *E. coli*, ou mesmo, que esteja presente em pequenas quantidades, reduzindo a capacidade de translocação da lipase para o periplasma. De fato, QUYEN, SCHMIDT-DANNERT e SCHMID (1999) já relataram que, a partir do plasmídeo pT-ompA-Lip-Hp, a quantidade de foldase expressa foi muito reduzida. FRENKEN et al. (1993) mostraram que, mesmo em *P. glumae*, o nível de expressão da foldase foi baixo, sendo comparável ao obtido em *E. coli*. Portanto, é provável que a baixa expressão da foldase tenha levado a um baixo rendimento de atividade lipolítica em *E. coli*, pois quando a razão molar de lipase:foldase foi igual a 1:3, a atividade foi aumentada cerca de 8 vezes comparada quando a razão molar foi de apenas 1:0,1 (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1999)

Na célula de *B. cepacia*, para a lipase alcançar o meio extracelular, a enzima precisa ser transportada do periplasma, através da membrana externa, até o meio extracelular. O transportador que auxilia este processo é um complexo de 14 proteínas denominado Xcp (ROSENAU; JAEGER, 2000). Este complexo liga a membrana interna e a externa formando um poro para o trânsito das proteínas. Este sistema já foi descrito em *P. aeruginosa* (FILLOUX; MICHEL; BALLY, 1998) e *P. alcaligenes* (GERRITSE et al., 1998). Apesar de não ter sido estudado em *B. cepacia*, acredita-se que, pela conservação evolucionária deste sistema em Gram-negativos, *B. cepacia* também utilize o sistema Xcp para secreção (ROSENAU; JAEGER, 2000).

REETZ e JAEGER (1998) sugeriram que, embora seja aparentemente fácil superexpressar genes de lipases de *Pseudomonas* e *Burkholderia* em *E. coli*, a maioria da proteína expressa é internalizada como corpos de inclusão inativos e somente por tratamento com a foldase podem ser renaturados. Um sistema de co-expressão de duas cópias da foldase de *P. aeruginosa* a partir de dois promotores distintos, o λP_{RL} e o T7, aumentaram a eficiência da expressão da lipase tanto em *E. coli* quanto em *P. aeruginosa* (REETZ; JAEGER, 1998).

Os resultados desta dissertação mostraram que apenas a substituição do promotor λP_{RL} pelo promotor T7 levou a um aumento de atividade volumétrica igual a 6 vezes. Este aumento poderia ser justificado pela expressão de uma maior quantidade da foldase, levando com isto a uma maior taxa de dobramento da lipase inicialmente expressa (Figura 21 A). O que mais ressalta este resultado é o fato de QUYEN, SCHMIDT-DANNERT e SCHMID (1999) não terem encontrado nenhuma atividade quando tentaram expressar a lipase de *B. cepacia* a partir de uma construção com pET20b (+), no qual a expressão da enzima está sob controle do promotor RNA polimerase do fago T7. Os autores não discutem a razão de não terem observado atividade lipolítica quando tentaram expressar a enzima usando pET-20b (+). Ambos os plasmídeos, pET-20b (+) e p-ET29a (+) (utilizado para subclonagem neste trabalho), têm os sítios de policlonagem semelhantes, com os mesmos sítios variando apenas a posição de cada um deles. No entanto, o pET-20b (+) possui uma seqüência peptídeo sinal *pelB* originária de *Erwinina carotovora*. Porém, esta seqüência está entre os sítios *NdeI* e *EcoRI* e deve ter sido retirada quando os autores subclonaram o inserto *ompAliphp* em pET-20b (+). Portanto, a distância do códon de início de transcrição dos genes para o promotor T7 difere apenas por cerca de 10 bases, não justificando a falta de atividade observada por QUYEN, SCHMIDT-DANNERT e SCHMID (1999).

Quanto ao ensaio de atividade, QUYEN, SCHMIDT-DANNERT e SCHMID (1993) determinaram a atividade a 60 °C, a temperatura ótima aparente para a lipase de *B. cepacia*, o que realmente indica a ausência de atividade quando a lipase foi expressa sob controle do promotor T7.

Outro item que se fez necessário abordar foi relacionado à toxicidade da lipase de *B. cepacia* à *E. coli*. Previamente, já foi relatado efeito tóxico da lipase de *Bacillus subtilis* quando expressa em *E. coli*. ACHARYA et al. (2004) relataram que a ação tóxica de LipA de *B. subtilis* reduziu a taxa de crescimento de *E. coli* drasticamente. Os autores só conseguiram amenizar a toxicidade, bem como a formação de corpos de inclusão, subclonando o gene *lipA* de *B. subtilis* em um plasmídeo de baixo número de cópias pJO290 que expressa a lipase sob controle do promotor *lac* (ACHARYA et al., 2004).

Os resultados desta dissertação mostraram que, quando a enzima foi expressa sob controle do promotor λP_{RL} , desde o início do cultivo não houve uma redução da taxa de crescimento da bactéria, nem mesmo foi observado algum tipo de lise celular. No entanto, quando a *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pMMS-1 foi cultivada em meio sólido na presença de 0,1 mmol.L⁻¹ de IPTG, nenhum crescimento foi observado (resultado não apresentado). Portanto, acredita-se que a expressão da lipase, em alto nível, desde o início do cultivo, pode levar a efeitos tóxicos que inibem o crescimento de *E. coli*.

Com os tópicos expostos a respeito da expressão da lipase em *E. coli*, pode-se concluir que este não é um sistema simples de expressão. Apesar do avanço que o trabalho de QUYEN, SCHMIDT-DANNERT e SCHMID (1999) trouxe para a recuperação da lipase de *B. cepacia* expressa em *E. coli*, possivelmente no futuro outras abordagens devam ser utilizadas para aumentar a eficiência da expressão desta enzima *in vivo*.

6.2.1 Expressão da Lipase de *B. cepacia* em Sistemas de 96 poços

A biblioteca de mutantes foi cultivada e a enzima expressa em microplacas de poliestireno com capacidade de 250 μ L. Também foram testadas placas tipo *deep well*; porém, a atividade lipolítica alcançada com este sistema foi mais baixa do que com as microplacas. Além disso, as placas *deep well* foram utilizadas com 1,25 mL de meio líquido, enquanto que as microplacas foram utilizadas com apenas 200 μ L e produziram uma atividade lipolítica maior.

As placas *deep well* são fabricadas com polipropileno, o que talvez possa ser uma barreira à transferência de calor para a cultura, impedindo que o promotor λP_{RL} induza eficientemente a expressão da enzima.

A construção do plasmídeo pMMS-1 foi feita no intuito de se avaliar a variação da expressão da lipase, a partir do promotor T7, em microplacas. O resultado obtido indicou que não houve uma redução da variação de expressão da enzima por este sistema. Apesar do promotor T7 ter produzido um valor de atividade superior, este sistema não foi utilizado para a triagem, pois além de não ter conseguido reduzir a

variação, a indução a partir deste sistema em microplacas mostrou-se mais laboriosa (Figura 22).

6.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS UTILIZADOS

Esta seção abordará os principais tópicos relacionados aos ensaios utilizados, entre eles as dificuldades e vantagens observadas.

6.3.1 Método de Hidrólise do pNPP

O primeiro método utilizado foi um método clássico conhecido como hidrólise do pNPP (*p*-nitrofenol palmitato). Este substrato é formado pela esterificação do ácido palmítico com o *p*-nitrofenol. O *p*-nitrofenol é um composto orgânico com caráter ácido, ou seja, na presença de uma base é capaz de perder um próton mantendo um oxigênio com o par eletrônico da ligação e negativamente carregado. Este átomo de oxigênio pode deslocar o par de elétrons formando estruturas de ressonância. Uma destas estruturas forma um dieno conjugado, que por sua vez possui forte coloração amarela em pH alcalino. Sendo assim, o éster de *p*-nitrofenila não possui cor, porém, quando é hidrolisado libera o cromóforo *p*-nitrofenol. Alguns autores discutem o fato deste substrato não ser um substrato natural para lipases (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Entretanto, este é um substrato indicado para ser usado na rotina para a determinação de atividade lipolítica, após se ter caracterizado a enzima como uma lipase. Outro método que até então era utilizado para a determinação de atividade lipolítica era o método titulométrico, que se baseia na titulação dos ácidos graxos liberados na reação. No entanto, este é um método laborioso que demanda mais tempo de ensaio, maiores volumes de meio reacional e maior nível de atividade lipolítica na amostra (BEISSON et al., 2000). Para ser usado na rotina, o método de hidrólise do pNPP apresenta as vantagens de ser rápido na execução e exigir volumes pequenos de meio reacional (de 200 μ L a 1 mL). Porém, o substrato precisa ser emulsionado com uma solução tamponada de um detergente, o que muitas vezes impede a perfeita reprodução do ensaio. Além disso, o pNPP é menos estável do que um triacilglicerol, o

que muitas vezes impede que ele seja utilizado para determinar a atividade em reações que demandem muito tempo. Apesar destas observações, a facilidade na execução do ensaio faz com que ele seja bem mais prático que o método titulométrico e o ideal para aplicação na triagem de grandes bibliotecas de mutantes.

O método de hidrólise do pNPP foi adaptado a escala de 200 μL com sucesso, fazendo com que este ensaio pudesse ser utilizado em microplacas (resultados obtidos por Nadia Krieger e Natalie Caillol, ainda não publicados). Como já foi mencionado na seção de Resultados, a adaptação de um ensaio para sistemas de 96 poços representa um ganho no rendimento analítico. No entanto, especialmente para este método, algumas observações precisaram ser feitas. Primeiramente, o método de hidrólise do pNPP foi desenvolvido para ser efetuado de forma cinética, ou seja, a absorvância do meio de reação é acompanhada em intervalos de tempo, ao longo da reação. Depois, os dados são coletados e um gráfico relacionando a absorvância com o tempo é construído. A regressão linear da reta obtida gerará um coeficiente angular, que representa a taxa de consumo do substrato por unidade de tempo. Entretanto, pensando em um sistema de 96 poços para uma reação de 60 s, coletando valores a cada 10 s, ter-se-ia ao fim da reação 672 valores para serem processados. Para equipamentos que geram relatórios automaticamente, na forma de planilhas eletrônicas, esta não é uma tarefa difícil. No entanto, no caso de leitores que geram relatórios somente por impressão dos resultados, a análise pode demandar mais tempo.

Há uma forma de se contornar este problema, que seria determinar a atividade usando somente um ponto, ou o que se chama de ponto final. Porém, quando se usa esta abordagem de determinação, é preciso levar em consideração a interferência dos demais componentes da reação. No modo cinético, este fato não se faz necessário, pois, teoricamente a absorvância dos componentes não se altera durante a reação. Então, acompanhando a reação desde o ponto inicial, qualquer alteração da absorvância será causada pela hidrólise do substrato.

No ensaio com ponto final, que foi aplicado na maior parte do trabalho, principalmente para triagem da biblioteca de mutantes, foram feitos controles do tampão de reação, do substrato e do meio de cultura com células.

O controle com tampão apresentou baixa absorvância a 415 nm, cerca de 0,06-0,08. O controle de substrato claramente dependeu da formação da emulsão de pNPP com o tampão de reação; os valores de absorvância iniciais a 415 nm variaram de 0,2-0,7. Acredita-se que, em valores acima de 0,5, havia uma certa hidrólise do substrato, pois visualmente, era possível detectar cor amarela no meio. Experimentos em que a absorvância inicial deste controle foi acima de 0,5 foram repetidos pelo motivo mencionado.

O meio de cultura contendo células também exibiu alguma absorvância a 415 nm. Os valores de absorvância iniciais a 415 nm variaram de 0,2-0,4.

Sendo assim, para poder determinar de fato a variação de absorvância da reação, os controles de tampão, substrato e meio com células foram subtraídos da absorvância obtida no ensaio. Sendo assim, o número de valores a serem processados para uma placa de 96 poços foi de 192, o que corresponde a 3,5 vezes menos do que o número de valores que teriam que ser analisados pelo método cinético.

Mesmo assim, o método cinético deve ser considerado como o mais apropriado para se determinar a atividade lipolítica, particularmente em estudos de caracterização cinética, pois através dele é possível determinar a velocidade inicial da reação.

Quanto à reprodutibilidade, o método de hidrólise do pNPP mostrou baixa variação quando a atividade lipolítica de uma mesma cultura foi determinada 88 vezes (Figura 17). No entanto, foi observado que uma mesma cultura pode ter o seu valor de atividade lipolítica alterado em função da formação da emulsão de pNPP (resultados não mostrados).

6.3.2 Método de Hidrólise do MUF-Butirato

A conjugação de moléculas orgânicas específicas a agentes fluorogêncios tem se mostrado uma abordagem viável para a determinação de atividade de várias enzimas de modo rápido e sensível (GODDARD; REYMOND, 2004). Especificamente para lipases e esterases, o substrato MUF-butirato tem sido sugerido como um importante substrato para a determinação da atividade lipolítica (PRIM et al., 2003).

Neste trabalho, foi sugerida a utilização deste substrato para quantificar a atividade lipolítica não pela fluorescência propriamente dita, mas sim por um sistema de detecção de luminosidade em imagens digitalizadas da reação. Este artifício foi possível, pois a hidrólise do MUF-butirato libera a metilumbeliferona, uma cumarina com forte fluorescência azul quando irradiada a 365 nm.

As imagens foram capturadas por uma câmera do tipo CCD (*charge-coupled device*). O CCD é um componente eletrônico retangular fabricado com silício, na escala de μm e segmentado em um arranjo de pequenas células sensíveis a luz, formando o que se chama de fotosítios (SWEEDLER et al., 1988). A imagem total é formada quando cada fotosítio recebe uma quantidade de luz emitida pela fonte.

A aplicação da câmera CCD para detecção da quantidade de luminosidade mostrou ser uma ferramenta precisa e bastante sensível para a determinação da atividade lipolítica, associada à hidrólise do MUF-butirato (Figuras 31, 32 e 33). Como já são conhecidas da literatura, as reações com substratos fluorogênicos são capazes de detectar baixos níveis de atividade lipolítica quando se mede a fluorescência gerada (BEISSON et al., 2000).

Os resultados apresentados mostraram que foi possível determinar a atividade de amostras com quantidades reduzidas de enzima ($0,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ proteína total; 0,065 U no ensaio, como determinado pelo método de hidrólise do pNPP).

Além das vantagens apresentadas para o ensaio em microplacas, a abordagem apresentada para determinação de atividade, utilizando diretamente colônias de *E. coli*, também pode aumentar significativamente o rendimento analítico. Com estes resultados, foi mostrado que além das colônias de *E. coli* gerarem um *background* natural, quando em contato com o MUF-butirato, a estratégia empregada foi capaz de eliminar este *background*. Assim, um método mais seguro para a determinação da atividade lipolítica de colônias crescendo em meio sólido foi desenvolvido.

Apesar de não ter sido testado neste trabalho, a transferência das colônias para um suporte, tal como papel filtro ou membranas de *nylon*, possibilita a seleção de lipases mutantes estáveis em solventes não-polares, uma estratégia que não vem sendo empregada devido à imiscibilidade destes solventes em água.

6.4 SELEÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES AO DMF

Aplicando-se o ensaio de hidrólise do MUF-butirato acoplado à captura de imagens das placas, tentou-se selecionar um mutante com maior estabilidade ao DMF. No primeiro *screening* realizado, observou-se que com 3 h de incubação, em DMF 80 % (v:v) em água, a lipase selvagem perdia cerca de 80 % da sua atividade inicial. Estes ensaios foram feitos a partir de cultivos em microplacas. Portanto, uma concentração menor de enzima era esperada, já que os resultados mostraram uma redução da expressão da enzima neste sistema (Figuras 13 e 18). Quando os candidatos foram confirmados, o cultivo e a indução foram realizados em frascos de vidro, e quando amostras obtidas desta forma foram analisadas, os resultados mostraram que a ação do DMF diminuiu em apenas 50 % a atividade lipolítica após 3 h de incubação, e mesmo após 9 h de incubação, a atividade residual estava em torno de 35 %. Com isso, sugere-se que a quantidade de enzima interferiu na taxa de desnaturação.

Mesmo quando o tempo de incubação em DMF foi aumentado, não foi observada maior estabilidade por parte dos candidatos. Apenas o candidato M12 apresentou 11 % mais atividade residual que a lipase selvagem. Porém, quando este candidato foi novamente analisado, apresentou 2 % menos atividade residual em DMF 80 % que a lipase selvagem, mostrando que este candidato não possuía uma maior estabilidade nesta condição.

Apesar de não ter sido selecionado até o momento nenhum mutante com atividade diferenciada em DMF 80 %, acredita-se que com o método de *screening* desenvolvido, será possível selecionar mutantes mais estáveis. Os fatores que podem ter impedido que esta seleção tivesse sido feita com sucesso, provavelmente tenham sido o número de colônias analisadas e também a frequência de mutação do sistema utilizado. Para selecionar um mutante com propriedade tão específica, uma biblioteca maior de mutantes teria que ser analisada. Os trabalhos da literatura que apontam sucesso na aplicação de evolução dirigida têm analisado bibliotecas entre 5.000 e 10.000 colônias. O número de colônias que foi avaliado neste trabalho representa apenas 3,64 % de uma biblioteca de 10.000 candidatos. Portanto, há uma grande

expectativa que, quanto maior o número de colônias analisadas, maior a probabilidade de se resgatar o mutante de interesse.

REETZ (2002) discutiu a relação entre o número de colônias analisadas e o sucesso para obtenção de mutantes. Por exemplo, para a lipase de *P. aeruginosa*, que possui 285 aminoácidos, o número de variantes para randomização completa desta enzima é igual a 20^{285} , um número absurdamente grande que, com os recursos disponíveis, é impossível de ser analisado.

No entanto, existem métodos que podem auxiliar no cálculo do número de colônias que precisam ser analisadas para obtenção de uma certa porção de mutantes. No caso da lipase de *B. cepacia*, selecionando uma substituição de um aminoácido por qualquer um dos outros 19 aminoácidos possíveis, em qualquer posição da proteína, tem-se a seguinte equação:

$$N = 19M \times 320! / [(320-M)!M!]$$

onde:

M = número de substituições por enzima;

N = número de enzimas variantes esperadas.

Para um M=1, uma população de 6.090 enzimas variantes seria esperada. Mas, como o código genético é degenerado, não se espera que uma biblioteca com apenas 6090 contenha todas as variantes. Se aumentarmos o M para 2 o número da população esperada é de 14 milhões.

REETZ (2002) utilizou um sistema de *error prone* PCR com baixa taxa de mutagênese, cerca de 1 a 2 bases alteradas por 1.000 pares de base amplificados, para aumentar a enantiosseletividade da lipase de *P. aeruginosa*. Porém, uma grande melhora só foi encontrada quando outras técnicas foram associadas à mutagênese randômica, como DNA *shuffling* e mutagênese combinatória. De fato, neste caso, os primeiros ciclos de mutagênese randômica serviram apenas para identificar quais sítios de mutação retornaram aumentos na enantiosseletividade.

Outra técnica para geração de bibliotecas de mutantes via PCR é a utilização de análogos de trifosfatos nucleosídeos, tal como o dPTP e oxo-8-dGTP (ZACCOLO et

al., 1996). Nesta técnica, o gene selvagem primeiramente é amplificado na presença dos nucleotídeos análogos. O produto amplificado, que contém o nucleotídeo análogo na sua cadeia, é agora amplificado na presença dos quatro nucleotídeos normais (dNTPs). Assim, na posição onde o nucleotídeo análogo foi inserido, agora entrará um dos quatro nucleotídeos normais da cadeia, fazendo uma randomização da seqüência inicial. Aplicando esta técnica também foi possível controlar a taxa de mutagênese em níveis de 5 a 15 mutações por gene (CESARO-TADIC et al., 2003).

A utilização de variantes da técnica de PCR tem sido amplamente aplicada para mutagênese randômica, principalmente pela possibilidade de controle da taxa de mutação, como mencionado acima. Porém, etapas posteriores de restrição das extremidades do gene amplificado e de ligação no vetor de expressão de escolha poderiam representar certas desvantagens, quando comparada a mutagênese em uma estirpe mutagênica como a *E. coli* XL-1 Red.

Esta estirpe foi construída para ter uma baixa capacidade revisora da replicação de DNA. Sendo assim, para mutagenizar um gene utilizando esta estirpe, é necessário apenas transformá-la e cultivá-la durante determinado período de tempo. Após o cultivo, os plasmídeos mutagenizados são purificados e retransformados em uma estirpe hospedeira como *E. coli* XL-1 Blue. Portanto, há uma simplificação de etapas, que torna a geração da biblioteca de mutantes mais rápida. Porém, não se pode dizer que seja mais eficiente, pois as mutações podem ser feitas em qualquer região do plasmídeo ou do genoma da bactéria. Quando se trabalha com uma técnica de PCR, a mutagênese pode ser planejada somente na região do gene, ou ainda, em uma região interna do gene, como um domínio conservado ou uma região localizada próxima do sítio ativo.

Além deste fato, a mutagênese com estirpes bacterianas pode levar a mutantes inviáveis, como mutantes que percam a marca de resistência a antibióticos ou que tenham a origem de replicação do plasmídeo alterada. Portanto, mesmo se existir alguma mutação no gene de interesse, ela não poderá ser analisada pois o plasmídeo não será replicado.

Apesar dos fatores apresentados, alguns trabalhos já aplicaram a estirpe *E. coli* XL-1 Red e conseguiram selecionar mutantes de interesse (ALEXEEVA et al., 2002),

(HORSMAN et al., 2003). Mas, em nenhum destes trabalhos foi determinada a frequência de mutagênese do sistema. Sem conhecer a frequência de mutagênese é difícil poder determinar, com precisão, o tamanho da biblioteca que precisa ser analisada para abranger pelo menos uma parte dos mutantes gerados.

6.5 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

As seqüências de DNA obtidas foram traduzidas e comparadas com a seqüência da lipase de *B. cepacia* ATCC 21808 (KORDEL et al., 1991) e da proteína auxiliadora (foldase) (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1999). A seqüência da lipase foi 100 % homóloga com a seqüência previamente determinada por KORDEL et al. (1991). Porém, quando a seqüência da foldase foi alinhada com a seqüência depositada no GENBANK, duas alterações foram verificadas (Figura 39).

Analizando esta mesma seqüência da foldase frente a outras 6 seqüências da mesma proteína, de diferentes estirpes de *Burkholderia*, observou-se que na posição 13 e 301 estavam presentes os aminoácidos arginina e glutamato, respectivamente.

O mutante que, apresentou redução na sua atividade lipolítica (Figura 27), foi seqüenciado mostrando uma mutação: Y31C (Figura 40). Este resíduo está localizado no começo da alfa-hélice 1 e também faz parte dos resíduos que formam a parede da fenda catalítica (SCHRAG et al., 1997). Estes resíduos são importantes para a estrutura da lipase, tendo em vista que, durante o processo de catálise a interação das cadeias laterais destes aminoácidos com o substrato orientam a colocação do mesmo no sítio ativo. O mutante M6 não apresentou atividade lipolítica e, após o seu seqüenciamento foi determinada uma mutação na posição 289 (E289Q) (Figura 27 e 40). Na lipase selvagem, na posição 288 há um resíduo de aspartato que participa da coordenação com o íon Ca^{2+} . Este é um sítio que já foi descrito em diferentes lipases e que possui uma função de estabilização para a proteína (SCHRAG et al., 1997).

7 CONCLUSÃO

A aplicação de lipases em processos biotecnológicos é ampla e tende aumentar. No entanto, algumas condições de processo diferem das condições encontradas naturalmente para a catálise, como, por exemplo, a temperatura, o pH, a salinidade, a presença de solventes orgânicos, a pressão, entre outros. Por este motivo, há uma crescente pesquisa na área de evolução dirigida que pretende modificar enzimas para torná-las mais eficientes em condições reais de processo. Esta dissertação trouxe algumas contribuições para esta área e também para o desenvolvimento de *screening* de lipases. Sendo assim, as principais conclusões deste trabalho são:

I) Evolução Dirigida:

a) A técnica de evolução dirigida foi desenvolvida e possibilitou a obtenção de uma biblioteca de mutantes da lipase de *B. cepacia*.

b) Não foi possível determinar a frequência de mutação.

c) Analisando a biblioteca gerada, dois candidatos apresentaram grande redução da atividade lipolítica. O mutante M5 apresentou a mutação Y31C e o mutante M6 E289Q.

II) Expressão da lipase de *B. cepacia* em sistemas de 96 poços

a) A melhor condição foi obtida com microplacas, com choque a 42 °C e cultivo a 37 °C. Porém, em todos os experimentos propostos, foi observada uma grande variação de atividade.

b) quando o inserto *ompAliphp* foi subclonado em pET-29a (+), a superexpressão apresentou maior atividade lipolítica comparada com o sistema controlado pelo promotor λP_{RL} . Porém, a variação de atividade continuou presente quando a expressão da enzima foi avaliada em sistemas de 96 poços.

III) Técnica de *screening*

Um método para determinação de atividade lipolítica com culturas líquidas e colônias bacterianas foi otimizado. Aplicando o substrato fluorogênico MUF-butirato e a captura de imagens dos ensaios, foi possível aumentar o rendimento analítico e também eliminar algumas desvantagens em relação ao método do pNPP.

IV) Obtenção de Mutantes com Propriedades Melhoradas

Não foram encontradas lipases com propriedades melhoradas dentre os mutantes submetidos ao *screening* de estabilidade em DMF 80 % em água (v:v).

Como perspectivas, no futuro pensa-se em otimizar outras metodologias de mutagênese (via PCR) no futuro, como as mencionadas na Discussão deste trabalho. Estas técnicas, além de terem um controle da taxa de mutagênese mais preciso, possibilitarão o direcionamento das mutações para regiões de maior interesse (p.ex.: regiões próximas do sítio ativo e região de interação com o substrato). Os mutantes gerados por estas técnicas seriam selecionados pelo método de *screening* gerado neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, A.; BRENNAN, E.; FUGANTI C.; GATTI, F.G.; SERRA, S. Lipase-catalysed preparation of enantiomerically enriched odorants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 32, n. 1-2, p. 33-51, 2004.

ACHARYA, P.; RAJAKUMARA, E.; SANKARANARAYANAN, R.; RAO, N.M. Structural Basis of Selection and Thermostability of Laboratory Evolved *Bacillus subtilis* Lipase. **Journal of Molecular Biology**. v. 341, n. 5, p. 1271-1281, 2004.

ALEXEEVA, M.; ENRIGHT, A.; DAWSON, M.J.; MAHMOUDIAN, M.; TURNER, N.J.; Deracemization of α -methylbenzylamine using an enzyme obtained by in vitro evolution. **Angewandte Chemie International Edition English**. v. 41, n. 17, p. 3177-3180, 2002

AMANO ENZYMES. Disponível em: <http://www.amano-enzyme.co.jp/pdf/cat_synthe_LPSA_30_e.pdf> Acesso em 19 jan. 2005.

ARNOLD, F.H. Engineering enzymes for non-aqueous solvents. **Trends in Biotechnology**. v. 8, p. 244-249, 1990.

ARNOLD, F.H. Directed evolution: creating biocatalysts for the future. **Chemical Engineering Science**. v. 51, n. 23, p. 5091-5102, 1996.

ARNOLD, F.H. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. **Nature**. v. 409, n. 6817, p. 253-257, 2001.

ARPIGNY, J.L.; JAEGER, K.E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*. v. 343, n. 1, p. 177-183, 1999.

ATLAS, R. M. Handbook of Microbiological Media. 2. edição. Boca Raton: CRC Press, 1996.

ATHAWALE, V.; MANJREKAR, N.; ATHAWALE, M. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by *Pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of (\pm)-menthol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 16, n. 3-4, p. 169-173, 2001.

BASF BIOTECHNOLOGY. Disponível em :<<http://www.corporate.basf.com/en/produkte/biotech/biokatalyse/>> Acesso em: 17 jan. 2005.

BELEV, T. N.; SINGH, M.; McCARTHY, J.E.G. A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*. **Plasmid**. v. 26, n. 2, p. 147-150, 1991.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 102, n. 2, p. 133-153, 2000.

BORNSCHEUER, U.T.; ALTENBUCHNER, J.; MEYER, H.H. Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. **Bioorganic and Medical Chemistry**. v. 7, n. 10, p. 2169-2173, 1999.

BORNSCHEUER, U.T.; POHL, M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 5, n. 2, p. 137-143, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRYAN, P.N. Protein engineering. **Biotechnology Advances**. v. 5, n. 2, p. 221-234, 1987.

CESARO-TADIC, S.; LAGOS, D.; HONEGGER, A.; RICKARD, J.H.; PARTRIDGE, L.J.; BLACKBURN, G.M.; PLÜCKTHUN, A. Turnover-based *in vitro* selection and evolution of biocatalysts from a fully synthetic antibody library. **Nature Biotechnology**. v. 21, n. 6, p. 679-685, 2003.

CHEN, K.; ARNOLD, F. H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 90, n. 12, p. 5618-5622, 1993.

CRICK, F.H.C. The origin of the genetic code. **Journal of Molecular Biology**. v. 38, n. 3, p. 367-379, 1968.

DÖRMO, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U.; GUBICZA, L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**. v. 21, n. 3, p. 229-234, 2004.

DUONG, F.; EICHER, J.; PRICE, A.; LEONARD, M.R.; WICKNER, W. Biogenesis of the Gram-Negative Bacterial Envelope. **Cell**. v. 91, n. 5, p. 567-573, 1997.

FARINAS, E.T.; BULTER, T.; ARNOLD, F.H. Directed enzyme evolution. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 12, n. 6, p. 545-551, 2001.

FILLOUX, A.; MICHEL, G.; BALLY, M. GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 22, n. 3, p. 177-198, 1998

FRANCES H. ARNOLD RESEARCH GROUP. Disponível em: <<http://cheme.che.caltech.edu/groups/fha/>> Acesso em: 19 jan. 2005.

FRENKEN, L.G.J.; BOS, J.W.; VISSER, C.; MULLER, W.; TOMMASSEN, J.; VERRIPS, C.T. An accessory gene, lipB, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. **Molecular Microbiology**. v. 9, n. 3, p. 579–589, 1993

GERRITSE, G.; URE, R.; BIZOULLIER, F.; QUAX, W.J. The phenotype enhancement method identifies the Xcp outer membrane secretion machinery from *Pseudomonas alcaligenes* as a bottleneck for lipase production. **Journal of Biotechnology**. v. 64, n. 1, p. 23-28, 1998.

GIVER, L.; GERSHENSON, A.; FRESKGARD, P.O.; ARNOLD, F.H. Directed evolution of a thermostable esterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 95, n. 22, p. 12809-12813, 1998.

GLICK, B.R. Metabolic load and heterologous gene expression. **Biotechnology Advances**. v. 13, n. 2, p. 247-261, 1995.

GODDARD, J.P.; REYMOND, J.L.; Enzyme assays for high throughput screening. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 15, n. 4, p. 314-322, 2004.

HORSMAN, G.P.; LIU, A.M.F.; HENKE, E.; BORNSCHEUER, U.T.; KAZLAUSKAS, R.J.; Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* esterase towards methyl 3-bromo-2-methylpropanoate and ethyl 3-phenylbutyrate. **Chemistry – A European Journal**. v. 9, n. 9, p. 1933-1939, 2003.

HUANG X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. **Genomics**. v. 14, n. 1, p. 18-25, 1992.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**. v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

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

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JANSSEN, D.B. Evolving haloalkane dehalogenases. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 8, n. 150-159, p. 150-159, 2004.

JØRGENSEN, S.; SKOV, K.W.; DIDERICHSEN, B. Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in

heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. **Journal of Bacteriology**. v. 173, n. 2, p. 559-567, 1991.

JUNG, H.C.; KO, S.; JU, S.J.; KIM, E.J.; KIM, M.K.; PAN, J.G. Bacterial cell surface display of lipase and its randomly mutated library facilitates high-throughput screening of mutants showing higher specific activities. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 26, n. 3-6, p. 177-184, 2003.

JUNOP, M. S.; YANG, W.; FUNCHAIN, P.; CLENDENIN, W.; MILLER, J. H. In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH Mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. **DNA Repair**. v. 2, n. 4, p. 387 – 405, 2003.

KARGER, A.E.; HARRIS, J.M.; GESTELAND, R.F. Multiwavelength fluorescence detection for DNA sequencing using capillary electrophoresis. **Nucleic Acid Research**. v. 19, n. 18, p. 4955-4962, 1991.

KAZLAUSKAS, R.J. Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 4, n. 1, p. 81-88, 2000.

KIM, D.Y.; DORDICK, J.S. Combinatorial array-based enzymatic polyester synthesis. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 76, n. 3, p. 200-206, 2001.

KIM, K.K.; SONG, H.K.; SHIN, D.H.; HWANG, K.Y.; SUH, 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, n. 2, p. 173-185, 1997.

KLIBANOV, A.M. Improving enzymes by using them in organic chemistry. **Nature**. v. 409, n. 6817, p. 241-246, 2001.

KOGA, Y.; KATO, K.; NAKANO, H.; YAMANE, T.; Inverting Enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* KWI-56 Lipase by Combinatorial Mutation and High-throughput Screening Using Single-molecule PCR and In Vitro Expression. **Journal of Molecular Biology**. v. 331, n. 3, p. 585 – 592, 2003.

KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHMID, R.D. Extracellular Lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Data. **Journal of Bacteriology**. v. 173, n. 15, p. 4836-4841, 1991.

KOUKER, G.; JAEGER, K-E.; Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.
KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; de LIMA, V.M.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**. v. 42, n. 4, p. 279-286, 2004.

KRISHNA, S.H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnology Advances**. v. 20, n. 3-4, p. 239-267. 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, n. 5259, p. 680– 685. 1970.

LUTZ, S.; PATRICK, W.M. Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 15, n. 4, p. 291-297, 2004.

MA, Q.; ZHAI, Y.; SCHNEIDER, J.C.; RAMSEIER, T.M.; SAIER JR., M.H. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**. v. 1611, n. 1-2, p. 223-233, 2003.

MASSIAH, M. A.; SARASWAT, V.; AZURMENDI, H. F.; MILDVAN, A. S.; Solution structure, mutagenesis, and NH exchange studies of the MutT enzyme–Mg²⁺-8-oxo-dGMP complex. **Journal of Molecular Structure**. v. 700, n. 1-3, p. 247-254, 2004.

MATSUMOTO, T.; TAKAHASHI, S.; KAIEDA, M.; UEDA, M.; TANAKA, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 57, n. 4, p. 515-520, 2001.

MELLOU, F.; LAZARI, D.; SKAL TSA, H.; TSELEPIS, A.D.; KOLISIS, F.N.; STAMATIS, H. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. **Journal of Biotechnology**. 2005. Aceito para publicação.

MOGK, A.; TOMOYASU, T.; GOLOUBINOFF, P.; RÜDIGER, S.; RÖDER, D.; LANGEN, H.; BUKAU, B. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. **EMBO Journal**. v. 18, n. 24, p. 6934-6949, 1999.

MOLECULAR PROBES – INVITROGEN DETECTION TECHNOLOGIES. Handbook of fluorescent probes and research products. Disponível em: <<http://www.probes.com/handbook/>> Acesso em: 30 nov. 2004.

MOORE, J. C.; ARNOLD, F. H.; Directed evolution of a *para*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. **Nature Biotechnology**. v. 14, n. 4, p. 458-467, 1996.

NAKI, D.; PAECH, C.; GANSHAW, G.; SCHELLENBERGER, V. Selection of a subtilisin-hyperproducing *Bacillus* in a highly structured environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 49, n. 3, p. 290-294. 1998.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3. edição. New York: Worth Publishers, 2000.

NESS, J.E.; WELCH, M.; GIVER, L.; BUENO, M.; CHERRY, J.R.; BORCHERT, T.V. DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. **Nature Biotechnology**. v. 17, n. 9, p. 893-896. 1999.

NOSOH, Y.; SEKIGUCHI, T. Protein engineering for thermostability. **Trends in Biotechnology**. v. 8, p. 16-20, 1990.

NOVOZYMES. Disponível em: <<http://www.novozymes.com/cgi-bin/bvisapi.dll/solutions/solutions.jsp>> Acesso em: 27 jan. 2005.

OLLIS, D.L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.M.; HAREL, M.; REMINGTON, S.J.; SILMAN, I.; SCHRAG J. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering Design and Selection**. v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

ONO, M.; SUZUKI, K.; TANIKAWA, S.; AKITA, H. First synthesis of (+)- and (-)-elvirol based on an enzymatic function. **Tetrahedron Asymmetry**. v. 12, n.18, p. 2597-2604, 2001.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 4, p. 367-375, 2002.

OVES, D.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; FERNÁNDEZ, S.; FERRERO, M.; GOTOR, V. Regioselective enzymatic syntheses of C-3 and C-5 carbonate A-ring stereoisomeric precursors of vitamin D. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 15, n. 18, p. 2881-2887, 2004.

PAIZS, C.; TÄHTINEN, P.; TOSA, M.; MAJDIK, C.; IRIMIE, F.; KANERVA, L.T. Biocatalytic enantioselective preparation of phenothiazine-based cyanohydrin acetates: kinetic and dynamic kinetic resolution. **Tetrahedron**. v. 60, n. 46, p. 10533-10540, 2004.

PRIM, N.; SÁNCHEZ, M.; RUIZ, C.; PASTOR F.I.J.; DIAZ, PILAR. Use of methylumbeliferyl – derivative substrates for lipase activity characterization. **Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic**. v. 22, n. 5-6, p. 339-346, 2003.

PARK, S.; MORLEY, K.L.; HORSMAN, G.P.; HOLMQUIST, M.; HULT, K.; KAZLAUSKAS, R.J. Focusing Mutations into the *P. fluorescens* Esterase Binding Site Increases Enantioselectivity More Effectively than Distant Mutations. **Chemistry&Biology**. v. 12, n. 1, p. 45-54, 2005.

PHILIPS, T.A.; VAN BOGELEN, R.A.; NEIDHARDT, F.C. *lon* gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. **Journal of Bacteriology**. v. 159, n. 1, p. 283-287, 1984.

QUYEN, D.T.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R.D. High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 2, p. 787-794, 1999.

RAMOS, H.J.O. Construção de plasmídeos para marcação molecular em estudos de interação planta – microrganismo e para contenção biológica de bactérias transgênicas. **Tese de Doutorado**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, 2002.

REETZ, M.T.; ZONTA, A.; SCHIMOSSEK, K.; LIEBETON, K.; JAEGER, K.E. Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution. **Angewandte Chemie International Edition English**. v. 36, n. 24, p. 2830-2832, 1997.

REETZ, M. T.; JAEGER, K.E. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 93, n. 1-2, p. 3-14, 1998.

REETZ, M. T. Directed evolution of selective enzymes and hybrid catalysts. **Tetrahedron**. v. 58, n. 32, p. 6595 – 6602, 2002.

REMAUT, E.; STANSSENS, P.; FIERS, W. Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the PL promoter of coliphage lambda. **Gene**. v. 15, n. 1, p. 81-93, 1979.

ROSENAU, F.; JAEGER, K.E.; Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. **Biochimie**. v. 82, n. 11, p. 1023-1032, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULDON, A.R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHEUERMANN, R.; TAM, S.; BURGERS, P. M. J.; LU, C.; ECHOLS, H.; Identification of the ϵ -Subunit of *Escherichia coli* DNA Polymerase III Holoenzyme as the *dnaQ* Gene Product: A Fidelity Subunit for DNA Replication. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America. v. 80, n. 23, p. 7085-7089, 1983.

SCHMID, A.; DORDICK, J.S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature.** v. 409, n. 6817, p. 258-268, 2001.

SCHMID, A.; HOLLMANN, F.; PARK, J.B.; BÜHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Current Opinion in Biotechnology,** v. 13, n. 4, p. 359-366, 2002.

SCHOEMAKER, H.E.; MINK, D.; WUBBOLTS, M.G. Dispelling the Myths—Biocatalysis in Industrial Synthesis. **Science.** v. 299, n. 5613, p. 1694-1697. 2003.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; CYGLER, M.; LANG, D.; BURGDORF, T.; HECHT, H.J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T.J.; OLIVER, J.D.; STRICKLAND, L.C.; DUNAWAY, C.M.; LARSON, S.B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure.** v. 5, n. 12, p. 187-202, 1997.

SCHWAB, S. Caracterização parcial dos elementos em cis responsáveis pela regulação da expressão do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae*. **Dissertação de Mestrado,** Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, 2002.

SHIBATANI, T.; OMORI, K.; AKATSUKA, H.; KAWAI, E.; MATSUMAE, H. Enzymatic resolution of diltiazem intermediate by *Serratia marcescens* lipase: molecular mechanism of lipase secretion and its industrial application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** v. 10, n. 1-3, p. 141-149. 2000.

SIGMUND, A.E.; HONG, W.; SHAPIRO, R.; DICOSIMO, R. Chemoenzymatic synthesis of *cis*-4-hydroxy-D-proline. **Advanced Synthesis&Catalysis.** v. 343, n. 6-7, p. 587-590. 2001.

SMITH, M. In vitro mutagenesis. **Annual Review of Genetics.** v. 19, p. 423-462, 1985.

SONG, J.K.; RHEE, J.S.; Enhancement of stability and activity of phospholipase A₁ in organic solvents by directed evolution. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.** v. 1547, n. 2, p. 370-378, 2001.

STEMMER, W.P.C. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. **Nature.** v. 370, n. 6488, p. 389-391, 1994.

STRAATHOF, A.J.J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology.** v. 13, n. 6, p.548–556, 2002.

STRATAGENE MANUALS 2004 - XL1-Blue Subcloning-Grade Competent Cells. <http://www.stratagene.com/manuals/200130.pdf> Stratagene Manuals - XL1-Red Competent Cells. <http://www.stratagene.com/manuals/200129.pdf>.

SWEEDLER, J. W.; BILHORN R. B.; P. EPPERSON, M.; SIMS, G. R.; DENTON, M. B.; High- performance charge transfer device detectors. **Analytical Chemistry**. v. 60, n 4, p. 282–291, 1988.

TANAKA, F.; FULLER, R.; SHIM, H.; LERNER, R.A.; BARBAS, C.F. Evolution of Aldolase Antibodies in Vitro: Correlation of Catalytic Activity and Reaction-based Selection. **Journal of Molecular Biology**. v. 335, n. 4, p. 1007-1018, 2004.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL - W – Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position – specific gap penalties and weight matrix choice. v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TSAI, S.W.; TSAI, C.S.; CHANG, C.S. Lipase-catalyzed synthesis of (S)-naproxen ester prodrug by tranesterification in organic solvents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 80, n. 3, p. 205-219. 1999.

van KAMPEN, M.D.; EGMOND, M.R. Directed evolution: from a staphylococcal lipase to a phospholipase. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 102, n. 12, p. 717– 726. 2000.

van LOO, B.; SPELBERG, J.H.L.; KINGMA, J.; SONKE, T.; WUBBOLTS, M.G.; JANSSEN, D.B. Directed Evolution of Epoxide Hydrolase from *A. radiobacter* toward Higher Enantioselectivity by Error-Prone PCR and DNA Shuffling. **Chemistry&Biology**. v. 11, n. 7, p. 981-990, 2004.

VERGER, R. ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**. v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

WALSH, C. Enabling the chemistry of life. **Nature**. v. 409, n. 6839, p. 226-231. 2001.

WARNER, J.C.; CANNON, A.S.; DYE, K.M. Green Chemistry. **Environmental Impact Assessment Review**. v. 24, n. 7-8, p. 775-799, 2004.

WINTRODE PL; MIYAZAKI K; ARNOLD F.H. Cold adaptation of a mesophilic subtilisin-like protease by laboratory evolution. **Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 41, p. 31635–31640. 2000.

XIE, Y.C.; LIU, H.Z.; CHEN, J.Y. Effect of water content on enzyme activity and enantioselectivity of lipase-catalyzed esterification of racemic ibuprofen in organic solvents. **Annual New York Academic Science**. v. 864, p. 570-575.1998.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**. v. 36, n. 12, p. 1251 – 1275, 1992.

YAMADA, S.; TSUJIOKA, I.; SHIBATANI, T.; YOSHIOKA, R. Efficient alternative synthetic route to diltiazem via (2R,3S)-3-(4-methoxyphenyl)glycidamide. **Chemistry Pharmaceutical Bulletin**. v. 47, n. 2, p. 146-150, 1999.

YANO, J.K.; POULOS, T.L. New understandings of thermostable and peizostable enzymes. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 14, n. 4, p. 360-365, 2003.

ZACCOLO, M.; WILLIAMS, D.M.; BROWN, D.M.; GHERARDI, E. An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. **Journal of Molecular Biology**. v. 255, n. 4, p. 589-603, 1996.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. **Science**. v. 224, n. 4654, p. 1249-1251, 1984.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **Journal of Biological Chemistry**. v. 263, n. 7, p. 3194-3201, 1988

ZHANG, J.H.; DAWES, G.; STEMMER, W.P.C. Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 94, n. 9, p. 4504-4509, 1997.

ZHOU, R.; XU, J.H. Enantioselective synthesis of (*S*)- α -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol by lipase-catalyzed alcoholysis of racemic ester in organic medium. **Biochemical Engineering Journal**. v. 23, n. 1, p. 11-15, 2005.

ZHU, B.; PANEK, J.S. Methodology based on chiral silanes in the synthesis of polypropionate-derived natural products — total synthesis of epothilone A. **European Journal of Organic Chemistry**. v. 2001, n. 9, p. 1701-1714. 2001.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.