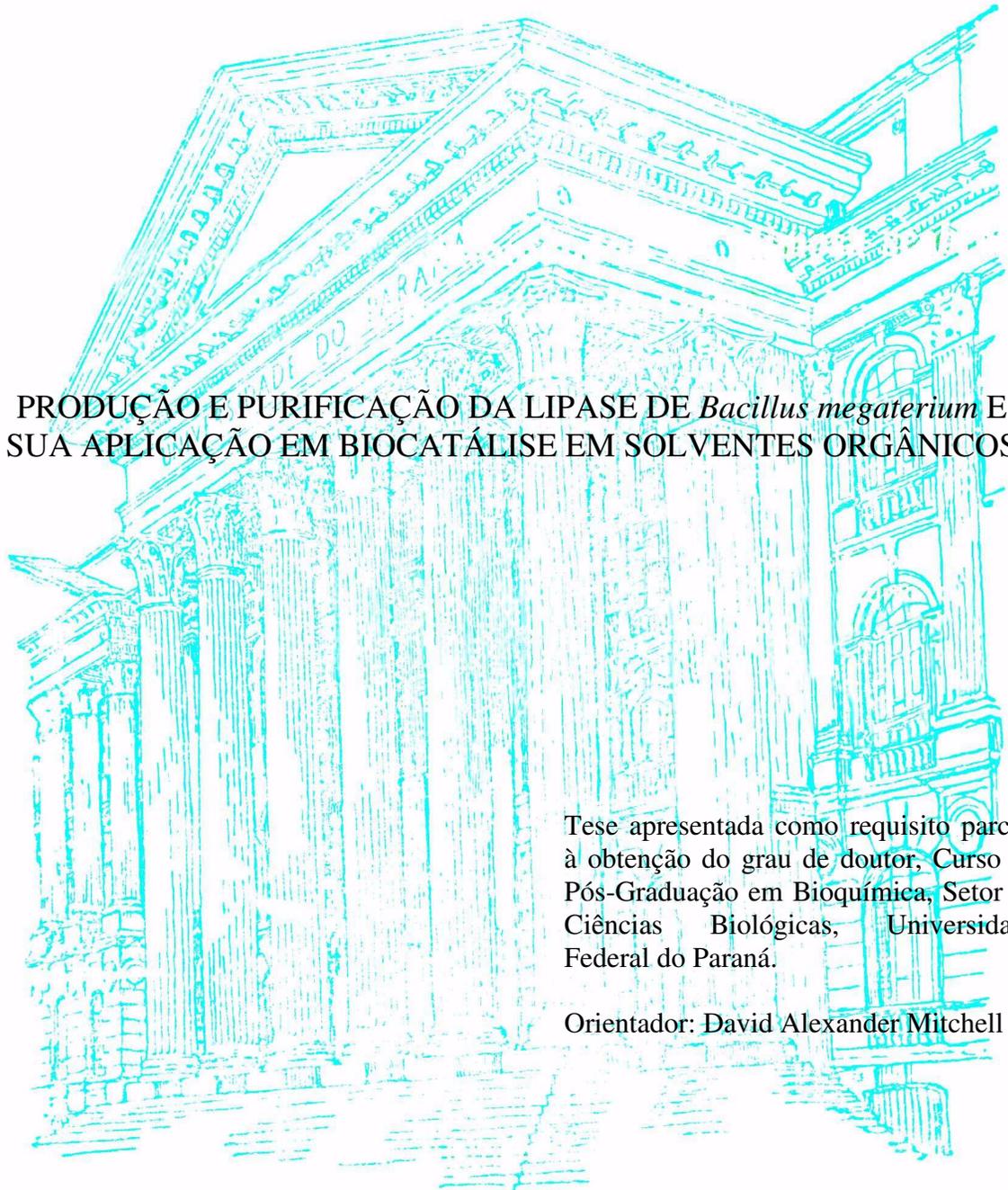


VALÉRIA MARTA GOMES DE LIMA



PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* E
SUA APLICAÇÃO EM BIOCATALISE EM SOLVENTES ORGÂNICOS

Tese apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de doutor, Curso de
Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: David Alexander Mitchell

Curitiba
2004

Orientador: Prof. David Alexander Mitchell
Co-orientadores: Profa. Nadia Krieger
Prof. José Domingos Fontana

AGRADECIMENTOS

À Profa. Nadia Krieger, ao Prof David A. Mitchell e ao Prof. José D. Fontana, pela orientação neste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

À FIOCRUZ, especialmente ao pesquisador Ivano de Fillipis, pela caracterização da cepa.

À Univille, especialmente às professoras Sandra Furlan e Regina Gern, pela possibilidade de utilização de equipamentos e laboratórios para a purificação da enzima. Agradeço também aos funcionários da Coordenação de Laboratórios (Rogério e Darlei), aos técnicos do Laboratório de Análises Instrumentais (Milena e César) e às técnicas dos Laboratórios de Biotecnologia (Gianini e Beatriz) e Biologia Molecular (Leslie), pela imensa colaboração e amizade.

Ao prof. Frederic Carrière do *Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse*, LEIPL, Marselha, França, pelo seqüenciamento da região N-terminal da enzima isolada.

Aos meus amigos de laboratório Alessandra, Samantta, Thais, Dafne, Joel, Safi, Maria Luisa e Marcelo, pela amizade, paciência e auxílio.

Ao prof. Luis P. Ramos (Departamento de Química – UFPR) e seus alunos, Carla, Leonardo e Daniella, pela amizade e colaboração.

À todos os meus familiares, pelo carinho e estímulo que me tornaram capaz de suportar todos os desafios até a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIACÕES.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. LIPASES	3
2.1.1. <i>Definição e classificação</i>	3
2.1.2. <i>Fontes de obtenção</i>	5
2.1.3. <i>Aspectos genéticos e estruturais gerais de lipases</i>	6
2.1.4. <i>Mecanismo de catálise</i>	10
2.1.5. <i>O fenômeno da ativação interfacial</i>	12
2.1.6. <i>Cinética de lipases</i>	13
2.1.7. <i>Purificação de lipases microbianas</i>	14
2.1.8. <i>Características bioquímicas de lipases bacterianas</i>	22
2.1.9. <i>Lipases em biocatálise</i>	28
2.1.10. <i>Lipases - enzimas de interesse industrial</i>	30
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. MICRORGANISMOS	35
4.2. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS	36
4.3. SELEÇÃO DE CEPAS LIPOLÍTICAS	36
4.3.1. <i>Seleção de cepas lipolíticas em placas de Petri</i>	36
4.3.2. <i>Seleção de cepas lipolíticas em fermentação submersa</i>	36
4.4. IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DA CEPA LTEB11.....	38
4.5. PRODUÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE BACILLUS MEGATERIUM	39
4.6. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS E DE ESTABILIDADE DA LIPASE DE <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>	40
4.6.1. <i>Estabilidade em solventes orgânicos</i>	40
4.6.2. <i>Efeito da temperatura na atividade e estabilidade</i>	40
4.6.3. <i>Efeito do pH na atividade e estabilidade</i>	41
4.6.4. <i>Efeito da concentração de proteínas na atividade</i>	42
4.6.5. <i>Efeito da concentração de substrato na atividade</i>	42
4.7. ENSAIOS PRELIMINARES DE PURIFICAÇÃO.....	42
4.7.1. <i>Ensaio para clarificação do extrato bruto</i>	43
4.7.2 <i>Ensaio para desagregação da enzima</i>	44
4.8. PURIFICAÇÃO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	45
4.8.1. <i>Cromatografia de gel permeação</i>	45
4.8.2. <i>Cromatografia de interação hidrofóbica</i>	46
4.8.3 <i>Eletroforese SDS-PAGE e Nativa</i>	47
4.9. MÉTODOS ANALÍTICOS	49
4.9.1 <i>Determinação da atividade lipolítica em meio aquoso</i>	49
4.9.2. <i>Determinação da atividade lipolítica em meio de micelas reversas</i>	51
4.9.3. <i>Determinação de proteínas</i>	52

4.9.4. Determinação de açúcares totais - Método do Fenol Sulfúrico.....	53
4.9.5. Determinação da seqüência amino-terminal	53
4.9.6. Detecção de lipídeos por cromatografia de camada delgada.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE LIPASES	58
5.1.1. Seleção em meio sólido	58
5.1.2. Seleção de cepas por fermentação submersa.....	59
5.2. IDENTIFICAÇÃO DA CEPA BACTERIANA LTEB11	61
5.3. CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPASE POR <i>BACILLUS</i>	
<i>MEGATERIUM</i>	62
5.3.1. Cinética de crescimento no pré-inóculo.....	62
5.3.2. Cinética de crescimento e produção de lipases durante a fermentação.....	62
5.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	65
5.5. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E DE ESTABILIDADE	
DOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> E <i>PENICILLIUM</i>	
<i>AURANTIOWISEUM</i>	66
5.5.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade	67
5.5.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade	70
5.5.3. Atividade frente a diferentes substratos	72
5.5.4. Estabilidade em solventes orgânicos	74
5.5.5. Atividade da lipase de <i>Bacillus megaterium</i> em micelas reversas	78
5.6. ENSAIOS PRELIMINARES DE PURIFICAÇÃO.....	80
5.6.1 Análise do sobrenadante de cultura e do extrato bruto por gel permeação... 80	
5.6.2. Ensaio para clarificação do extrato bruto e desagregação da enzima.....	84
5.7. ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>	
POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	89
5.7.1. Purificação com tratamento prévio por detergente.....	90
5.7.2. Purificação com tratamento prévio com isopropanol	94
5.8. PROTOCOLO FINAL DE PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE <i>BACILLUS</i>	
<i>MEGATERIUM</i>	97
5.9. ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA AMINO-TERMINAL DA LIPASE DE <i>BACILLUS</i>	
<i>MEGATERIUM</i>	98
5.10. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA LIPASE DE <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> .	104
5.10.1. Efeito da concentração de proteína na atividade	104
5.10.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade	105
5.10.3. Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade	108
5.10.4. Especificidade da lipase: Atividade frente a diferentes substratos	110
5.10.5. Efeito da concentração do substrato.....	111
6. DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS	114
6.1. Propriedades cinéticas da lipase de <i>Bacillus megaterium</i>	114
6.2. Comparação das Propriedades do Sistema Lipolítico de <i>Bacillus megaterium</i>	
de diferentes cepas.....	122
7. CONCLUSÕES	124
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXOS.....	148

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Reação de hidrólise catalisada por triacilglicerol lipases.

Figura 2.2. Modelo estrutural de α/β hidrolases. Fonte: Pouderoyen et al., 2001.

Figura 2.3. Modelo estrutural da lipase *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* ligada a 1-fenoxi 2-acetoxi butano. Fonte: Protein Data Bank.

Figura 2.4. Mecanismo catalítico proposto para lipases. Fonte: Jaeger et al., 1994.

Figura 2.5. **A)** Representação de uma micela reversa em sistema AOT/isooctano. **B)** Fórmula estrutural do detergente AOT (dioctilsulfosuccinato de sódio).

Figura 4.1. Esquema geral para a produção do extrato bruto de *Bacillus megaterium*.

Figura 4.2. Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico.

Figura 5.1. Produção de lipase pela cepa LTEB11 em meio sólido contendo óleo de oliva e Rodamina B. O resultado positivo é indicado pelo halo de fosforescência alaranjada que é visualizado quando a placa é irradiada ao UV 365 nm.

Figura 5.2. Cinética de crescimento e produção de lipases por *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. **A)** Cinética de crescimento em meio LB durante o preparo do pré-inóculo. **B)** Cinética de crescimento (■) e atividade lipolítica (●) durante a fermentação. Condições de cultivo: agitação orbital de 100 rpm, 29°C, atividade lipolítica acompanhada pelo método do *p*NPP. Experimentos realizados em triplicata.

Figura 5.3. Efeito da temperatura na atividade lipolítica do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Condições do ensaio: temperatura entre 20 e 70°C, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, concentração de proteína: 3,8 μ g e *p*NPP 0,03 mg/mL. Ensaio realizado em triplicata.

Figura 5.4. **A)** Estabilidade à temperatura da atividade lipolítica do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. **B)** Detalhe da Figura 5.4A: Estabilidade à temperatura nos primeiros 50 min de incubação. Atividade residual após incubação a 30 (■), 40 (●), 50 (▲), 60 (▼) e 70 °C (◆), tampão fosfato pH 7,0 0,02 mol/L. Condições de ensaio: temperatura de 37 °C, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, concentração de proteínas: 3,8 μ g e *p*NPP 0,03 mg/mL. Ensaio realizado em triplicata.

Figura 5.5: **A)** Efeito do pH na atividade lipolítica do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Condições de ensaio: 37 °C, 3,8 μ g de proteínas, 0,03 mg/mL de *p*NPP. **B)** Estabilidade ao pH da atividade lipolítica do extrato bruto de *B. megaterium*. Atividade residual após 1 h de incubação a 29°C, tampões utilizados nos dois ensaios (0,02 mol/L): citrato-fosfato pH 2,5 a 7,0 (■), fosfato pH 6,0 a 8,0 (●), Tris-HCl pH 8,0 a 9 (▲), Glicina-NaOH pH 9 e 10 (▼) em (A) ou água destilada (▼) em (B). Condições de ensaio: 37°C, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, concentração de proteínas: 3,8 μ g e *p*NPP 0,03 mg/mL. As atividades foram comparadas com a atividade determinada em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0 sem pré-incubação. Ensaio realizado em triplicata.

Figura 5.6. Perfil de eluição do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 em coluna Superose 6. **A)** Injeção do extrato bruto; **B)** Injeção do sobrenadante de cultura. Atividade lipolítica (●), Absorbância a 280 nm (■). Condições: tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,0 com NaCl 0,15 mol/L; fluxo de 0,2 mL/min; injeção de 1 mL; coleta de frações de 1 mL.

Figura 5.7. Eletroforese SDS-PAGE após análise do extrato bruto por gel permeação em coluna Superose 6. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: sobrenadante de cultura, linha 3: extrato bruto, linha 4: frações reunidas após eluição da coluna Superose 6. Foram aplicados 10 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.

Figura 5.8. Etapas do tratamento do extrato bruto com isopropanol para clarificação e rompimento de agregados.

Figura 5.9. Perfil de eluição do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 em coluna Octyl Sepharose CL-4B. Atividade lipolítica (●), Absorbância a 280 nm (■), Gradiente de Chaps (traços). Condições: Eluição com gradiente - 1) tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,0 com (NH₄)₂ SO₄ 1,2 mol/L; 2) tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0 com CHAPS 1%. Fluxo de 0,5 ml/min; injeção de 2 mL; coleta de frações de 1 mL.

Figura 5.10. Eletroforese SDS-PAGE após análise do extrato bruto (tratado com CHAPS) por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Octyl Sepharose CL-4B. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: sobrenadante e cultura, linha 3: extrato bruto; linha 4: frações reunidas após eluição da coluna Octyl Sepharose. A massa molar das proteínas da linha 4 estão indicadas por setas. Foram aplicados 5 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata. As massas moleculares das proteínas da linha 4 estão indicadas por seta à direita do gel.

Figura 5.11. Perfil de eluição do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 em coluna Phenyl Sepharose FF. Atividade lipolítica (●), Absorbância a 280 nm (■), Gradiente de CHAPS (traços). Condições: Eluição com gradiente - 1) tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,0; 2) tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,0, com 2 % de CHAPS. Fluxo de 0,5 mL/min, injeção de 1 mL; coleta de frações de 1 mL.

Figura 5.12. Eletroforese SDS-PAGE após análise do extrato bruto por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl Sepharose FF. Linha 1: marcadores de massa molar, linha 2: extrato bruto, linha 3: frações reunidas após eluição pela Fenil Sepharose. Foram aplicados 3 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata. As massas das proteínas da linha 3 estão indicadas pelas setas à direita do gel.

Figura 5.13. Eletroforese SDS-PAGE da amostra eluída da coluna de gel permeação Sephadex G-100. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: extrato bruto tratado com CHAPS 1%; linha 3: frações eluídas da Octyl Sepharose CL4B e aplicadas na Sephadex; linha 4: frações eluídas da Phenyl Superose e aplicadas na Sephadex. Foram aplicados 5 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata. As massas moleculares das proteínas presentes na linha 4 estão indicadas pela seta à direita do gel.

Figura 5.14. Perfil de eluição do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 em Octyl Sepharose CL-4B. Atividade lipolítica (●), Absorbância a 280 nm (■), Gradiente de Isopropanol (traços). Condições: Eluição com gradiente - (1) tampão Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,5; 2) tampão Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,5, com 60 % de isopropanol; fluxo de 0,5 ml/min; injeção de 1 mL; coleta de frações de 1 mL.

Figura 5.15. **A)** Eletroforese SDS-PAGE após análise do extrato bruto (tratado com isopropanol) por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Octyl Sepharose CL-4B. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: extrato bruto; linha 3: extrato bruto tratado com isopropanol 30 %, linha 4: frações eluídas da Octyl Sepharose CL4B. Foram aplicadas 3 µg de

proteína. Revelação por nitrato de prata. **B)** Zimograma utilizando MUF-Butirato como substrato.

Figura 5.16. Eletroforese SDS-PAGE. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: extrato bruto; linha 3: frações eluídas da Octyl Sepharose; linha 4: frações eluídas da Superdex G200. Revelação por Coomassie Blue. As massas moleculares das proteínas presentes nas linhas 3 e 4 são indicadas pelas setas à direita do gel.

Figura 5.17. Perfil de eluição das frações da Octyl Sepharose em coluna Superdex G-200. Eluição com tampão fosfato pH 7,0 com NaCl 0,15 mol/L. Atividade lipolítica (●), Absorbância a 280 nm (■).

Figura 5.18. Efeito da concentração de proteínas na atividade da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Condições do ensaio: tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, 37 °C, pNPP 0,03 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata.

Figura 5.19. Efeito do pH na atividade (**A**) e na estabilidade (**B**) da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Tampões utilizados nos ensaios: citrato fosfato pH 2,6 a 7 (■); fosfato pH 6 a 8 (●); Tris-HCl pH 8 e 9 (▲); carbonato-bicarbonato pH 9,2 a 10,7 (▼), todos 0,02 mol/L Ensaio de atividade: 37 °C, 3,5 µg/mL de proteína. Ensaio de estabilidade: 1 h de incubação, 30 °C. Ensaios realizados em triplicata.

Figura 5.20. **A)** Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Condições do ensaio: 37 - 85°C, tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0, concentração de proteína: 3,5 µg/mL, pNPP 0,03 mg/mL. **B)** Gráfico de Arrhenius: para a construção do gráfico foram utilizados os dados apresentados na figura A. Ensaios realizados em triplicata.

Figura 5.21. Estabilidade à temperatura da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Atividade residual após incubação a 40 (■), 50 (●), 60 (▲) e 70 °C (▼), tampão fosfato pH 7,0 0,02 mol/L. Condições de ensaio: 37 °C, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, pNPP 0,03 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata.

Figura 5.22. Efeito da concentração do substrato na atividade da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Condições de ensaio: 50 °C, concentração de proteínas: 3,5 µg/mL, concentração de pNPP: 0,3-8 mmol/L, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0. Ensaios realizados em triplicata.

Figura 5.23. Efeito da concentração do substrato na atividade da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 – Análise dos dados da Figura 5.25 pelo Gráfico de Hanes-Woolf.

Figura 5.24. Efeito da concentração do substrato na atividade da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 – Análise dos dados da Figura 5.25 pelo Gráfico de Hill.

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES BACTERIANAS

TABELA 2.2 - CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LIPASES BACTERIANAS

TABELA 2.3 - ALGUNS EXEMPLOS DE APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE LIPASES EM BIOCATÁLISE

TABELA 4.1 - COEFICIENTES DE EXTINÇÃO MOLAR DE *p*-NITROFENOL EM DIFERENTES VALORES DE pH.

TABELA 4.2. - PROCEDÊNCIA E GRAU DE PUREZA DOS REAGENTES UTILIZADOS NO TRABALHO.

TABELA 5.1 - TESTE EM PLACAS DE PETRI PARA A SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES.

TABELA 5.2 - PRODUÇÃO DE ESTERASES POR CEPAS DE *Bacillus* sp.

TABELA 5.3 - CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DA CEPA LTBE11

TABELA 5.4 - PRECIPITAÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 COM SULFATO DE AMÔNIO A 80% DE SATURAÇÃO.

TABELA 5.5 - TEMPO DE MEIA-VIDA DA LIPASE DE *Bacillus megaterium*.

TABELA 5.6 - ATIVIDADE DO EXTRATO LIPOLÍTICO BRUTO FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS.

TABELA 5.7 - ESTABILIDADE EM SOLVENTES ORGÂNICOS

TABELA 5.8 - ATIVIDADE DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 EM MICELAS REVERSAS EM DIFERENTES VALORES DE W_0

TABELA 5.9 – ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 POR GEL PERMEAÇÃO .

TABELA 5.10 – TRATAMENTO DO SOBRENADANTE DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SULFATO DE AMÔNIO E DOSAGEM DE AÇÚCARES TOTAIS..

TABELA 5.11 - CLARIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO POR PRECIPITAÇÃO COM ÍONS Mg^{+2}

TABELA 5.12 - TRATAMENTO DO EXTRATO BRUTO COM CHAPS PARA CLARIFICAÇÃO E ROMPIMENTO DO AGREGADO DE ALTA MASSA MOLAR

TABELA 5.13 - TRATAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 COM ISOPROPANOL 30 %.

TABELA 5.14 - PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM COLUNA OCTYL SEPHAROSE.

TABELA 5.15 - PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM COLUNA PHENYL SEPHAROSE FF

TABELA 5.16 - PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM COLUNA OCTYL SEPHAROSE E ELUIÇÃO COM ISOPROPANOL.

TABELA 5.17 – RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 PARA DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA AMINO-TERMINAL

TABELA 5.18. SEQUÊNCIA N-TERMINAL DAS PROTEÍNAS ELUÍDAS DA COLUNA OCTYL SEPHAROSE.

TABELA 5.19 - TEMPO DE MEIA-VIDA PARA A LIPASE DE *Bacillus megaterium*.

TABELA 5.20. ATIVIDADE DA LIPASE PURIFICADA DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS.

TABELA 5.21. - SISTEMA LIPOLÍTICO DE DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus megaterium*.

LISTA DE ABREVIACÕES

AOT – bis-2-etil-hexil-sulfossuccinato de sódio

a_w - atividade de gua

CHAPS - (3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio])

Log P – logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico padrão octanol/água

m/v – massa/volume

MUF – metil umbeliferila

pI – ponto isoelétrico

pNPA- acetato de *p*-nitrofenila

pNPB – butirato de *p*-nitrofenila

pNPC – caproato de *p*-nitrofenila

pNPCA – caprato de *p*-nitrofenila

PNPCL – caprilato de *p*-nitrofenila

pNPP – palmitato de *p*-nitrofenila

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

v/v – volume/volume

W_0 – razão molar das concentrações de água e tensoativo

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo a purificação e a caracterização cinética da lipase selecionada de *Bacillus megaterium* e a verificação do seu potencial para utilização em biocatálise em meio de solventes orgânicos. Dentre 36 cepas microbianas selecionadas para o *screening* inicial, a cepa de *Bacillus megaterium* CCOC P2637 apresentou a mais alta atividade lipolítica, tanto em placas de Petri, como em fermentação líquida (33 U/mL), tendo sido avaliada com relação ao seu potencial para utilização em biocatálise pela caracterização cinética e de estabilidade do extrato bruto e da lipase purificada. Para produção da enzima, o microrganismo foi cultivado em meio contendo sais, extrato de levedura e 1% de óleo de oliva, com incubação a 29 °C e 120 rpm. Após 72 h de cultivo, o sobrenadante foi separado das células por centrifugação e a enzima foi precipitada diretamente do sobrenadante de cultura pela adição de sulfato de amônio (80%), ressuspendida e dialisada, resultando no extrato bruto utilizado nos ensaios seguintes. O extrato bruto apresentou atividade frente a triacilgliceróis com cadeias entre 4 e 18 carbonos e frente a ésteres de *p*-nitrofenila, destacando-se a maior atividade frente ao palmitato de *p*-nitrofenila. A temperatura para atividade máxima foi de 55 °C, sendo que a enzima foi razoavelmente estável a 60 °C, mantendo 77% do valor inicial após 10 min de incubação. A estabilidade em solventes orgânicos foi estudada por incubação (1h, 30 °C) do extrato bruto em butanol, tolueno, hexano, heptano, isooctano e em várias porcentagens (de 25 a 100%) de acetona, etanol e isopropanol em água. O extrato bruto manteve 100% da atividade inicial nos solventes hidrofóbicos e foi surpreendentemente ativado na presença de porcentagens crescentes de etanol, isopropanol e acetona. A verificação da capacidade de catálise da enzima no sistema de micelas reversas AOT/*n*-heptano mostrou que as mais altas atividades específicas foram obtidas em W_0 ($[H_2O]/[AOT]$) 5 (111 U/mg) e 10 (104 U/mg) e a razão entre a atividade no meio orgânico e aquoso ($R_{o/a}$) foi de 1,9, indicando uma maior atividade no meio micelar do que no meio aquoso. Análises preliminares do extrato bruto por cromatografia de gel permeação indicaram que a enzima estava presente na forma de um agregado de alta massa molar. Com o tratamento do extrato bruto com CHAPS 1% (m/v) e aplicação em coluna Phenyl Sepharose Fast Flow obteve-se um fator de purificação de 70 e 18% de recuperação de atividade, observando-se 3 bandas de 32, 50 e 60 kDa na eletroforese SDS-PAGE. Como segunda estratégia de purificação, utilizou-se o tratamento do extrato bruto com isopropanol 30% (v/v), coluna Octyl Sepharose CL4B e eluição com isopropanol 60% (v/v). O fator de purificação obtido foi de 46, com recuperação de 86% da atividade e 3 bandas de 31, 52 e 63 kDa. Apenas a banda de 31 kDa apresentou atividade frente ao MUF-butirato, sendo que sua seqüência amino-terminal demonstrou 93% de homologia com a seqüência interna de uma colesterol esterase de *Pseudomonas cepacia*. A enzima purificada mostrou-se surpreendentemente mais estável do que o extrato bruto, apresentando atividade máxima em temperatura de 55-65 °C e na faixa de pH entre 6 a 9. A enzima foi estável a 50 °C, mantendo 50% da atividade após 86 min e entre pH 3 e 10,5, por 1h a 29 °C. Estes resultados mostram que a lipase de *B. megaterium* é uma enzima ainda não descrita na literatura, cujas propriedades cinéticas e de estabilidade são de grande interesse para aplicações em biocatálise.

ABSTRACT

This work had as its objective the purification and kinetic characterization of a *Bacillus megaterium* lipase and the verification of its potential for use in biocatalysis. The strain *Bacillus megaterium* CCOC P2637 gave high lipolytic activity both in Petri dishes and shake flask culture (33 U/mL). The initial studies evaluated the potential for use in biocatalysis, the crude extract being used in studies of substrate preference and pH and temperature stability. For these studies, after 72 h of culture the cells were removed by centrifugation and ammonium sulfate was added to the supernatant to 80% of saturation. The precipitate was re-suspended and dialyzed, giving the crude extract. This crude extract hydrolyzed triacylglycerols containing fatty acids of 4 to 18 carbons. It also hydrolyzed fatty-acid esters of *p*-nitrophenol, with the activity increasing with chain length up to *p*-nitrophenol palmitate (*p*NPP). In tests of the effect of temperature on the amount of product formed after 1 min, the optimum temperature was 55 °C. The enzyme was reasonably stable at 60 °C, with 77% residual activity after 10 min of incubation. Stability in organic solvents was studied by incubation (1 h, 30 °C) of the crude extract in neat solutions of the hydrophobic solvents butanol, toluene, hexane, heptane and isooctane and in aqueous solutions (from 25 to 100% (v/v)) of the hydrophilic solvents acetone, ethanol and isopropanol. The crude extract maintained 100% residual activity in the hydrophobic solvents and was actually activated in the presence of increasing concentrations of ethanol, isopropanol and acetone. The catalytic activity against *p*NPP in AOT/n-heptane reverse micelles was determined, with the highest activities being obtained at W_0 ($[H_2O]/[AOT]$) values of 5 (111 U/mg) and 10 (104 U/mg). The ratio of the rates of hydrolysis of *p*NPP in organic and aqueous systems ($R_{O/A}$) was 1.9. Preliminary gel permeation chromatography studies showed that the enzyme in the crude extract was in the form of a high molecular weight aggregate. After treatment of the crude extract with CHAPS (1% (m/v)) and application in a Phenyl Sepharose Fast Flow column, the purification factor was 70, with a recovery of activity of 18%. The purified enzyme preparation showed three bands after SDS-PAGE, at 32, 50 and 60 kDa. As a second purification strategy, the crude extract was treated with isopropanol (to 30% (v/v)), applied to an Octyl Sepharose CL4B column and eluted with isopropanol (60% (v/v)). The purification factor was 46 with an 86% recovery. Again three bands were obtained after SDS-PAGE, at 31, 52 and 63 kDa. Only the 31 kDa band showed activity against MUF-butyrate. The amino-terminal sequence of the protein in this band had 93% homology with an internal sequence of a cholesterol esterase of *Pseudomonas cepacia*. The purified enzyme was more stable than the crude extract, showing maximum activity at 55 to 65 °C and in the pH range from 6 to 9. The enzyme showed a 50% residual activity after 86 min at 50 °C, and was stable during incubation for 1 h at 29 °C at pH values from 3 to 10.5. These results show that the lipase of *B. megaterium* is an enzyme that has not previously been described in the literature and has kinetic properties and stability characteristics that could suit it to applications in biocatalysis.

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Nos países desenvolvidos, os projetos nesta área normalmente estão entre os prioritários e englobam grupos de pesquisa com alto potencial de produção de conhecimento e geração de tecnologias de ponta. A realidade brasileira, entretanto, é outra. De um lado, a tecnologia de produção e de aplicações de enzimas em nível industrial está em poder de algumas companhias internacionais, que não desenvolvem pesquisa no Brasil, e portanto, tanto a tecnologia de produção, como a de aplicação das enzimas é trazida de outros países, com a participação brasileira limitada ao consumo dos seus produtos. Por outro lado, os equipamentos envolvidos na produção e purificação de enzimas, seja em escala de laboratório ou em escala semi-piloto, são de alto custo, pois envolvem fermentadores, equipamentos para purificação, normalmente cromatógrafos, além de equipamentos para análise, como cromatógrafos líquidos de alta eficiência (CLAE), espectrofotômetros, sem contar o custo dos reativos, meios de cultura e substratos para determinação das atividades enzimáticas. Os altos custos envolvidos fazem com que poucos grupos brasileiros sejam competitivos na área de tecnologia enzimática, especialmente na relacionada com as enzimas de interesse deste trabalho: as lipases.

Lipases são biocatalisadores de muita importância em diferentes áreas, podendo catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Este fenômeno é primariamente devido à sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, à sua estabilidade frente a temperatura, pH e solventes orgânicos, e à sua quimio-regio e enantiosseletividade. Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas, por sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias

de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, farmacológicas (síntese de naxopreno e ibuprofeno), agroquímica (inseticidas e pesticidas) e oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) (Krieger et al, 1999, Pandey et al, 1999, Saxena et al, 1999, Cabral et al, 1998, Jaeger et al, 1994, Vulfson, 1994).

Estas enzimas hidrolíticas são capazes de atuar em reações em meio de solvente orgânico, catalisando, por exemplo, a síntese de ésteres de alto valor agregado e a síntese de peptídeos e seus derivados (Xing et al, 1998, Almarsson e Klibanov, 1996). Outra importante característica é a sua capacidade de síntese de compostos opticamente puros. A capacidade de resolução de misturas racêmicas destas enzimas tem sido extensivamente relatada (Xin et al, 2000, Wu e Liu, 2000, Pandey et al, 1999). Entretanto, apesar de todas as vantagens citadas sobre utilização de lipases, existem ainda problemas para serem resolvidos no desenvolvimento de processos de aplicações destas enzimas, principalmente do ponto de vista econômico, pois o custo de produção e purificação das enzimas (quando requerida) torna os processos enzimáticos mais caros do que os processos químicos convencionais. Além disso, a existência de enzimas com propriedades requeridas no processo, como atividade e estabilidade em condições consideradas não-naturais (atividade e estabilidade em meios aquo-restritos e termoestabilidade, por exemplo), é sempre limitada, e muitas vezes propiciada apenas pela criação de novas enzimas por técnicas de biologia molecular (Arnold et al., 2001).

Este trabalho trata do isolamento e da seleção de cepas produtoras de lipases, sua purificação e caracterização cinética e bioquímica. Contribui, desta maneira, para o desenvolvimento do conhecimento em área de importância significativa dentro da biotecnologia: a tecnologia enzimática. A grande diversidade brasileira de microrganismos justifica a busca por novos produtores de enzimas com características especiais, que possam ser aplicadas na produção de compostos de química fina através da biocatálise.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LIPASES

2.1.1. Definição e classificação

As enzimas são classificadas e codificadas pela NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) de acordo com a reação catalisada. A nomenclatura utiliza a abreviação E.C. (*Enzyme Commission*) seguida de até 4 dígitos referentes à classe e subclasses a que pertence a enzima.

Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C. 3.1) e que atuam sobre ligações éster (E.C. 3.1.1).

O interesse do presente trabalho está sobre as triacilglicerol lipases (E.C.3.1.1.3), cuja definição clássica descreve estas enzimas como glicerol éster hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (Jaeger et al., 1994) (Figura 2.1), constituindo uma classe especial entre as carboxil éster hidrolases (Egloff et al., 1995).

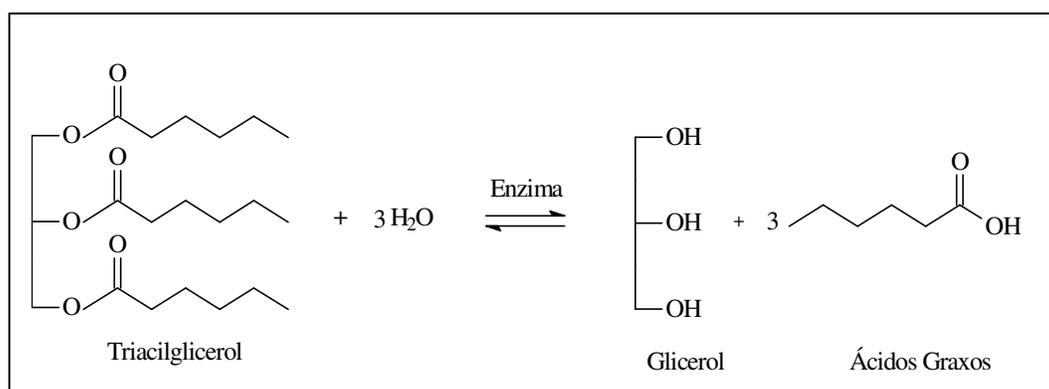


Figura 2.1. Reação de hidrólise catalisada por triacilglicerol lipases.

Entretanto, as lipases se diferenciam pela capacidade de catalisar não só reações de hidrólise, mas também de síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise, e por atuar sobre substratos não naturais (Jaeger e Eggert, 2002). Na seção 2.1.10 são apresentados exemplos de reações catalisadas por lipases que estão sendo implantadas em escala industrial.

As esterases (E.C. 3.1.1.1), que muitas vezes são difíceis de diferenciar das lipases, são carboxil éster hidrolases amplamente distribuídas na natureza, pois atuam essencialmente catalisando a hidrólise de ésteres. Porém, sua atividade enzimática está restrita à hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em água (Alvarez-Macarie et al., 1999).

O problema da diferenciação entre lipases (E.C.3.1.1.3) e esterases (E.C.3.1.1.1) foi estudado por vários autores e ainda existem controvérsias. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética: a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água. A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (Brady et al., 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag et al., 1991) e da lipase pancreática humana (Winkler et al., 1990), propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas era recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou *lid*, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases.

Mais recentemente, entretanto, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, tendo sido descritas lipases como a de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antartica* B que apresentam a *lid* em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (Jaeger e Reetz, 1998). Por outro lado, as cutinases, enzimas

consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a *lid* e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (Cygler e Schrag, 1997). Além disso, a ocorrência ou não da ativação interfacial pode ser influenciada pelas condições experimentais e pelos substratos utilizados (Ferrato et al., 1997).

As lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, simplesmente como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são tidas genericamente como esterases (Jaeger et al., 1999; Ferrato et al., 1997; Verger, 1997; Egloff et al., 1995; Jaeger et al., 1994).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferença de especificidade preferencial das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações éster tríplexes, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (Bier, 1955; Brockman, 1984). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Jaeger et al., 1999).

2.1.2. Fontes de obtenção

Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas, por sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las.

As fontes fúngicas têm sido também preferencialmente utilizadas, não necessariamente devido às suas melhores características em relação a lipases bacterianas, mas sim porque na sua grande maioria não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como GRAS (Generally Regarded as Safe, Jaeger et al., 1994). Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*,

Penicillium roqueforti e da levedura *Candida rugosa* estão sendo comercializadas atualmente pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivo em preparações digestivas e para síntese quiral (<http://www.amano-enzyme.co.jp/>). Em trabalhos recentes, nosso grupo isolou uma cepa de *P. aurantiogriseum* (Lima et al., 2003), otimizou as condições de fermentação e caracterizou cineticamente a lipase produzida. Uma das vantagens demonstradas foi a produção da enzima em um meio inorgânico de baixo custo e a alta atividade específica (290 U/mg).

Dentre as bactérias produtoras de lipases, comercialmente estão disponíveis as enzimas de *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia* (anteriormente *Pseudomonas*) *cepacia* para a aplicação em síntese quiral e as lipases de *Burkholderia* sp. e *Arthrobacter* sp. utilizadas na determinação diagnóstica de triacilgliceróis (<http://www.amano-enzyme.co.jp/>). O rápido crescimento celular, em relação aos fungos, é uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (Jaeger et al., 1999).

A diversidade microbiana na natureza é extraordinária. Mais de 400.000 microrganismos são conhecidos e isto é só uma fração do número estimado para as espécies existentes - 4 a 5 milhões de diferentes espécies. Nos próximos anos, cerca de 100 projetos de seqüenciamento genômico estarão concluídos, revelando informações sobre mais de 300.000 genes, muitos dos quais novos e sem função conhecida (Fraser e Dujon, 2000). Estes números, por si só, justificam a busca e a seleção de cepas microbianas selvagens, potenciais produtoras de enzimas ou outros metabólitos com características especiais e passíveis de aplicação em processos industriais.

2.1.3. Aspectos genéticos e estruturais gerais de lipases

Devido às várias possibilidades de aplicação das lipases, estas enzimas têm sido amplamente estudadas. Diversas lipases tiveram suas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos determinadas e depositadas no banco de dados do

NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Em alguns casos, modelos de estrutura tridimensional também já estão disponíveis.

A estrutura terciária de todas as lipases descritas, tanto de eucariotos quanto procariotos, é do tipo α/β hidrolase (Schrag e Cygler, 1997) (Figura 2.2). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β paralelas rodeado por porções em α -hélice. As fitas β têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre si.

O sítio catalítico das lipases é composto por uma tríade catalítica (Ser, Asp/Glu e His) semelhante à observada primeiramente em serina-proteases. O sítio ativo está localizado no lado C-terminal das fitas β . O nucleófilo catalítico (serina) está localizado especificamente no C-terminal da fita β_5 em um pentapeptídeo altamente conservado GX SXG, que constitui o ângulo nucleofílico (Jaeger e Reetz, 1998; Schrag e Cygler, 1997; Egloff et al., 1995; Jaeger et al., 1994).

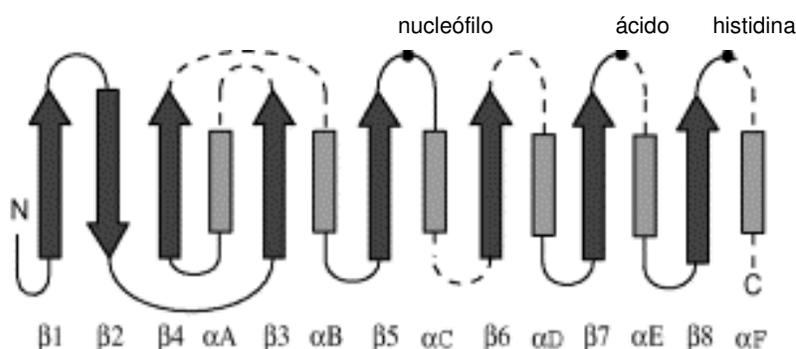


Figura 2.2. Modelo estrutural de α/β hidrolases. Fonte: Pouderoyen et al., 2001.

Muitas das lipases de estrutura conhecida apresentam em sua estrutura uma cadeia denominada *lid* ou “tampa” hidrofóbica, conforme já referido anteriormente. Nestas lipases, a cadeia na qual está inserida a histidina da tríade catalítica prolonga-se sobre o núcleo central de fitas β e sobre o sítio catalítico, cobrindo o sítio como uma tampa (Jaeger e Reetz, 1998; Schrag e Cygler, 1997; Egloff et al., 1995; Jaeger et al., 1994). Nem todas as lipases apresentam a *lid*, como é o caso da cutinase de *Fusarium solani* (Longhi e Cambillau, 1999;

Egmond e Vlieg, 2000) e da lipase Lip A de *Bacillus subtilis* (Lesuisse et al., 1993 e Eggert et al, 2002).

As lipases que apresentam a *lid* foram cristalizadas em três conformações diferentes: i) fechada, com a *lid* cobrindo o sítio ativo; ii) aberta, com a *lid* estabilizada por ligações covalentes ou com detergente ligado ao sítio ativo; iii) aberta mas com a *lid* não estabilizada (Brzozowski et al., 2000).

As conformações fechadas são caracterizadas por um sítio ativo desocupado, o qual é preenchido por moléculas de solvente. A superfície de contato entre a *lid* e a estrutura da proteína é complementar, com exceção da região próxima ao nucleófilo, onde freqüentemente encontra-se uma cavidade. A superfície externa da forma fechada é razoavelmente hidrofílica, típica de proteínas solúveis em água. Em algumas lipases como a de *H. lanuginosa*, a distribuição de átomos polares (nitrogênio e oxigênio) na superfície da molécula fechada confere uma característica mais hidrofóbica na face que contém a *lid*. Na conformação aberta, o movimento da *lid* não só permite acesso ao sítio ativo, mas também expõe uma grande superfície hidrofóbica, ao mesmo tempo que a superfície hidrofílica fica escondida. O caráter mais hidrofóbico da face que contém o sítio ativo pode também ser notado na cutinase, uma enzima que não tem a *lid* e cuja estrutura tridimensional representa o estado ativo desta enzima (Miled et al., 2003; Cygler e Schrag, 1997).

Devido ao forte caráter hidrofóbico da *lid* e à sua posição sobre o sítio ativo, foi proposto que ela estaria envolvida no mecanismo de catálise das lipases. Quando em presença de uma superfície óleo/água a *lid* poderia interagir com a interface, sofrer uma alteração conformacional que moveria a *lid* tornando o sítio ativo exposto (Miled et al., 2003; Jaeger e Reetz, 1998; Schrag e Cygler, 1997; Eglöf et al., 1995; Jaeger et al., 1994). Este aspecto estrutural relacionado à catálise será discutido na seção 2.1.7.

Estruturas tridimensionais de algumas lipases bacterianas foram determinadas e encontram-se depositadas no banco de dados do NCBI. Entre elas estão as lipases de *Bukholderia (Pseudomonas) cepacia*, *Pseudomonas glumae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus cereus*. A Figura 2.3 mostra o modelo estrutural de uma lipase bacteriana.



Figura 2.3. Modelo estrutural da lipase de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* ligada a 1-fenoxi 2-acetoxi butano. Fonte: Protein Data Bank

2.1.3.1 Aspectos genéticos e estruturais de lipases produzidas pelo gênero *Bacillus*

Arpigny e Jaeger (1999) propuseram uma classificação para lipases, esterases e fosfolipases bacterianas, baseada na similaridade das diversas enzimas com a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (100 %). As seqüências de aminoácidos e nucleotídeos foram obtidas a partir dos dados depositados no NCBI e a comparação entre elas foi realizada com o programa BLAST 2.0. A classificação inclui 8 famílias de enzimas lipolíticas. Na família I estão agrupadas as lipases “verdadeiras”, ou seja, as carboxilesterases que hidrolisam substratos de cadeia longa. A família I está dividida em 6 sub-famílias.

A sub-família I.4 inclui lipases de *Bacillus* mesófilos (*B. subtilis* – n. acesso M74019, *B. pumilus* – n. acesso A34992, *B. licheniformis* – n. acesso AJ297356), enquanto na sub-família I.5 estão as lipases de *Staphylococcus* e de cepas termófilas de *Bacillus* (*B. stearothermophilus* – n. acesso U78785, *B. thermocatenulatus* – n. acesso X95309, *B. thermoleovorans* – n. acesso AF134840) (Arpginy e Jaeger, 1999 e Eggert et al., 2001). As lipases destas famílias apresentam similaridade com a lipase de *P. aeruginosa* em torno de 16%.

Seis lipases extracelulares e duas esterases foram descritas para diferentes espécies de *Bacillus*. Estas enzimas apresentam a característica comum de apresentar uma Ala no lugar da Gly na seqüência do pentapeptídeo conservado que contém a Ser. A seqüência usual é G-X-S-X-G, enquanto nas lipases de *Bacillus* a seqüência é A-X-S-X-G. Dentro da sub-família I.4 a tríade catalítica é bastante conservada, sendo composta pela Ser⁷⁸-Asp¹³⁴-His¹⁵⁷ (Eggert et al, 2001). As lipases da sub-família I.4 mostram pelo menos 75% de homologia com a lipase de *B. subtilis*. Foram isoladas uma fosfolipase, uma lipase LipA e uma esterase LipB de *B. subtilis*. A lipase LipA de *B. subtilis* destaca-se pela massa molar menor do que comumente observado para lipases, 19 kDa, pela ausência da *lid* e por não apresentar ativação interfacial, embora seja capaz de hidrolisar substratos típicos de lipase como trioleína (Eggert et al., 2002, Lesuisse et al., 1993). As lipases de *B. pumilus* (Eggert et al., 2002, Möller et al., 1991) e *B. licheniformis* (Nthangeni et al., 2001) também apresentam massa molar em torno de 19 kDa. Uma lipase de *B. subtilis* diferente foi isolada por Maqbool et al. (2002). A enzima tinha massa molar de 45 kDa e a seqüência N-terminal não demonstrou homologia com nenhuma hidrolase conhecida.

2.1.4. Mecanismo de catálise

Lipases são hidrolases que atuam em ligações éster presentes em acilgliceróis para liberar ácidos graxos e glicerol. Como detalhado na seção 2.1.3 o sítio ativo consiste na tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu. Devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo de lipases e proteases, o mecanismo catalítico para

lipases segue o modelo proposto para a quimotripsina, uma serina protease (Figura 2.4). A hidrólise ocorre em duas etapas. Inicialmente, a histidina da tampa hidrofóbica aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio catalítico. Ocorre, então, um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico. O anel imidazólico da histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido. O intermediário tetraédrico é estabilizado por duas pontes de hidrogênio formadas com ligações amida dos resíduos de aminoácidos. Um álcool é liberado, deixando um complexo acil-enzima. Em um segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada (Jaeger et al., 1994).

Evidências deste mecanismo têm sido confirmadas por estudos de ligação de inibidores a lipases e pela análise estrutural destas proteínas (Jaeger et al., 1999).

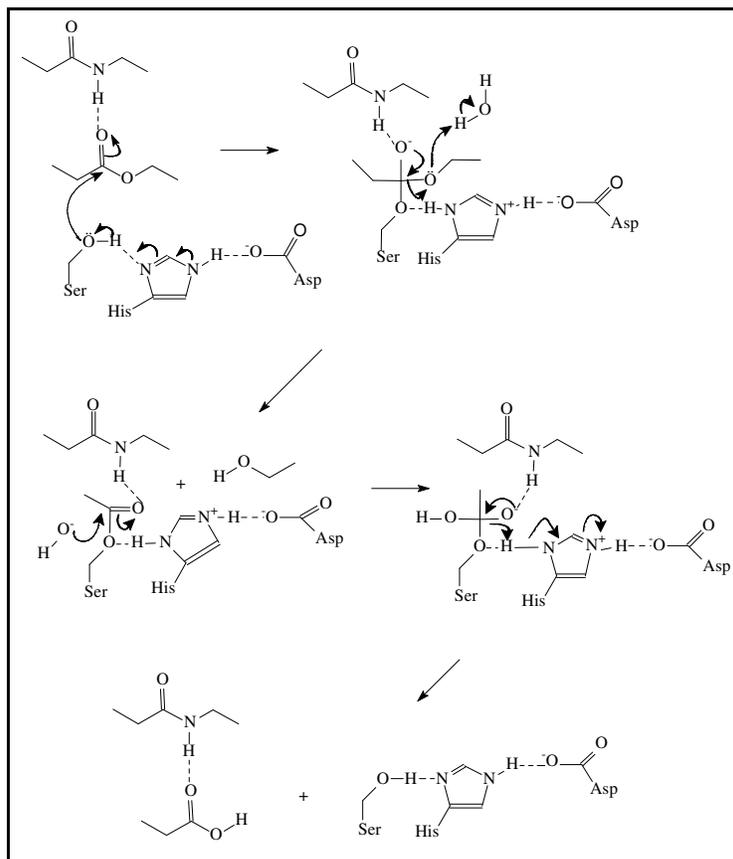


Figura 2.4. Mecanismo catalítico proposto para lipases. Fonte: Jaeger et al., 1994.

2.1.5. O fenômeno da ativação interfacial

O mecanismo catalítico das lipases também está relacionado a algumas propriedades estruturais e conformacionais, como a hidrofobicidade de partes de sua estrutura e à presença da *lid* ou tampa hidrofóbica em algumas lipases. Como descrito na seção 2.1.3, lipases que contém a *lid* podem apresentar duas conformações, uma fechada e inativa, com a *lid* cobrindo o sítio ativo e uma aberta e ativa.

O fenômeno da ativação interfacial foi descrito por Holwerda et al. (1936) e Schønheyder e Volqvartz (1945). Medindo a atividade da lipase pancreática frente a tricaproína, os autores observaram que a hidrólise era enormemente aumentada quando a concentração do substrato excedia o limite de solubilidade. Este comportamento foi chamado de ativação interfacial. Em 1958, Sarda e Desnuelle, repetindo os experimentos de Holwerda et al. (1936) e Schønheyder e Volqvartz (1945), observaram que esterases eram ativas somente sobre substratos molecularmente dispersos, enquanto lipases constituíam uma classe especial de esterases que apresentavam maior atividade sobre substratos formando agregados plurimoleculares. Desta forma, foi postulado que o fenômeno da ativação interfacial seria uma característica das lipases que as distinguiria de outras esterases. Com a descrição tridimensional de algumas lipases, a *lid* foi correlacionada ao fenômeno da ativação interfacial. A abertura da *lid* e conseqüentemente a ativação da lipase seriam favorecidas pela interação da *lid* hidrofóbica com a interface formada por substratos agregados ou micelizados.

Ferrato et al. (1997) reviram o fenômeno da ativação interfacial e observaram que a ativação em presença de interfaces varia de acordo com a enzima empregada e com substratos e condições experimentais. Além disso, segundo os autores, nem a presença da *lid* nem a ativação interfacial são características genéricas de todas as lipases.

Embora muitos aspectos do mecanismo catalítico das lipases ainda não estejam esclarecidos, os dados estruturais das lipases permitem algumas conclusões: a) a maioria das lipases sofre profundas mudanças estruturais durante

a ativação interfacial; a *lid* se move deixando a enzima na forma aberta e ativa, proporcionando uma grande superfície hidrofóbica de interação lipídeo-proteína; b) pelo menos algumas lipases podem estar em equilíbrio dinâmico entre a forma aberta e fechada, quando em solução; c) a abertura da *lid* pode ser facilitada por solventes orgânicos, provavelmente por diminuição da constante dielétrica do meio; d) a interação lipídeo-proteína provavelmente é complexa, não podendo ser explicada por modelos cinéticos simples (Brzozowski et al., 2000).

2.1.6. Cinética de lipases

Devido à complexidade das reações catalisadas por lipases, que ocorrem em sistemas heterogêneos como as emulsões, a cinética verdadeira destas reações não está bem esclarecida. São muitos os parâmetros envolvidos na catálise, e muitas vezes existem barreiras entre a enzima e o substrato, que normalmente oferecem resistência à difusão do substrato e dos produtos de reação (Martinelle e Hult, 1994).

O comportamento cinético das lipases em meio aquoso não pode ser descrito pelo modelo de Michaelis-Menten, considerando-se que este é válido para sistemas homogêneos, onde o substrato e a enzima estão solubilizados. Além disso, a formação do complexo enzima-substrato é precedida por uma adsorção reversível da enzima ao agregado de substrato, que confere à esta uma conformação mais ativa, fenômeno já descrito anteriormente como ativação interfacial (Egloff et al., 1995, Jaeger et al., 1994, Brockman, 1984).

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para elucidar os mecanismos de adsorção das lipases e a catálise em sistemas heterogêneos, relacionados à qualidade interfacial (propriedades físico-químicas da interface), ou a quantidade interfacial. Os primeiros trabalhos são reportados por Sarda e Desnuelle (1958) e Benzonana e Desnuelle (1965). Estes autores demonstraram que a cinética de lipases em emulsões era dependente da área interfacial, e que esta cinética seguia o modelo de Michaelis-Menten, quando o termo “concentração de substrato” era substituído por “área interfacial”. Após estes trabalhos, muitos métodos foram desenvolvidos, baseados em técnicas diversas como as microscópicas ou de

monocamada de lipídeos para estudo da cinética das lipases (Nury et al., 1991, Wang et al., 1988, Verger et al., 1976).

Um modelo para explicar como lipase e substrato micelizado entram em contato e ocorre a catálise foi sugerido por Verger et al. em 1973. O modelo consiste em dois equilíbrios: o primeiro se refere à interação da enzima (E) com a interface água-micela tornando-se ativa (E^*); o segundo consiste na ligação da enzima ativada (E^*) com uma molécula de substrato (S), formando o complexo E^*S . Este modelo é equivalente ao equilíbrio clássico de Michaelis-Menten em duas dimensões. Após a formação do complexo ocorre a catálise, regenerando a enzima na forma ativa e liberando o produto.

Trabalhos reportados em literatura mostram que a cinética algumas vezes obedece a um comportamento similar ao de Michaelis-Menten, com a velocidade de reação sendo proporcional ao aumento da concentração do substrato no sistema. Para se distinguir da cinética clássica de Michaelis-Menten, as constantes são chamadas de “aparentes” (porque o substrato não é solúvel no sistema e a enzima atua na interface). Prazeres et al. (1992) e Castellar et al. (1996) reportaram um comportamento similar ao de Michaelis-Menten para a lipase de *Chromobacterium viscosum*. Kierkels et al. (1990) também reportaram este comportamento para a lipase pancreática de porco, e relataram que a área superficial disponível é o fator mais importante na determinação dos parâmetros cinéticos.

2.1.7. Purificação de lipases microbianas

Diversas estratégias têm sido empregadas para a purificação de lipases e alguns protocolos para purificação de lipases bacterianas estão resumidos na Tabela 2.1. Observa-se nesta tabela que técnicas de precipitação de proteínas geralmente são usadas como primeiro passo de purificação e nestes casos, o sulfato de amônio é o agente de precipitação mais utilizado. A precipitação é seguida de métodos cromatográficos, sendo que a cromatografia de troca iônica é a técnica mais comum, utilizando geralmente dietilaminoetil (DEAE) como trocador aniônico e carboximetil (CM) como trocador catiônico, ou ainda grupos

trocadores fortes como trietilaminoetil, em colunas Mono Q ou Q-Sepharose. Técnicas de gel filtração são freqüentemente empregadas nos passos iniciais da purificação, em seguida da precipitação, ou nos últimos passos. A cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) também está presente na maioria dos protocolos de purificação, sendo utilizadas colunas com agarose com grupos octila ou fenila. De modo geral, para purificar lipases microbianas, alcançando rendimentos de 30% e fatores de purificação em torno de 320 vezes, 4 a 5 passos de purificação são necessários (Gupta et al., 2004, Saxena et al., 2003).

Conforme já referido anteriormente, os métodos de purificação de lipases são dependentes do microrganismo, dos meios e condições de cultura e das características da enzima. Como resultado desta diversidade, não há processos de purificação de aplicação geral. Assim sendo, enzimas produzidas por cepas diferentes do mesmo microrganismo podem apresentar propriedades distintas. Além disso, dependendo do microrganismo, a enzima pode ser intracelular ou extracelular, o que pressupõe estratégias diferentes de purificação, com inserção de uma etapa de rompimento das células, no caso da enzima ser intracelular. A definição das operações de um processo de purificação depende, como já foi dito, do uso da molécula alvo e também de suas características físico-químicas e do tipo de impurezas presentes. Produtos destinados a usos terapêuticos, por exemplo, são obviamente os que requerem maior grau de pureza e, portanto, a complexidade do processo de purificação é elevada. Para a utilização de enzimas em biocatálise, desde que as impurezas presentes no extrato enzimático não interfiram na reação catalisada e na utilização do produto final, processos parciais de purificação podem ser suficientes (Gupta et al., 2004; Kornberg, 1990).

Como pode ser verificado na Tabela 2.1, a formação de agregados de alta massa molar é comumente relatada nos estudos de purificação de lipases. A formação de agregados pode ocorrer devido à presença de lipídeos ou à característica hidrofóbica que a estrutura protéica das lipases apresenta.

TABELA 2.1 – MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES BACTERIANAS

Microrganismo	Métodos de purificação	FP / R (%)	MM	pI	Observação	Referência
<i>Acinetobacter sp.</i>						
<i>A. junii</i> SY-01	-	-	40	-	-	Yoon et al., 2004
<i>Acinetobacter sp.</i> SY-01 (rec.)	Liofilização, Diálise, Q Sepharose, Resource Q, Superdex S-75	- / -	43,8	-	-	Han et al., 2003
<i>Acinetobacter sp.</i> RAG-1	Ultrafiltração, Mono Q, Butyl Sepharose	10,7 / 22,4	33	5,9	Tendência de formação de agregados	Snellman et al., 2002
<i>A. calcoaceticus</i> LP009	Ultrafiltração, Sephadex G-100	4,7 / 74	23	-	-	Pratuangdejkul e Dharmsthiti, 2000
<i>Acinetobacter sp.</i> KM109	Isopropanol 30-60%, Sepharose CL-6B, DEAE Sephacel, TSK G2000SW xL, Mono Q	213 / 0,79	62	-	Monômero	Mitsuhashi et al., 1999
<i>A. calcoaceticus</i> RAG-1	-	- / -	32,5	-	-	Sullivan et al., 1999
<i>A. radioresistens</i> CMC-1	Sulfato de amônio 30-80%, PD-10, Mono Q HR 16/10, Phenyl Sepharose CL-4B	64 / 13	45	5,2	Tendência a formação de agregados	Hong e Chang, 1998
<i>Aeromonas sp.</i>						
<i>Aeromonas sp.</i> LPB4	-	-	50	-	-	Lee et al., 2003
<i>A. sobria</i> LP004	Ultrafiltração, Phenyl Sepharose	9,5 / 7,9	97	-	Forma agregados	Lotrakul e Dharmsthiti, 1997
<i>A. hydrophilla</i> MCC-2 (rec)	Sulfato de amônio 25-50%, PD-10, DEAE Sepharose CL6B, Sephadex G100, CM Sepharose	33 / 17	79,9	-	-	Chuang et al, 1997
<i>A. hydrophila</i>	Sulfato de amônio 20-50%, Sephacryl S200, DEAE 5PW	56 / 12	67	-	Monômeros	Anguita et al., 1993

*FP = Fator de Purificação; R (%) = rendimento em atividade; MM = massa molar, pI = ponto isoelétrico. Traço (-) = não descrito pelo autor.

TABELA 2.1 – MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES BACTERIANAS (CONTINUAÇÃO)

Microrganismo	Métodos de purificação	FP/R(%)	MM	pI	Observação	Referência
<i>Bacillus sp.</i>						
<i>B. acidocaldarius</i>	Sulfato de amônio 60%, Hidroxiapatita, Phenyl Sepharose, Sephadex G-150, Mono Q (2x)	1828 / 11	36,5	4,9	-	Manco et al., 1994
<i>B. thermocatenulatus</i> (rec)	Expressão em <i>E. coli</i> ; Lise e eluição com detergente LDO (A) ou com 2-propanol (B); Cromatografia em coluna Ni-NTA (Ni ²⁺).	6,7 / 60 (A) 5,3 / 20 (B)	40	nd	-	Schlieben et al., 2004
<i>B. thermocatenulatus</i> (rec)	Butil sepharose; Ultrafiltração; TSK G3000	125 / 32	40	7,2	Presença de agregados	Rúa et al., 1997
<i>B. megaterium</i>	-	- / -	65 (I); 19(II) e 58 (III)	5,7 (I), 9,4 (II), 5,5 (III)	-	Ruiz et al., 2002
<i>B. megaterium</i>	Expressão em <i>E. coli</i> ; Cromatografia em coluna Ni-NTA (Ni ²⁺).	- / -	34,6	nd	-	Jung et al., 2003
<i>B. thermocatenulatus</i>	Extração com hexano; Precipitação com metanol; Q-sepharose	67,4 / 11	16	nd	Presença de agregados	Schmidt-Dannert et al., 1994
<i>B. subtilis</i> 168	Sulfato de amônio 2,37 M; Fenil sepharose; Ultrafiltração; Hidroxiapatita	9,5 / 13	19	9,9	Presença de agregados	Lesuisse et al., 1993
<i>B. thermocatenulatus</i> (rec)	Expresso em <i>Pichia pastoris</i> ; Ultrafiltração; Butil Sepharose (eluição com 1% de ácido cítrico); Ultrafiltração.	660 / 18	43	nd	-	Quyên et al., 2003
<i>Bacillus sp</i> 398	Sulfato de amônio 65%; DEAE-Sepharose; Butyl Toyopearl, DEAE-Sepharose	10.300 / 30	50	nd	-	Kim et al., 1994
<i>Bacillus sp</i>	Sulfato de amônio 25%-90%; Diálise com acrinol 20%; DEAE-Sephadex A-50; Toyopearl HW-55F; Butyl Toyopearl 650 M	7760 / 9	22	5,1	Cita material viscoso que é separado pela adição de acrinol	Sugihara et al., 1991
<i>Bacillus sp. RSJ-1</i>	Ultrafiltração; Sulfato de amônio 70%; Q Sepharose; Ultrafiltração; Sephacryl S-200	201,45 / 19,7	37	nd	-	Sharma et al., 2002
<i>B. licheniformis</i> (rec)	Expresso em <i>E. coli</i> ; Liofilização do extrato bruto; Cromatografia em coluna Ni-NTA (Ni ²⁺).	80 / 72	19	9,5	Dados da enzima recombinante	Nthangeni et al., 2001

TABELA 2.1 – MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES BACTERIANAS (CONTINUAÇÃO)

Microrganismo	Métodos de purificação	FP / R (%)	MM	pI	Observação	Referência
<i>Bacillus sp.</i> (continuação)						
<i>B. thermoleovorans</i> ID-1 (lipases A,B)	Sulfato de amônio 80%; DEAE Sepharose; Ultrafiltração; HiLoad 16/60 Superdex 200; Resource PHE; Mono Q	300 / 0,16	18 (A), 43 (B)	nd	Presença de agregados	Lee et al., 2001a
<i>B. thermoleovorans</i> ID-1 (rec)	Expressão em <i>E. coli</i>	- / -	46	nd	-	Cho et al., 2000
<i>B. stearothermophilus</i> P1 (rec)	Expresso em <i>E. coli.</i> ; Ultrafiltração; Q HyperD10	18 / 71	43	nd	-	Sinchaikul et al., 2001
<i>B. subtilis</i>	Sulfato de amônio 90%; Fenil Sepharose; Q Sepharose.	213 / 26,2	45	nd	Presença de agregados	Maqbool et al., 2002
<i>Bacillus sp.</i> THL027	Ultrafiltração; Sephadex G 100	2,6 / 27	69	Nd	Presença de agregados	Dharmstithi e Luchai., 1999
<i>Bacillus sp.</i> H-257	Precipitação com acetona; Octil sepharose (eluição com 0,5% de Adekatol SO-120); Q Sepharose; Superose 12	3028 / 20	25	4,66	-	Imamura e Kitaura, 2000
<i>Bacillus sp.</i>	Fenil Sepharose (gradiente de isopropanol)	43 / -	54-55	nd	-	Zhang et al., 2002
<i>B. stearothermophilus</i>	Ultrafiltração; Sephadex G200; DEAE Servacell	19,2 / 10,2	62,5		Presença de agregados	Kambourova et al., 2003
<i>Lactobacillus plantarum</i> MF32	Mono Q HR 5/5; Superose 12 10/30	182 / 19,4	75	7,5-7,6	-	Andersen e Ostdal, 1995
<i>Chromobacterium sp.</i>						
<i>C. viscosum var. paralipolyticum</i>	Amberlite CG50, Sephadex G75 (2x)	23,5 / 2,8	-	4,7	Lipase A- agregados	Sugiura et al., 1974
<i>C. viscosum</i>	Preparação comercial	- / -	-	7,1 (A e B)	Associação com lipolissacarídeos	Taipa et al., 1995
<i>C. viscosum</i>	Superose 6, Phenyl Sepharose	- / -	33 (A e B)	nd	Lipase A - agregados de alta MM	Taipa et al., 1994
<i>C. viscosum</i>	Sulfato de amônio 50%, Sephadex G100, CM-celulose, DEAE Sephadex A50, CM-celulose	961 / 18	27	6,9	Lipase B - monômero	Sugiura e Isobe, 1974

TABELA 2.1 – MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES BACTERIANAS (CONTINUAÇÃO).

Microrganismo	Métodos de purificação	FP / R(%)	MM	pI	Observação	Referência
<i>Moraxella sp.</i>						
<i>Moraxella</i> TA144 (rec)	-	- / -	34,7	-	-	Feller et al., 1991
<i>Pseudomonas sp.</i>						
<i>P. aeruginosa</i> LST-03	Sulfato de amônio 45%; DEAE Sepharose; Fenil Sepharose (eluição com isopropanol 45%); HiPrep 26/10	34,7 / 12,6	27,1	nd	-	Ogino et al., 2000
<i>P. cepacia</i>	Liofilização, Phenyl Sepharose	4 / 87-100	34,1	4,3	-	Bornscheuer et al., 1994
<i>P. aeruginosa</i> LST-03	Acetona 20%, DEAE Sepharose Fast Flow, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow	- / -	34,8	-	-	Ogino et al., 2004
<i>P. aeruginosa</i>	Ultrafiltração; Tratamento com Chaps; Isoeletrofocalização.	1264 / 15	29	5,8	Agregados de lipase e lipopolissacarídeos	Stuer et al., 1986
<i>P. cepacia</i>	Tratamento com acrinol 1%; Ultrafiltração; Macro-Prep metil HIC; Sephacryl S-100 HR	1120 / 54	36,5	5,1	Material viscoso separado pela adição de acrinol	Sugihara et al., 1992
<i>P. cepacia</i>	Ultrafiltração, Sephacryl S300, isopropanol 40%, extração líq.-líq, Phenyl Sepharose	400 / 30	33	nd	Presença de agregados	Dünhaupt et al., 1992
<i>P. fluorescens</i> HU380	Ultrafiltração, Phenyl Toyopearl, DEAE Sepharose, Superdex 200HR	24,3	64	4,3	-	Kojima e Shimizu., 2003
<i>P. fluorescens</i> 2D	Sulfato de amônio 80%, Phenyl Sepharose CL 4B, Sephadex G100 e G75	25 / 11	42	4,6-4,9	-	Makhzoum et al., 1996
<i>P. fluorescens</i>	Sulfato de amônio 35%, DEAE celulose, Sephadex G75, DEAE celulose (2x)	521 / 13,7	32	4,6-4,9	-	Sugiura et al., 1977
<i>P. fragi</i> CRDA 037 (exolipase)	Sulfato de amônio 20-40% - exolipase; 40-60% - endolipase	1 (exo), 1,2 (endo) / 43	25,5 (exo)	nd	-	Schuepp et al., 1997
<i>P. fragi</i>	HCl até pH 4, sulfato de amônio 20-40%, DEAE Toyopearl 650 M, DEAE Sepharose CL 6B	67,4 / 47,6	33	6,9	-	Nishio et al., 1987

TABELA 2.1 – PROTOCOLOS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES BACTERIANAS (CONTINUAÇÃO)

Microrganismo	Métodos de purificação	FP / R (%)	MM	pI	Observação	Referência
<i>Pseudomonas sp.</i>						
(Continuação)						
<i>P. luteola</i>	Extração com PEG, DEAE Toyopearl, Acetona 90%, Toyopearl HW-55F	17 / 16	42	nd	Material viscoso no sobrenadante de cultura	Litthauer et al., 2002
<i>P. mendocina</i> PK-12CS	Acetona 35-60%, DE-52 (2x)	241 / 14,8	80	nd	Presença de agregados	Jinwal et al., 2003
<i>Pseudomonas sp.</i>	Sulfato de amônio 60%, DEAE celulose, DEAE Toyopearl 650 M	406 / 13	30	nd	Forma monomérica	Yamamoto e Fujiwara, 1988
<i>Pseudomonas sp.</i> B11-1 (rec.)	DEAE celulofine	-	69	nd	Tetrâmeros ou agregados maiores	Suzuki et al., 2003
<i>Pseudomonas sp.</i> LP7315	Sulfato de amônio 45%, DEAE Toyopearl 650 M, eletroforese preparativa	64,1 / 12	59	nd	-	Sakiyama et al., 2001
<i>Pseudomonas sp.</i> ATCC21808	-	- / -	110	4,5-4,6	-	Kordel et al., 1991
<i>Propionibacterium sp.</i>						
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>Freudenreichii</i> ITG 4	DEAE celulose, Mono Q pH 8,5, Mono Q pH 7, Sephacryl S-300	14 / 2,7	47,4	-	Monômero	Kakariari et al., 2000
<i>P. acidi-propionici</i>	Sulfato de amônio 70%, Sephadex G-50, Sephadex G-25	52,4 / 27	8	-	-	Sarada e Joseph, 1992
<i>P. acnes</i>	-	- / -	46,7	-	-	Ingham et al., 1981
<i>Proteus sp.</i>						
<i>P. vulgaris</i> K80	Sulfato de amônio 30-50%, CM-Sepharose (2x)	300 / 25	31	-	-	Kim et al., 1996a
<i>Staphylococcus sp.</i>						
<i>S. aureus</i>	-	- / -	45	-	-	Jung et al., 2002
<i>S. simulans</i>	Sulfato de amônio 70%, Sephacryl S200, CM Sephadex, Superose 12	397 / 26,4	45	-	Presença de tetrâmeros	Sayari et al., 2001
<i>Staphylococcus sp.</i>	Sulfato de amônio 60%, Q Sepharose, Superose, Mono S	- / -	44	-	-	Lee et al., 2001b

TABELA 2.1 – MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES BACTERIANAS (CONTINUAÇÃO)

Microrganismo	Métodos de purificação	FP / R (%)	MM	pI	Observação	Referência
<i>Staphylococcus sp.</i>						
<i>S. warneri</i> 2 (rec.)	Expressão em <i>E. coli</i> ; Cromatografia em coluna Ni-NTA (Ni ⁺²), hidroxiapatita.	- / 40	45	-	Produz 2 isoformas	van Kampen et al., 2001
<i>S. haemolyticus</i> (rec)	Sulfato de amônio 80%, DEAE Sepharose CL 6B, CM Sepharose CL-6B, Resource S	- / 42	45	9,7	-	Oh et al., 1999
<i>S. hycus</i> (rec)	-	- / -	46	-	-	Drouault et al., 2000
<i>S. epidermidis</i> (rec)	Sulfato de protamina, Sulfato de amônio 40-80%, Niquel nitrila-triacetato, Sephadex G75	37 / -	43	-	-	Simons et al., 1998
<i>S. warneri</i>	Sulfato de amônio 50%, DEAE Sepharose, Phenyl Sepharose	229 / 7,4	45	6,8; 7,1; 7,4	-	Talon et al., 1995
<i>S. aureus</i>	Sulfato de amônio 80%, Octyl Sepharose CL4B	957 / 5,6	43	-	Presença de agregados	Rollof et al., 1987
<i>S. aureus</i>	Sulfato de amônio 50%, Octyl Sepharose CL4B	- / -	44, 43 e 33	-	Presença de agregados	Jürgens et al., 1981
<i>S. aureus</i> 226	Sulfato de amônio 70%, Hidroxiapatita, ultrafiltração, Sephadex G200 e G150	385 / 25,3	34	9,7	-	Muraoka et al., 1982
<i>Streptococcus sp.</i>						
<i>Streptococcus sp.</i> N1 (rec)	Sulfato de amônio 60%	- / -	39,4	-	-	Tripathi et al., 2004
<i>S. faecalis</i>	Sulfato de amônio 50%, Sephadex G-25, Acetona 60%, Sephadex G-25, DEAE celulose	140 / 30	20,9	3,6	-	Chander et al., 1979
<i>Serratia sp.</i>						
<i>S. marcescens</i>	CM-celulose, DEAE celulose, Sephadex G-150	17,6 / 45,4	52	-	-	Abdou, 2003
<i>S. marcescens</i> MK-1	-	- / -	43	-	-	Kim et al., 1996b
<i>S. marcescens</i> (rec)	Mono Q HR 5/5, Butyl Sepharose CL,	- / -	64	5,8	-	Li et al., 1995
<i>S. marcescens</i>	Ultrafiltração, sulfato de amônio 35%, DEAE Toyopearl 650 M, Sephacryl S-300, Phenyl Toyopearl 650 M	21 / 20	62	4,6	-	Matsumae e Shibatani, 1994
<i>Vibrio sp.</i>						
<i>V. vulnificus</i> (rec)	-	- / -	31	-	-	Su et al., 2004
<i>V. harveyi</i> (rec)	Cromatografia em coluna Ni-NTA (Ni ⁺²)	- / -	61	-	-	Teo et al., 2003

2.1.8. Características bioquímicas de lipases bacterianas

De maneira geral, a massa molar de lipases bacterianas varia entre 25 e 65 kDa e o ponto isoelétrico (pI) é bastante diverso variando entre 4,0 e 10,0 como observado na Tabela 2.1. Há apenas um exemplo de lipase bacteriana com baixa massa molar: a lipase de *P. acidi-propionici* de 8 kDa (Sarada et al., 1992).

Muitas lipases bacterianas atuam em uma faixa de pH alcalino. Das 76 lipases apresentadas na Tabela 2.2, 30 apresentam atividade máxima numa faixa de pH entre 8,5 e 11,5. Para a estabilidade, os resultados são diversos, provavelmente devido a diferenças quanto ao tempo e temperatura de incubação. Além de estabilidade na faixa básica, também verifica-se estabilidade em valores de pH fortemente ácidos (pH 2,0) a fortemente alcalinos (pH 12,0). São exemplos de lipases bacterianas estáveis em ampla faixa de pH as produzidas por *B. megaterium* (Ruiz et al., 2002) e *Bacillus* sp BP-6Lip A (Ruiz et al., 2003), estáveis entre pH 4,0 e 12,0; por *P. cepacia* (Sugihara et al., 1992), estável entre pH 3,0 e 11,5 e por *S. epidermidis* (Simons et al., 1998), estável entre pH 2,0 e 10,0.

Existem exemplos de lipases bacterianas com atividade em temperaturas elevadas (entre 40 e 70 °C), sendo inclusive encontradas enzimas com atividade acima de 70 °C, como as de *B. thermoleovorans* (Cho et al., 2000), *Bacillus* sp. H-27 (Imamura e Kitaura, 2000), *B. stearothermophilus* (Kambourova et al., 2003), *B. thermocatenulatus* (Quyen et al., 2003).

A termoestabilidade é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial, como lipases, uma vez que muitos processos usam temperaturas em torno de 50 °C. Lipases microbianas têm sido estudadas com relação à termoestabilidade. Entretanto, não há padronização nas metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais. O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa. Há alguns exemplos de lipases estáveis em temperaturas acima de 70 °C, como as

lipases de *Bacillus circulans* (Kademi et al., 2000) e *Pseudomonas cepacia* (Sugihara et al., 1992).

A literatura relata que a especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (Jensen et al., 1983). Há vários tipos de especificidade: i) quanto ao substrato: uma enzima pode apresentar diferentes taxas de hidrólise sobre triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis; ii) posicional: a hidrólise ocorre diferentemente sobre ésteres primários, secundários ou terciários, ou pode ser inespecífica, liberando ácidos graxos das três posições; iii) quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato: preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações; iv) estereoespecificidade: discriminação entre enantiômeros no caso de substratos racêmicos. Pode-se observar também a combinação de todos estes tipos citados.

Diversos estudos sobre especificidade de lipases podem ser encontrados na literatura. Lipases de *B. stearrowthermophilus* MC 7, por exemplo, apresentam maior especificidade frente a tributirina do que frente a trioleína (Kambourova et al., 2003). Lipase de *B. thermoleovorans* ID-1 (BTID-A) tem maior especificidade por diacilgliceróis do que pelo triacilglicerol correspondente (Lee et al., 2001a).

TABELA 2.2 - CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LIPASES BACTERIANAS

Microrganismo	Substrato	Atividade		Estabilidade		Referência
		pH	Temp °C	pH	Temperatura °C	
<i>Bacillus sp.</i>						
<i>B. thermocatenulatus</i>	Trioleína (1); Tributirina (2); <i>p</i> NPPalmitato (3)	8,5 (1); 8,0 (2)	65 (1); 55 (2)	9 (100%, 14h, 30 °C) (3)	50 (90%, 30 min, pH 9) (3)	Rúa et al., 1997
<i>B. circulans</i> (esterase)	<i>p</i> NPCaprato	8,0	60	8-10 (1h)	70 (100%, 1h)	Kademi et al., 2000
<i>Bacillus GK8</i>	<i>p</i> NPLaurato	8,0	45-50	7-10 (1h)	50 (100%, 1h)	Dosanjh e Kaur, 2002
<i>B. megaterium</i>	MUF-butirato	7,0	45	4-12 (1h)	50 (9,1%, 1h)	Ruiz et al., 2002
<i>B. thermocatenulatus</i>	Óleo de oliva (1); <i>p</i> NPPalmitato (2)	8,0 (1)	60-70 (1); 65 (2)	7-9 (16,5h, 30 °C) (2)	40 (100%, 30 min) (2)	Schmidt-Dannert et al., 1994
<i>B. subtilis</i>	Tributirina (1); <i>p</i> NPPalmitato (2)	10 (1)	35 (2)	12 (100%, 24h) (2)	40 (100%, 30 min) (2)	Lesuisse et al., 1993
<i>B. acidocaldarius</i>	<i>p</i> NPValerato	8	70	nd	60 (100%, 90 min)	Manco et al., 1994
<i>B. thermoleovorans</i> ID-1 (lipases A e B)	Tricaprilina	9 (A) 8-9 (B)	60 (A); 65 (B)	6-8 (24h)	50 (A), 70 (B) (100%, 30 min)	Lee et al., 2001a
<i>B. thermoleovorans</i> ID-1 (rec)	<i>p</i> NPButirato	7-8	75	nd	50 (100%, 2,5h)	Cho et al., 2000
<i>Bacillus sp.</i> RSJ-1	<i>p</i> NPButirato	8,0	50	8-9 (1h)	50 (100%, 1 h)	Sharma et al., 2002
<i>B. licheniformis</i> (rec)	<i>p</i> NPPalmitato	10-11,5	50-60	7-12 (4h, 30 °C)	45 (90%, 30 min)	Nthangeni et al., 2001
<i>B. stearothermophilus</i> P1 (rec)	<i>p</i> NPCaprato	8,5	55	nd	65 (100%, 1h)	Sinchaikul et al., 2001
<i>B. subtilis</i>	Tributirina	8,0	37	6-10 (2h, 25 °C)	40 (1h)	Maqbool et al., 2002
<i>Bacillus sp.</i> THL027	Óleo de oliva	7,0	70	7 (1h)	60-75 (80%, 1h)	Dharmstithi e Luchai, 1999
<i>B. stearothermophilus</i> (rec)	Óleo de oliva	nd	68	nd	55 (100%, 30min)	Kim et al., 2000
<i>Bacillus sp.</i> H-27	Monolauroilglicerol	6-8	75	7-10 (70 °C, 10 min)	60 (10 min)	Imamura e Kitaura, 2000
<i>B. alcalophilus</i>	Tributirina	10,6	60	10 (1h, 60 °C)	60 (100%, 1h)	Ghanem et al., 2000
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>p</i> NPPalmitato	7,5-9	75-80	7,5-9,5 (30 min, 60 °C)	65 (100%, 30 min)	Kambourova et al., 2003
<i>B. thermocatenulatus</i> (rec)	Tributirina (1); Trioleína (2); <i>p</i> NPP (3)	7,5 (1); 9 (2)	65 (1); 75 (2)	7 – 11 (3)	50 (100%, 30 min., pH 9) (3)	Quyen et al., 2003
<i>Bacillus sp.</i> BP-6LipA	MUF-butirato	7	45	4-12 (1h)	50 (91%, 1h)	Ruiz et al., 2003
<i>Bacillus sp.</i>	Óleo de oliva	5,6	30	5-12 (24h)	65 (100%, 30 min)	Sugihara et al., 1991

*MUF = metil umbeliferil

TABELA 2.2.-CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LIPASES BACTERIANAS (CONTINUAÇÃO).

Microrganismo	Substrato	Atividade		Estabilidade		Referência
		pH	Temp °C	pH	Temperatura °C	
<i>Pseudomonas sp.</i>						
<i>P. aeruginosa</i> LST-03	Dimercaptopropanol 1 tributirato (1), tributirina (2)	6-7 (2)	37 (1)	5-8 (10 min, 30 °C) (1)	40 (100%, 10 min, pH 8) (1)	Ogino et al., 2000
<i>P. aeruginosa</i> LST-03	Tributirina	6-7	35	5-8 (10 min, 30 °C)	35 (100%, 10 min, pH 8)	Ogino et al., 2004
<i>P. cepacia</i>	Óleo de oliva	5,5-6,5	55-60	3-11,5 (24 h, 30 °C)	75 (100%, 30 min., pH 6,5)	Sugihara et al., 1992
<i>P. cepacia</i>	pNPPalmitato	nd	45-50	nd	50 (95%, 1h)	Pencreac'h et al., 1997
<i>P. fluorescens</i> HU380	Óleo de oliva	8,5	45	6-7 (24 h, 30 °C)	40 (100%, 1 h)	Kojima et al., 2003
<i>P. fluorescens</i> 2D	Tributirina (1)	8,5 (1)	35-45 (1)	nd	120-140 (D = 836 e 207 s ^{**})	Makhzoum et al., 1996
<i>P. fluorescens</i>	Óleo de gergelim	7	nd	5-11 (80%, 37 °C, 1 h)	40 (30 min)	Sugiura et al., 1977
<i>P. fragi</i> CRDA 037	triacetina	8,75	25-30	nd	nd	Schuepp et al., 1997
<i>P. fragi</i>	Óleo de oliva	9	65	6,5-10,5 (24 h, 30°C)	56 (100%, 30 min, pH9)	Nishio et al., 1987
<i>P. fragi</i>	Coconut oil	7,5-9	54	nd	62 (73%, 1 h)	Lu e Liska, 1969
<i>P. luteola</i>	pNPP	8,5-9,5	50-60	9 (24h)	65 (t _{1/2} 116 min)	Litthauer et al., 2002
<i>P. mendocina</i> PK-12CS	pNPP	8	37	7,6-8,6 (14 h, 37 °C)	45 (50%, 1h)	Jinwal et al., 2003
<i>Pseudomonas sp.</i> B11-1 (rec.)	pNPButirato (1) e Tributirina (2)	8 (2)	40 (1)	2,2-11,9 (1)	30 (90%, 1h) (1)	Suzuki et al., 2003
<i>Pseudomonas sp.</i>	Óleo de oliva	7	60	9-10 (4 °C, 22h)	35 (100%, 30 min) (1)	Yamamoto e Fujiwara, 1988
<i>Pseudomonas sp.</i> LP7315	pNPLaurato (1) monopalmitina (2)	8-9 (2)	70 (1)	7-8 (65 °C, 1h) (2)	65 (100%, 1h) (1)	Sakiyama et al., 2001
<i>Chromobacterium sp.</i>						
<i>C. viscosum var. paralipolyticum</i>	Óleo de oliva	6,5-7	nd	5-8 (20 min, 37 °C)	50 (90%, pH 7, 20 min)	Sugiura et al., 1974
<i>C. viscosum</i>	Óleo de oliva	6,5	70	4-11 (20 min, 37 °C)	40 (20 min)	Sugiura e Isobe, 1974
<i>C. viscosum</i> B-7	Óleo de oliva	6,5	60-70	5-8 (90%, 24 h, 37 °C)	60 (100%, 10 min, pH 7)	Yamaguchi et al., 1973
<i>Proteus sp.</i>						
<i>P. vulgaris</i> K80	Óleo de oliva	10	60	5-11 (1h)	40 (100%, 30 min)	Kim et al., 1996b

** D=tempo necessário para 90% de inativação.

TABELA 2.2 - CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LIPASES BACTERIANAS (CONTINUAÇÃO)

Microorganismo	Substrato	Atividade		Estabilidade		Referência
		pH	Temp °C	pH	Temperatura °C	
<i>Acinetobacter sp.</i>						
<i>A. junii</i> SY-01	-	7-9	45-50	6-9	70 (73%, 1h)	Yoon et al., 2004
<i>Acinetobacter sp.</i> SY-01(rec.)	<i>pNPCaproato</i>	10	50	9-11	nd	Han et al., 2003
<i>Acinetobacter sp.</i> n.6 (rec.)	<i>pNPButirato</i>	7,8	50	7,3-8,6 (24 h)	40 (100%, 60 min.)	Wei et al., 2003
<i>Acinetobacter sp.</i> RAG-1 (rec)	<i>pNPPalmitato</i>	9	55	5,8-9	-	Snellman et al., 2002
<i>Acinetobacter sp.</i> n.6	2,3-dimercaptopropan-1-ol tributirato	nd	20	nd	50 (50%, pH 7, 30 min)	Suzuki et al., 2001
<i>A. calcoaceticus</i> LP009	Óleo de oliva	7	50	4-8 (85/100%, 2h, 4°C)	45	Pratuangdejkul e Dharmsthiti, 2000
<i>Acinetobacter sp.</i> KM109	<i>pNPButirato</i>	8	45	6-8	35	Mitsuhashi et al., 1999
<i>A. radioresistens</i> CMC-1	<i>pNPPalmitato</i>	10,5	40	8-11	nd	Hong e Chang, 1998
<i>A. radioresistens</i>	Óleo de oliva	10	nd	6-10	50 (80%, 60 min)	Chen et al., 1998
<i>Propionibacterium sp.</i>						
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>Freudenreichii</i> ITG 4	α -Naftil acetato	6	65	nd	nd	Kakariari et al., 2000
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	Tributirina	6,8	45	nd	nd	Dupuis et al., 1993
<i>P. acidi-propionici</i>	Tributirina	7	30	nd	nd	Sarada e Joseph, 1992
<i>P. acnes</i>	Trioleína	6,8	nd	5-6 (75%, 1h, 37 °C)	40 (90%, 30 min, pH 6)	Ingham et al., 1981
<i>Streptococcus sp.</i>						
<i>Streptococcus sp.</i> N1 (rec)	<i>pNPPalmitato</i> (1) Óleo de oliva (2)	8,4 (2)	37 (1)	9,5-10,5 (50%, 96 h) (1)	45 (50%, 120 min) (1)	Tripathi et al., 2004
<i>S. faecalis</i>	Tributirina	7,5	40	6-8 (1h)	50 (95%, 10 min)	Chander et al., 1979

TABELA 2.2 - CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LIPASES BACTERIANAS (CONTINUAÇÃO)

Microrganismo	Substrato	Atividade		Estabilidade		Referência
		pH	Temp °C	pH	Temperatura °C	
<i>Staphylococcus sp.</i>						
<i>S. aureus</i>	Óleo de oliva	8-8,5	42	5-11	55	Jung et al., 2002
<i>S. simulans</i>	Óleo de oliva	8,5	37	4-9	60	Sayari et al., 2001
<i>Staphylococcus sp.</i>	ésteres de pNP	8,5	28	5-11 (24 h)	nd	Lee et al., 2001a
<i>S. warneri</i> 2 (rec.)	pNPButirato	7	nd	5,5-10 (90%, 24 h)	nd	van Kampen et al., 2001
<i>S. haemolyticus</i>	Óleo de oliva	8,5	28	5-11 (24 h, 4 °C)	50 (100%, Ca ⁺² , 30 min)	Oh et al., 1999
<i>S. epidermidis</i> (rec)	Tributirina	6	nd	2-10 (2 h, 90%)	nd	Simons et al., 1998
<i>S. aureus</i> (rec.)	Tributirina	6,5	nd	nd	nd	Simons et al., 1996
<i>S. warneri</i>	Tributirina	9	25	5-10 (1h, 4 °C)	40 (70%, 30 min)	Talon et al., 1995
<i>S. aureus</i>	Trioleína	nd	33	nd	60 (90%, 10 min)	Rollof et al., 1987
<i>S. aureus</i> 226	Trioleína	6	60	5-10 (1 semana, 4°C)	50 (95%, 30 min)	Muraoka et al., 1982
<i>Moraxella sp.</i>						
<i>Moraxella</i> TA144(rec)	nd	nd	40	nd	nd	Feller et al., 1991
<i>Moraxella</i> TA30	pNPLaurato	nd	40	nd	60 (25%, 2 h)	Feller et al., 1990
<i>Aeromonas sp.</i>						
<i>A. sobria</i> LP004	pNPP(1)Óleo oliva (2)	6 (2)	45 (2)	6-10 (90%, 4 °C, 2h) (1)	40 (100%, 15 min) (1)	Lotrakul e Dharmsthiti, 1997
<i>A. hydrophilla</i> (rec)	pNPButirato	7,5-8,5	37	nd	55 (20%, 30 min)	Chuang et al, 1997
<i>A. hydrophila</i>	Tributirina	7,2	37	nd	55 (90%, 30 min)	Anguita et al., 1993
<i>Serratia sp.</i>						
<i>S. marcecens</i>	tributirina	8-9	37	8	80 (15%, 5 min)	Abdou, 2003
<i>S. marcecens</i> MK-1	-	8,5	50	nd	70 (1h)	Kim et al., 1996a
<i>S. marcecens</i> (rec)	pNPPalmitato	6-10	nd	nd	nd	Li et al., 1995
<i>S. marcecens</i>	Óleo de oliva	8	45	6-8	45 (100%, 1h, pH 8)	Matsuma e Shibatani, 1994
<i>Vibrio sp.</i>						
<i>V. harveyi</i> AP6 (rec)	pNPPalmitato	8-9	37	nd	nd	Teo et al., 2003

2.1.9. Lipases em biocatálise

Do ponto de vista biotecnológico, a utilização de sistemas reacionais em solventes orgânicos apresenta muitas vantagens, como alta solubilidade dos substratos e produtos, reversão da reação hidrolítica e modificação da especificidade da enzima (Klibanov, 2001, Zacks e Klibanov, 1985), o que justifica a pesquisa sobre a utilização de enzimas em ambientes “aquos-restritos”. A princípio, a capacidade de catalisar reações em meio de solvente orgânico foi descrita como característica principalmente de lipases. Atualmente, diversas enzimas são utilizadas em escala industrial em reações sintéticas e de isomerização, como a produção de xaropes de milho com alto teor de frutose, pela ação da xilose isomerase, que catalisa a isomerização de D-glucose a D-frutose, e a preparação de penicilina semi-sintética catalisada pela penicilina amidase (Schmid et al., 2001). Apesar das vantagens do emprego de sistemas não-aquosos para biocatálise, as enzimas geralmente mostram baixa atividade catalítica nestes meios, em comparação com soluções aquosas nativas. Portanto, ainda existem muitos problemas relacionados com a aplicação de enzimas em meio de solvente orgânico, que passaremos a discutir a seguir.

Na natureza, as enzimas normalmente funcionam em soluções aquosas. Por isso, quase todos os estudos realizados em enzimologia têm sido realizados em meio aquoso. De fato, a água participa direta ou indiretamente em todas as interações não-covalentes que mantêm a estrutura nativa cataliticamente ativa da enzima. Uma vez removida a água, deveria ocorrer uma distorção drástica da conformação com a inativação da enzima. Entretanto, mantendo-se um número mínimo de moléculas de água suficientes para manter a conformação, é possível manter a atividade catalítica em meio de solvente orgânico. Assim, perde-se a flexibilidade conformacional, mas mantém-se a estrutura nativa. Esta perda de flexibilidade da enzima pode ter um efeito benéfico sobre a atividade, sendo atribuído a este fator o aumento da estabilidade à temperatura em ambientes aquos-restritos (Carvalho e Cabral, 2000).

A utilização de lipases tem sido limitada por alguns fatores como instabilidade enzimática (à temperatura ou a solventes orgânicos), dificuldade de recuperação da enzima, insolubilidade da enzima e resolução cinética limitada. Para contornar estas dificuldades, diferentes estratégias têm sido propostas, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas e materiais para a imobilização de enzimas, a utilização de sistemas de micelas reversas, que preservam o número de moléculas de água necessárias à manutenção de sua estrutura, ou ainda a modificação das características enzimáticas por mutagênese sítio-dirigida ou por evolução dirigida (Gupta et al., 2004).

Um sistema de micelas invertidas é definido como um sistema ternário composto de água, solvente orgânico e do surfactante (Figura 2.5). Estes sistemas, além de serem utilizados como técnica de purificação de proteínas, também têm sido utilizados como estratégia alternativa para o desenvolvimento de reações sintéticas em meio orgânico. Neste sistema, o tamanho da micela pode ser controlado pelo parâmetro W_0 , que é a razão molar entre água e surfactante ($W_0 = [H_2O]/[AOT]$) (Carvalho e Cabral, 2000). A vantagem alegada do sistema é que as enzimas são solubilizadas em meio orgânico com o auxílio de tensoativos, que permitem a incorporação de certa quantidade de água necessária à manutenção da atividade enzimática, provendo um ambiente similar à sua situação "in vivo" (Fernandes et al., 2004; Krieger et al., 1999; 1997 a, b). Além disso, a presença do surfactante evita o contato direto entre enzima e solvente, reduzindo o risco de desnaturação. O sistema composto pelo surfactante aniônico AOT (dioctil sulfosuccinato de sódio) em isooctano é o mais comumente utilizado, isto porque o AOT é um surfactante aniônico e não necessita de um co-surfactante (um álcool alifático, por exemplo) para solubilizar grandes volumes de água. A biocatálise em micelas reversas pode ser particularmente vantajosa para a conversão de substratos insolúveis em água, além do que, grande quantidade de substrato pode ser solubilizada e a área interfacial entre a água e o solvente é mantida alta quando comparado a outros sistemas bifásicos (Melo et al., 2000). Nestes sistemas, muitas enzimas mantêm sua atividade catalítica,

como por exemplo a quimotripsina, tripsina, lisozima, ribonuclease, pirofosfatase, peroxidase, álcool desidrogenase, lactato desidrogenase, piruvato quinase, citocromo c, catalase, lipase e glicose oxidase (Fernandes et al., 2004; Marhuenda-Egea et al., 2002, Kamyshny et al., 2002, Marhuenda-Egea et al., 2001, Krieger et al., 1997 a e b, Martinek et al., 1982).

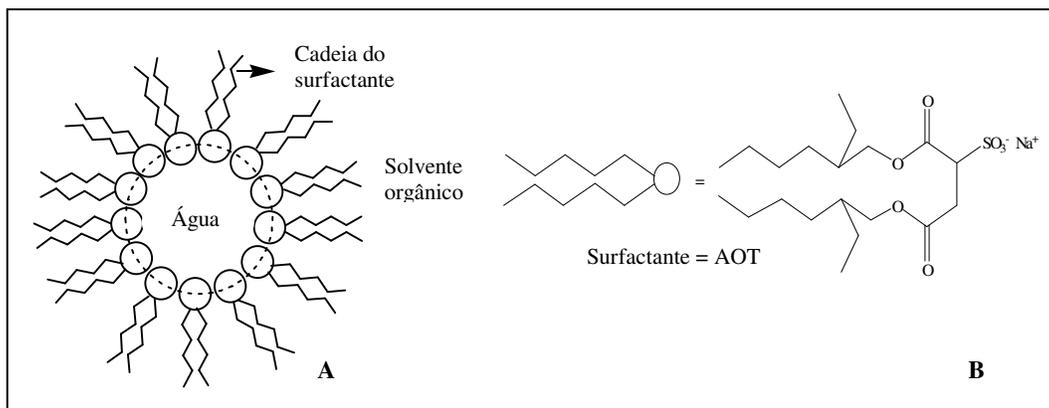


Figura 2.5. A) Representação de uma micela reversa em sistema AOT/isooctano. B) Fórmula estrutural do detergente AOT (diocilsulfosuccinato de sódio).

2.1.10. Lipases - enzimas de interesse industrial

As propriedades das enzimas, tais como seletividade, atuação em condições brandas, catálise sem geração de produtos tóxicos ou poluentes, economia de água e energia, tornou-as de grande interesse para aplicação em processos industriais (Schmid et al., 2002).

O desenvolvimento dos processos de fermentação durante a última parte do Século XX propiciou a produção de enzimas através do uso de cepas selecionadas e tornou possível a obtenção de enzimas purificadas e bem caracterizadas, mesmo em escala industrial. Novas tecnologias como a recombinação gênica, a engenharia de proteínas e a evolução dirigida propiciaram a obtenção de enzimas com características (atividade, estabilidade, seletividade, especificidade) novas e mais dirigidas a substratos e condições de interesse industrial, promovendo a expansão da aplicação de enzimas. Entre as maiores empresas produtoras de enzimas estão a Amano Pharmaceuticals

(Japão), Novozyme (Dinamarca), Genencor International (USA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e Meito Sankyo (Japão).

As enzimas hidrolíticas constituem a principal classe de enzimas empregadas na indústria, sendo que as lipases se diferenciam por catalisar reações de síntese, além das suas reações hidrolíticas naturais sobre lipídeos, o que as torna atrativas para aplicações em segmentos industriais bastante diversificados.

O uso de lipases como aditivos em detergentes ainda representa a maior aplicação industrial destas enzimas (Kirk et al., 2002). Entretanto, a capacidade hidrolítica das lipases têm sido explorada em vários outros campos de atividade, como, por exemplo, na indústria de papel e celulose para a remoção do *pitch*. *Pitch* é o termo usado para descrever todo tipo de material hidrofóbico da madeira, como triacilgliceróis e ceras, que são indesejáveis na manufatura de papel (Jaeger e Reetz, 1998).

A ação de lipases sobre lipídeos também encontra aplicação no tratamento de efluentes. As lipases poderiam ser utilizadas para a remoção de óleo presente nas águas residuárias de fábricas, restaurantes e residências, ou proveniente de indústrias de refinação de óleos e que poluem solos e águas (Cammarota et al., 2001, Pandey et al., 1999 e Jaeger e Reetz, 1998). Existem experiências descritas sobre o cultivo de microrganismos lipofílicos em águas residuárias para a remoção de filmes de gordura (DeFelice et al., 1997, Vitolo et al., 1998). As lipases também podem ser utilizadas na remoção de depósitos de gordura que se formam em sistemas de tubulação de água quente, bebidas ou alimentos líquidos (Pandey et al., 1999).

Lipases e proteases têm sido responsáveis pelo desenvolvimento de aromas em queijos e derivados, bebidas alcoólicas, achocolatados e sobremesas, pela hidrólise seletiva de triacilgliceróis e liberação de ácidos graxos, que atuam como flavorizantes ou como precursores destes (Jaeger e Reetz, 1998).

As lipases são as enzimas de escolha para processamento de óleos e gorduras. A posição e o grau de insaturações e o tamanho da cadeia influenciam

não somente nas propriedades físico-químicas de um dado triglicerídeo, mas também nos seus valores nutricionais e sensoriais. Lipases têm sido utilizadas para hidrólise seletiva de ácidos graxos, seguida da síntese de novas ligações éster, construindo assim triacilgliceróis com características distintas das originais e de interesse para um dado alimento. Assim, pela ação de uma enzima lipolítica, um triacilglicerol que inicialmente constituía-se, por exemplo, dos ácidos palmítico-oléico-esteárico, pode tornar-se esteárico-oléico-esteárico, com modificação das propriedades funcionais do produto (Jaeger e Reetz, 1998, Pandey et al., 1999).

Entretanto, apesar do uso de lipase imobilizada na transesterificação de óleos ter sido descrito na década de 1980, os custos do processo ainda não são viáveis para introdução em larga escala, por exemplo, para a produção de margarina. Embora a produção da enzima esteja muito mais eficiente, os custos de imobilização ainda permanecem um obstáculo (Kirk et al., 2002). Lipases para processamento de óleos e gorduras têm sido comercializadas pela Amano (www.amano-enzyme.co.jp).

Hoje, processos enzimáticos estão sendo utilizados em parceria com processos químicos ou mesmo estão substituindo os processos químicos tradicionais. Há inúmeros exemplos de indústrias químicas e farmacêuticas, na Europa e no Japão, que adotaram enzimas em suas linhas de produção. Entre as européias estão a Ciba, Lonza, Baxeden, Avecia, Biochimie, Brudel Zink, Windel, Cereol, BASF, Chirotech, Degussa, DSM, Novartis e Roche (Schmid et al., 2002). Entre as japonesas estão Ajinomoto, Mitsubishi Chemical, Kyowa Hakko Kogyo, Shin Mitsui Sugar, Tosoh Corporation, Nissin Sugar, Toho Rayon e The Nissin Oil Mills (Ogawa e Shimizu, 2002).

O emprego de enzimas, e em especial de lipases, nas indústrias químicas e farmacêuticas vem crescendo nos últimos anos. Além de hidrólise regioseletiva, acilação e transesterificação, uma crescente variedade de processos enantiosseletivos tem sido relatada. As lipases catalisam reações sobre substratos pró-quirais e resolução cinética de misturas racêmicas, atuando sobre

diferentes grupos funcionais, como álcoois e ésteres carboxílicos quirais ou pró-quirais, cianonidrinias, cloridrinias, dióis, α e β - hidroxí ácidos, aminas, diaminas e amino-álcoois. A Tabela 2.3 apresenta exemplos de reações catalisadas por lipases já incorporadas, ou que serão em breve, em processos industriais (Jaeger e Eggert, 2002 e Jaeger et al., 1999).

TABELA 2.3 - ALGUNS EXEMPLOS DE APLICAÇÕES DE LIPASES EM BIOCATALÍSE

Aplicações	Referência
Resolução do (R,S)- 1 - feniletanol	Suan e Sarmidi, 2004
Resolução cinética do 1-trimetilsililetanol	Wu et al., 2004
Hidrólise de um metil éster para a obtenção do ácido 4-etil-(2-(1,3 dioxi-1,3-dihidro-2-isoindolil))-fenóxi acético (anti asma)	Bevilaqua et al., 2004
Esterificação de citronelil pela lipase de <i>Rhizopus</i> sp	Macedo et al., 2004
Esterificação para a síntese de palmitato e miristato de isopropila (para cremes e lubrificantes)	Krishna, 2002; (Uniquema)
Obtenção do (3R,4S) acetato de azetidinona (usado na síntese do paclitaxel)	Krishna, 2002; (Bryistol-Meyers-Squib)
Acetilação para obtenção do Hidroxí metil glutaril coenzima A (HMG-CoA)	Krishna, 2002; (Bryistol-Meyers-Squib)
Hidrólise de intermediários da síntese de carbovir (anti-HIV) e brefeldin A (anti-fúngico)	Krishna, 2002; (Chiroscience)
Hidrólise de intermediários da síntese de S-Ibuprofeno	Krishna, 2002; (Sepracor)
Acilação enantio-específica de álcoois e séc-aminas racêmicas	Schmid et al., 2002; (BASF)
Proteção seletiva de grupos hidroxil de diferentes açúcares	Carrea e Riva, 2000, Riva et al., 1988
Esterificação de ácido ascórbico com carotenóide (bixina)	Humeau et al., 2000
Síntese quimio-enzimática de análogos de gangliosídeos	Zhang et al., 1999
Acilação da digitonina	Danieli et al., 1999
Síntese de tioésteres de aromas com cadeia curta	Cavaille-Lefebvre e Combes, 1997
Resolução cinética de metil ésteres de ácidos graxos ramificados	Heinsman et al., 1998
Síntese de surfactantes por ligação amida	Maugard, et al., 1998
Síntese de ésteres simples	Anderson et al., 1998
Resolução dinâmica de aralactonas racêmicas	Turner et al., 1995; (Chirotech)
Resolução cinética do trans-3-(p-metoxifenil) glicidil metil éster – intermediário da síntese do Diltiazem	Kierkels e Peeters, 1994; (DSM)

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral o estudo de lipases de *Bacillus megaterium*, com vistas à sua utilização em biocatálise.

Este objetivo geral foi atingido pelo desenvolvimento de várias etapas de trabalho, que compõem os objetivos específicos deste trabalho, a saber:

- Seleção de cepas microbianas produtoras de lipases, através de cultivos de diferentes cepas em meio sólido (placas de Petri) e em cultivo líquido;
- Produção do extrato enzimático por fermentação submersa;
- Desenvolvimento e otimização dos protocolos de purificação, utilizando-se técnicas cromatográficas de filtração gel e de interação hidrofóbica;
- A caracterização cinética e bioquímica da lipase produzida por *B. megaterium*, pela determinação das constantes cinéticas, da estabilidade e da massa molar, tanto no extrato bruto como na enzima purificada;
- Avaliação do potencial de aplicação da lipase de *B. megaterium* em biocatálise, verificando-se a sua estabilidade frente a solventes orgânicos hidrofílicos e hidrofóbicos e determinando-se a sua atividade em meio de micelas reversas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Bioquímica, no Laboratório de Fermentação no Estado Sólido e no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química, UFPR - PR. A purificação da enzima foi realizada no Laboratório de Biotecnologia da Univille - SC. Além disso, os resultados de purificação foram confirmados no *Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse*, LEIPL, Marselha, França onde também foi determinada a seqüência N-Terminal da lipase purificada. As cepas isoladas foram caracterizadas e depositadas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Materiais de Referência da FIOCRUZ – RJ.

4. 1. MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram:

- Trinta e seis cepas obtidas na Coleção e Cultura de Fungos da FIOCRUZ – RJ, sendo 35 cepas isoladas de insetos e uma cepa termófila de *Aspergillus niger* isolada de solo na Amazônia.
- Dez cepas de *Bacillus* sp. cedidas pela PROIMI (Planta Piloto de Processos Industriais Microbiológicos), Tucumán, Argentina;
- Uma cepa bacteriana nomeada inicialmente como LTEB11, isolada em nosso laboratório de uma contaminação em cultura de fungos e posteriormente identificada pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Materiais de Referência da FIOCRUZ – RJ

- Uma cepa de fungo filamentosos (*Penicillium aurantiogriseum* Dierckx IOC 4212) isolada e caracterizada na FIOCRUZ como descrito anteriormente (Lima, 2000).

4.2. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min.

4.3. SELEÇÃO DE CEPAS LIPOLÍTICAS

4.3.1. Seleção de cepas lipolíticas em placas de Petri

O corante Rodamina B foi utilizado para evidenciar a produção de lipases em meio de cultura sólido durante a fase de seleção de cepas lipolíticas. Para tanto, prepararam-se placas de Petri contendo o corante, meio LB sólido (bactérias) ou ágar (fungos) e 1% de óleo de oliva. As placas foram incubadas a 29 °C por 48 h, no caso das cepas bacterianas, ou por até 7 dias, no caso das cepas fúngicas. A produção de lipase foi evidenciada pela formação de um halo alaranjado fosforescente, monitorado pela irradiação das placas com UV a 350 nm (Shelley et al., 1987).

4.3.2. Seleção de cepas lipolíticas em fermentação submersa

a) Cultivos de fungos filamentosos

O fungo *Penicillium aurantiogriseum* foi cultivado com a finalidade de comparar a lipase produzida por este fungo com outras enzimas produzidas pelas cepas selecionadas neste trabalho.

Os cultivos do fungo filamentoso *Penicillium aurantiogriseum* foram realizados em meios e condições previamente estudadas por Lima (2000) e Lima et al. (2003). O meio utilizado foi composto de sais (KNO₃ - 2,0 g/L; MgSO₄.7H₂O - 0,5 g/L; K₂HPO₄ - 1,0 g/L; ZnSO₄.7H₂O - 0,439 g/L; FeSO₄.7H₂O - 1,116 g/L; MnSO₄.7H₂O - 0,203 g/L; (NH₄)₂SO₄ - 10 g/L), tendo sulfato de amônio e nitrato de potássio como as únicas fontes de nitrogênio e 1% de óleo de oliva como indutor e fonte de carbono.

As cepas *Aspergillus niger*, *A. niger* Z2.13.4, *Penicillium citrinum*, *Penicillium felutanum* e *Metarhizium anisopliae* M19 foram cultivadas em meio com a mesma composição de sais utilizada para a cepa *P. aurantiogriseum*, substituindo-se o sulfato de amônio por peptona 1 % (m/v). Óleo de oliva 1 % (v/v) também foi utilizado como indutor e fonte de carbono.

Para preparo da suspensão de esporos, os fungos foram repicados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), em Erlenmeyers de 250 mL e incubados a 29°C por 5 a 7 dias. Adicionou-se então 20 mL de água destilada estéril contendo 0,1 % de Tween 80 e agitou-se com barra magnética para remoção dos esporos. Para a fermentação, utilizou-se Erlenmeyers de 500 mL, com volume de meio de 125 mL e Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio para preparação dos pré-inóculos. Os cultivos foram iniciados pela adição de 1 mL de suspensão de esporos (10⁸ esp/mL) aos frascos de pré-inóculo, que foram mantidos a 29 °C e 100 rpm em agitador orbital por 48 h. Após este período, o volume total do inóculo foi transferido para os frascos de fermentação, os quais foram mantidos nas mesmas condições.

b) Cultivos de cepas bacterianas

As dez cepas de *Bacillus* sp enviadas pela PROIMI – Argentina, foram cultivadas em Erlenmeyers de 250 mL com 125 mL de meio composto de KNO₃ - 1,2 g/L; K₂HPO₄ - 6,0 g/L; KH₂PO₄ - 3,0 g/L; MgSO₄.7H₂O - 0,2 g/L; CaCl₂.2H₂O - 0,05 g/L; MnSO₄.7H₂O - 0,01 g/L; ZnSO₄.7H₂O - 0,001 g/L; peptona de caseína 0,75 %; extrato de levedura 0,75 % (m/v) e 1 % (v/v) de óleo

de oliva (Sharma et al., 2002). Os cultivos foram realizados em agitador orbital com agitação de 100 rpm e temperatura de 29 °C.

A cepa LTEB 11, isolada em nosso laboratório, foi cultivada em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio LB (Luria Bertani), a 29 °C e 100 rpm em agitador orbital por 8 h. Após este período, 1 mL da cultura (10^8 células/mL) foi inoculado em Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de meio composto de KNO_3 - 3,54 g/L; K_2HPO_4 - 1,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 g/L; NaCl - 0,38 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 g/L; extrato de levedura 5 g/L e 1 % (v/v) de óleo de oliva, mantidos nas mesmas condições.

O crescimento bacteriano durante os cultivos foi acompanhado pela contagem do número de células em câmara de Neubauer.

4.4. IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DA CEPA LTEB11

A cepa bacteriana LTEB11, isolada em nosso laboratório, foi enviada para a Coleção de Culturas Oswaldo Cruz (CCOC), localizada no Instituto Nacional para Controle de Qualidade de Saúde, na Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro para identificação.

Para a identificação do microrganismo foram realizados testes bioquímicos e de crescimento em meios específicos. Entre os testes bioquímicos estão a fermentação de açúcares (manitol, maltose, glicose, xilose e arabinose), o teste de VP (Reação de Voges-Proskauer), o teste de produção de nitrito e a resistência à lisozima. A cepa também foi avaliada quanto à capacidade de crescimento nos meios cetrimide, McConkey, ágar sangue, citrato Koser e caldo nutriente pH 5,7 e 6,8. A caracterização bioquímica foi confirmada pelo seqüenciamento do gene RNA 16S (Krieg e Holt, 1984 e Murray et al., 1999)

A cepa foi mantida liofilizada em ampolas de vidro, a -20 °C e em meio líquido LB com 50 % (m/v) de glicerol a -18 °C

4.5. PRODUÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *Bacillus megaterium*

Em todo o trabalho adotou-se a denominação “extrato bruto” para designar o produto resultante da precipitação do sobrenadante de cultura com sulfato de amônio a 80 % de saturação. Um esquema geral do procedimento para a produção do extrato bruto de *B. megaterium* está apresentado na Figura 4.1.

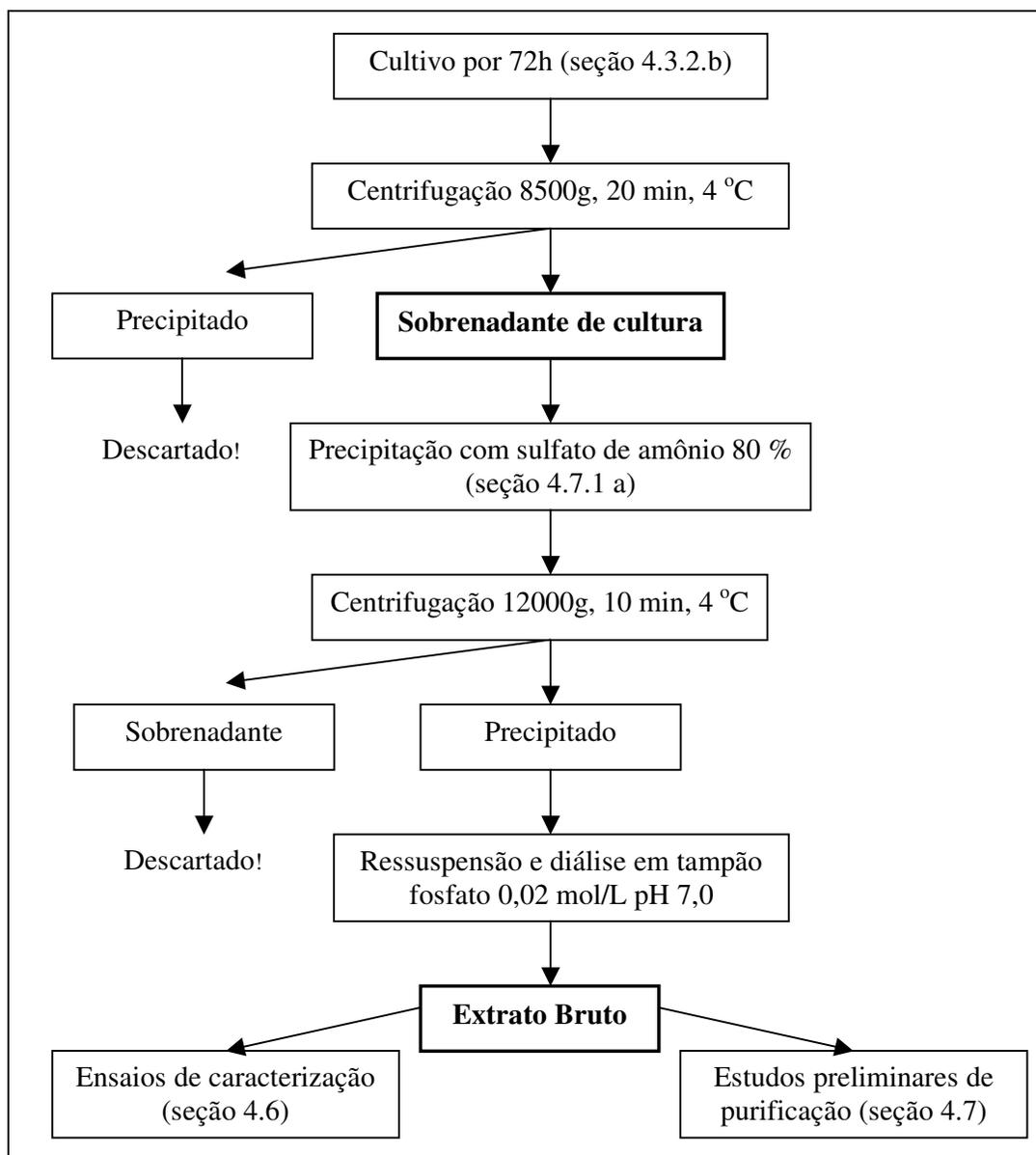


Figura 4.1. Esquema geral para a produção do extrato bruto de *Bacillus megaterium*.

4.6. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS E DE ESTABILIDADE DA LIPASE DE *Bacillus megaterium*

As características da enzima foram estudadas tanto com o extrato bruto quanto após a purificação. Os ensaios realizados com o extrato bruto tiveram como objetivo verificar se a enzima apresentava características como estabilidade em solvente orgânico e à temperatura, que possibilitassem sua aplicação em biocatálise. Após a purificação, alguns dos ensaios foram repetidos, agora com a finalidade de conhecer as propriedades bioquímicas da enzima. Em todos os ensaios as atividades foram determinadas com o método do *p*NPP (palmitato de *p*-nitrofenila), que está descrito na seção 4.9.1a.

4.6.1. Estabilidade em solventes orgânicos

Para determinar a estabilidade da atividade lipolítica do extrato bruto em acetona, etanol e isopropanol o extrato foi incubado (1 h, 30 °C) em diferentes concentrações de solventes (25, 50, 80 e 100 %, v/v). No caso dos solventes butanol, tolueno, hexano, isooctano e heptano, o extrato bruto foi adsorvido em papel de filtro Whatman n.4 de 1 cm² e incubado na presença de cada solvente (1 h, 30 °C). Em seguida, o papel de filtro foi transferido para tubos com 1 mL de tampão fosfato 0,02 mol/L pH 8,0 para eluição da enzima. Determinou-se a atividade enzimática de acordo com o procedimento padrão.

4.6.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade

Para determinar o efeito da temperatura sobre a atividade lipolítica do extrato bruto e da enzima purificada, a atividade enzimática foi determinada em temperaturas entre 20 e 70 °C, em tampão fosfato 0,02 mol/L pH 8,0. A reação foi acompanhada a cada 20 s por 5 min e as atividades foram calculadas com base na concentração de produto em 1 min.

A estabilidade à temperatura foi determinada através da incubação do extrato bruto e da enzima purificada em temperaturas entre 30 e 70 °C, na ausência do substrato. Amostras foram removidas em diferentes tempos de incubação e a atividade lipolítica residual foi determinada a 37 °C pelo método padrão. O tempo de meia-vida foi calculado por decaimento exponencial como descrito em Cornish-Bowden (1995).

4.6.3. Efeito do pH na atividade e estabilidade

Para determinar o efeito do pH na atividade lipolítica do extrato bruto ou da enzima purificada, os ensaios foram realizados variando-se o pH do meio reacional entre pH 2,6 e 10,0. O método precisou ser adaptado, conforme descrito a seguir, porque o *p*-nitrofenol (*p*NP) não absorve abaixo de pH 6,0. A reação foi realizada em tubos com 4,5 mL de meio reacional pré-equilibrado a 37 °C. Após a adição de 0,5 mL de solução enzimática, alíquotas de 0,1 mL foram removidas, adicionadas a 0,9 mL de tampão fosfato 0,02 mol/L pH 8,0, e transferidas para banho de gelo. A reação foi acompanhada por 5 min e as atividades foram calculadas com base na concentração de produto em 1 min, usando o coeficiente de extinção molar determinado a pH 8,0.

A estabilidade ao pH foi determinada pela incubação do extrato bruto em tampões com valores de pH entre 2,5 a 10,5 por 1 h a 29 °C. A temperatura de 29 °C foi escolhida para garantir a estabilidade da enzima nesta condição, de modo que o efeito observado fosse devido apenas ao pH e não devido à desnaturação por efeito da temperatura. Após a incubação, a atividade residual foi determinada usando tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, pelo método padrão.

Os tampões utilizados nos ensaios e os valores do coeficiente de extinção molar do *p*NP utilizado em cada caso estão apresentados na seção 4.9.1a.

4.6.4. Efeito da concentração de proteínas na atividade

Para determinar o efeito da concentração de proteínas na atividade lipolítica os ensaios foram realizados variando-se a concentração de proteínas entre 1,75 e 35 µg/mL. Este ensaio foi realizado após a purificação da enzima.

4.6.5. Efeito da concentração de substrato na atividade

Os ensaios foram realizados variando-se a concentração de *p*NPP entre 0,3 e 8 mmol/L. Este ensaio foi realizado após a purificação da enzima.

4.7. ENSAIOS PRELIMINARES DE PURIFICAÇÃO

O sobrenadante de cultura e o extrato bruto apresentavam uma forte turvação que impedia a purificação por métodos cromatográficos. Com o objetivo de clarificar o extrato bruto foram realizados ensaios de precipitação fracionada com sulfato de amônio e precipitação com Mg^{+2} . Ambos os tratamentos tinham a finalidade de remover lipopolissacarídeos, uma vez que estas macromoléculas extracelulares podem ser produzidas por bactérias e provocar turvação no meio de cultivo (Galanos et al., 1971; Stuer et al. 1986).

A agregação das lipases é uma dificuldade freqüentemente relatada nos estudos de purificação destas enzimas. Como será relatado na seção 5.6.1, análises preliminares com gel permeação demonstraram que agregados lipolíticos de alta massa molar estavam presentes no extrato bruto de *B. megaterium*. Ensaios de desagregação da enzima foram realizados pelo tratamento do extrato bruto com detergente (CHAPS) e isopropanol.

4.7.1. Ensaios para clarificação do extrato bruto

a) Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação com sulfato de amônio foi realizada, em uma primeira fase, para concentração da atividade enzimática do sobrenadante de cultura e realização dos ensaios preliminares de caracterização enzimática. Neste caso a precipitação foi realizada até 80 % de saturação. Em uma segunda fase, foram realizados testes de precipitação fracionada com sulfato de amônio – 0-10 % e 10-80 % de saturação - com a finalidade de clarificar o sobrenadante de cultura.

Em ambos os casos o procedimento de precipitação foi o mesmo. O sobrenadante de cultura foi centrifugado a 8.500 g por 20 minutos a 4 °C. Sulfato de amônio foi adicionado até a saturação desejada (10 % ou 80 % de saturação), com agitação branda a 4 °C. A solução foi mantida a 4 °C por 12 h, com agitação branda, sendo depois centrifugada a 12.000 g por 10 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em um volume mínimo de tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0. Esta suspensão foi dialisada contra este mesmo tampão a 4 °C, por 6 h, com duas trocas. Após a diálise, o precipitado (após adição de 10 ou 80 % de sulfato de amônio) foi armazenado a 4 °C com adição de azida sódica 0,02 % (m/v) e foi utilizado para os estudos seguintes.

Nos testes de precipitação fracionada com sulfato de amônio, além da atividade lipolítica, determinaram-se também açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico (seção 4.9.4).

b) Precipitação com íons Mg^{+2}

Como a presença de lipopolissacarídeos poderia estar relacionada com a forte turvação do sobrenadante de cultura, foram feitos testes de precipitação com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} , uma vez que estes íons têm sido citados por alguns autores (Galanos et al., 1971; Stuer et al., 1986) como agentes precipitantes destas macromoléculas.

Para a precipitação adicionou-se 250 mmol/L de $MgCl_2$ ou $MgSO_4$ a 50 mL de extrato bruto. A mistura foi mantida em agitador orbital, a 100 rpm, 30 °C, por 20 min. Após a incubação, centrifugou-se a 5.500 g por 30 min. O precipitado foi ressuspenso com 1 mL de água destilada e ambos, sobrenadante e precipitado, foram dialisados contra água destilada, por 2 h a 4 °C.

4.7.2 Ensaios para desagregação da enzima

a) Tratamento com detergente CHAPS

Para o rompimento de agregados de lipases, Stuer et al. (1986) propuseram o tratamento do extrato a ser purificado com um detergente anfifílico, CHAPS, eficiente para a solubilização de proteínas de membrana. A metodologia foi utilizada com pequenas alterações.

O extrato bruto foi adicionado de CHAPS nas concentrações de 0,5, 1 e 1,5 % (m/v), mantido sob lenta agitação por 30 min e depois centrifugado a 5.500 g por 20 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0. Precipitado e sobrenadante foram analisados quanto à atividade enzimática.

b) Tratamento com Isopropanol

Rua et al. (1997) observaram o rompimento de agregados de lipase de *B. thermocatenuatus* utilizando isopropanol 30 %. Baseando-se nesta informação, desenvolveu-se uma metodologia para o tratamento do extrato bruto visando a sua clarificação e o rompimento dos agregados.

O extrato bruto foi centrifugado a 5.000 g por 20 min. A 3,5 mL do sobrenadante adicionou-se 1,5 mL de isopropanol em banho de gelo e em seguida, a mistura foi centrifugada a 5.000 g por 5 min ou filtrada em membrana de 0,2 µm. A atividade enzimática foi determinada no sobrenadante e no filtrado. Para as medidas de atividade, as diluições necessárias foram realizadas em

tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0 ou com isopropanol 30 % (v/v).

4.8. PURIFICAÇÃO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

O desenvolvimento dos métodos de purificação para a lipase de *B. megaterium* foi realizado em um sistema de Cromatografia Líquida -FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*, Amersham Bioscience). Este equipamento é normalmente utilizado para análise, desenvolvimento de métodos e purificação de proteínas em escala de laboratório, e permite a utilização de diferentes tipos de colunas cromatográficas.

O equipamento é constituído de um Programador-Controlador, duas bombas de alta precisão, misturador, monitor UV 280 nm, registrador e coletor de frações. O sistema de controle permite a realização de gradientes complexos e a operação automática dos componentes do sistema, bem como a execução de programas e armazenamento de dados. A injeção da amostra é feita através de *loops* de diversas capacidades, desde 50 µL até 2 mL.

Após os diferentes passos da cromatografia e para os protocolos globais de purificação, foram feitos cálculos dos fatores de purificação e dos rendimentos, em termos de proteínas e em termos de atividade enzimática. Todos os tampões utilizados nesta etapa foram adicionados de 0,02 % de azida sódica, para prevenção do crescimento microbiano no interior das colunas e nas amostras.

4.8.1. Cromatografia de gel permeação

Os ensaios de cromatografia de gel permeação foram realizados em colunas pré-empacotadas Superose 6 e Superdex G-200 e em coluna empacotada manualmente com o gel Sephadex G-100. A coluna Superose 6 foi utilizada nos ensaios de análise do sobrenadante de cultura e do extrato bruto. Análises com a Superdex G-200 foram realizadas no *Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et*

de Physiologie de la Lipolyse, LEIPL, Marselha, França, onde foi feita a determinação da sequência N-terminal, como será descrito na seção 4.9.5.

A coluna Superose-6 HR 10/30, pré-empacotada, apresenta diâmetro de 1 cm e altura de 30 cm e contém 24 ml do gel. O gel contido na coluna é composto por esferas porosas de agarose com ligações inter cruzadas, com tamanho de partícula de 13 μm . O limite de exclusão para proteínas globulares é de aproximadamente 4×10^7 Da, sendo indicada para o fracionamento de proteínas na faixa de 5×10^3 a 5×10^6 Da. A capacidade da coluna, em termos de proteínas, situa-se entre 5 a 10 mg (Manual Amersham Bioscience(a)).

A matriz da coluna Superdex G200 é composta por ligações inter cruzadas entre dextranas e agarose, com tamanho de partículas de 13 μm . Possui um intervalo de fracionamento para proteínas globulares entre 1×10^4 a 6×10^5 Da.

O gel Sephadex G-100 é composto por ligações inter cruzadas de dextranas e a faixa de fracionamento está entre 4×10^3 e $1,5 \times 10^5$ Da.

Para a Superose 6 o fluxo foi de 0,2 mL/min e para a Sephadex G100, 0,4 mL/min. Em ambos os casos, a eluição foi realizada com tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0 contendo NaCl 0,15 mol/L e foram coletadas frações de 1 mL. Com a coluna Superdex G200 utilizou-se tampão de eluição Tris HCl 0,01 mol/L pH 7,5 com NaCl 0,15 mol/L e fluxo de 0,4 mL/min. Todas as frações foram analisadas quanto à atividade lipolítica e absorvância a 280 nm. As frações com atividade lipolítica foram reunidas e aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE (seção 4.8.3).

4.8.2. Cromatografia de interação hidrofóbica

O extrato bruto foi aplicado em colunas empacotadas manualmente com os géis Octyl Sepharose CL4B e Phenyl Sepharose Fast Flow.

O gel Octyl Sepharose CL4B é composto por matriz de agarose 4 % com ligações inter cruzadas, contendo substituintes octila covalentemente ligados. O

tamanho médio das partículas é de 90 μm e o grau de substituição está em torno de 40 μmol de grupos octila/mL de gel. A matriz de Sepharose CL é indicada para eluições utilizando solvente orgânico (Manual Amersham Bioscience (b)).

A matriz do gel Phenyl Sepharose Fast Flow é composta de agarose 6% com ligações intercruzadas e substituintes fenila covalentemente ligados. As partículas tem tamanho médio de 90 μm e grau de substituição de 40 μmol de grupos fenila/mL de gel (Manual Amersham Bioscience (b)).

Inicialmente, as colunas foram equilibradas com tampão contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 mol/L, mas com o prosseguimento dos experimentos tornou-se claro que a adição do sal era desnecessária, pois a enzima adsorvia fortemente à resina, mesmo na ausência do sal, e o procedimento foi abandonado. As colunas foram pré-equilibradas, portanto, com tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0. O material adsorvido foi eluído com um gradiente de tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0 contendo CHAPS 1 % (m/v) ou de tampão Tris-HCl 0,02 mol/L pH 7,2 com 60 % (v/v) de isopropanol e foram coletadas frações de 1 mL. Para a Octyl Sepharose o fluxo foi de 0,4 mL/min e para a Phenyl Sepharose, 0,5 mL/min. As frações com atividade lipolítica foram reunidas e aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE (seção 4.8.3).

4.8.3 Eletroforese SDS-PAGE e Nativa

Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS foram feitos de acordo com Laemmli (1970). O extrato bruto foi dialisado e diluído em tampão Tris-HCl 0,5 mol/L pH 6,8, contendo 10 % (m/v) de SDS, 10 % (v/v) de glicerol, 5 % (v/v) de 2-mercaptoetanol e 0,05 % (m/v) de azul de bromofenol. Os géis foram preparados com 12 % (m/v) de poliacrilamida. Quando havia a intenção de detecção de atividade nos géis, as amostras não foram aquecidas a 100 °C. Foram utilizados como marcadores de massa molar as seguintes proteínas: fosforilase (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

Eletroforese nativa foi realizada utilizando-se o mesmo protocolo, mas na ausência de SDS, tanto no preparo do gel quanto no tampão da amostra.

Antes da coloração para proteínas foi realizado procedimento para revelação de atividade segundo o método de Diaz et al. (1999) e de Kim et al. (2002). Após a corrida, o gel foi lavado por 30 min em solução de Triton X-100 em concentração de 2,5 % (v/v) e em seguida, foi lavado com tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0 e imerso em uma solução 100 μ mol/L de butirato de metilumbeliferila (MUF-butirato) ou de 200 μ mol/L de palmitato de metilumbeliferila (MUF-palmitato) ou ainda de 0,1 mol/L de α -naftil acetato. Uma solução foi previamente preparada pela solubilização de 2,46 mg de MUF-butirato ou de 4,14 mg de MUF-palmitato em 1 mL de etilenoglicol monometiléter, adicionando-se, em seguida, 100 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0. As bandas com atividade foram visíveis após iluminação UV a 365 nm. Para revelação utilizando α -naftil acetato, este substrato foi solubilizado em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0 e adicionado sobre o gel. A revelação foi feita pela adição de 2 mL de uma solução de Fast Blue RR (2 mg/mL) que produzia coloração amarelo-esverdeada nas bandas com atividade. O mesmo gel foi corado com nitrato de prata segundo o método descrito por Blum et al. (1987).

4.9. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.9.1 Determinação da atividade lipolítica em meio aquoso

a) Método da hidrólise do pNPP

Este método espectrofotométrico foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger (1995). Baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela é seguida a 410 nm (Figura 4.2). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μ mol de *p*NP (*p*-nitrofenol) por minuto. O coeficiente de extinção molar do *p*NP (Tabela 4.1) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura. Ensaios de atividade também foram realizados com outros ésteres de *p*NP - acetato de *p*-nitrofenila (*p*NPA), butirato de *p*-nitrofenila (*p*NPB), caproato de *p*-nitrofenila (*p*NPC) e caprato de *p*-nitrofenila (*p*NPCA).

Soluções Utilizadas:

- Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila (ou outros ésteres de *p*-nitrofenila) em isopropanol, em uma concentração de 3 mg/ml.
- Solução B: 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0.

Procedimento:

A 1 mL da solução A foram misturados 10 mL da solução B, lentamente e sob contínua agitação. A mistura foi feita imediatamente antes da determinação da atividade, pois o substrato é instável quando em meio aquoso. Desta solução foram colocados 0,9 mL em cubeta. Estabilizada a temperatura a 37 °C, foi adicionada a solução de enzima (0,1 mL) ou de tampão, quando se preparou o branco. A reação foi feita em cubeta de 1,0 mL e a leitura foi feita sempre contra um branco contendo o substrato e o tampão sem a enzima, a 37 °C e pH 8,0. Como protocolo padrão, as leituras de absorbância foram feitas a cada 5 s durante

1 min. Alterações no tempo de leitura serão indicadas na descrição do experimento, quando for o caso.

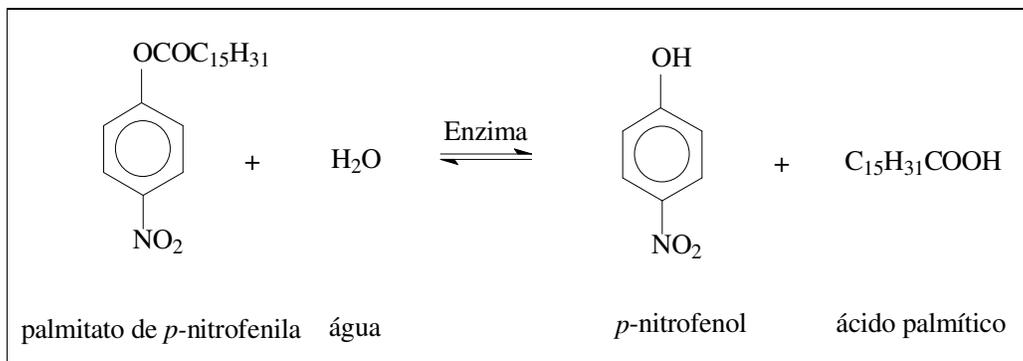


Figura 4.2. Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico.

TABELA 4.1 - COEFICIENTES DE EXTINÇÃO MOLAR DE *p*-NITROFENOL EM DIFERENTES VALORES DE pH.

pH	Tampão	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
6	Citrato-fosfato	1,73x10 ³
	Fosfato	1,95x10 ³
7	Citrato-fosfato	8,77x10 ³
	Fosfato	8,03x10 ³
8	Fosfato	1,50x10 ⁴
	Tris-HCl	1,43x10 ⁴
9	Tris-HCl	1,74x10 ⁴
	Glicina-NaOH	1,63x10 ⁴
9,2	Carbonato – bicarbonato	1,8 x 10 ⁴
10	Glicina-NaOH	1,95x10 ⁴
10,7	Carbonato – bicarbonato	1,97 x 10 ⁴

Para determinação do coeficiente de extinção molar foram realizadas diluições do *p*NP nos diferentes tampões listados na Tabela 4.1. Em cada caso foi medida a absorvância a 410 nm e calculado o coeficiente de extinção molar(ϵ) de acordo com a equação $A = \epsilon .b.c$, sendo que A corresponde a absorvância, b é o caminho ótico (1 cm) e c a concentração molar de *p*NP.

b) Método titulométrico

Ensaio de atividade frente a diferentes triacilgliceróis foram realizados utilizando trioleína, tricaprilina e tributirina como substratos. A determinação da atividade de lipases por titulometria foi baseada no método proposto por Stuer et al. (1986), com modificações. O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis. O meio reacional consistiu de 0,2 mol/L de substrato, 6 % (m/v) de Triton X-100 e 74 % (v/v) de tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0. Adicionou-se 1 mL de enzima a 5 mL de meio de reação e incubou-se por 30 min a 37 °C, sob agitação intensa (300 rpm). Após a incubação, 16 mL de uma solução 1:1 (v/v) de acetona e etanol foi adicionada e esta solução foi titulada com NaOH 0,05 mol/L. Uma unidade de atividade enzimática foi equivalente a 1 µmol de ácido graxo produzido por minuto.

As atividades contra tricaprilina e tributirina foram confirmadas no *Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse*, LEIPL, Marselha, França, utilizando-se o titulador automático pH-Stat. O meio de reação consistiu de 500 µL de tricaprilina ou 250 µL de tributirina em 15 mL de tampão Tris HCl 0,025 mol/L pH 7,5 e NaCl 0,15 mol/L.

4.9.2. Determinação da atividade lipolítica em meio de micelas reversas

Segundo estudos recentes (Pencreac'h e Baratti, 2001), não há uma relação fixa entre a atividade lipolítica em meio aquoso e em meio orgânico, ou seja, não há como prever a atividade de uma enzima em meio orgânico baseando-se em sua atividade em meio aquoso. Visando avaliar o potencial de catálise da lipase de *B. megaterium* em meio orgânico, desenvolveu-se uma metodologia de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) em meio de micelas reversas, a fim de se comparar a atividade hidrolítica sobre o mesmo substrato em meio aquoso e micelar.

A hidrólise do *p*NPP em meio micelar foi feita em 5 mL de uma solução de AOT (Dioctil sulfosuccinato de sódio) 0,1 mol/L em heptano, contendo 0,01 mol/L de *p*NPP. O ensaio foi realizado com valores de W_0 ($[H_2O]/[AOT]$) de 5 a 20 através da adição de diferentes volumes de enzima. Diferentes diluições do extrato bruto foram realizadas de modo a manter a quantidade de proteína constante, mas variar o volume de água no sistema. Assim, adicionou-se 45 μ L de enzima para obter-se um W_0 de 5, 90 μ L para W_0 10, 135 μ L para W_0 15 e 180 μ L para W_0 20. A mistura foi fortemente agitada em vórtex até resultar em uma solução micelar transparente. O sistema foi mantido a 37 °C. Após a adição da enzima à solução micelar, alíquotas de 0,1 mL foram retiradas a cada 60 segundos e adicionadas a 2 mL de isooctano e 2 mL de NaOH 0,1 mol/L. A absorbância da fase aquosa foi acompanhada a 410 nm. O coeficiente de extinção molar do *p*NP ($3,5 \times 10^3$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) em NaOH 0,1 mol/L foi determinado como descrito na seção 4.9.1a.

4.9.3. Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas durante os cultivos e nos testes preliminares de caracterização enzimática foi feita de acordo com o método proposto por Bradford (1976).

Nos experimentos de purificação, a dosagem de proteínas foi realizada por um método colorimétrico baseado no ácido bicinonínico (BCA) (Smith, 1985). Este método combina a bem conhecida redução do Cu⁺² a Cu⁺¹ por proteínas em meio alcalino (método de biureto) com a detecção altamente sensível do Cu⁺¹ pelo ácido bicinonínico (Pierce Chemical Company – USA).

As frações eluídas de colunas cromatográficas nos ensaios de purificação foram analisadas por leitura direta em UV a 280 nm.

4.9.4. Determinação de açúcares totais - Método do Fenol Sulfúrico

A determinação de açúcares totais foi realizada segundo Dubois et al. (1956). Estes ensaios foram realizados durante os testes de clarificação do sobrenadante e extrato bruto, para verificar a presença de lipopolissacarídeos.

4.9.5. Determinação da seqüência amino-terminal

A seqüência N-terminal foi determinada no *Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse*, LEIPL, Marselha, França. Para tanto, a enzima foi purificada em coluna Octyl Sepharose (como descrito na seção 4.8.2). As frações ativas eluídas foram reunidas e aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE. Após a separação eletroforética, foi feita a transferência das proteínas para uma membrana PVDF. A membrana foi corada com azul de Ponceau e as bandas de interesse foram selecionadas e recortadas. A proteína correspondente à banda de interesse foi então analisada por sequenciador Procise 494 (Applied Biosystems – USA).

O método de sequenciamento de aminoácidos é baseado na degradação de Edman. O isotiocianato de fenila reage com a amina terminal sem carga do peptídeo, formando um derivado com o radical feniltiocarbamil. Então, em condições levemente ácidas, libera-se um derivado cíclico do aminoácido terminal, o que deixa a proteína intacta encurtada de uma unidade. O composto cíclico é uma feniltio-hidantoína do aminoácido, que pode ser identificada por métodos cromatográficos. Para o sequenciamento do N-terminal da lipase de *B. megaterium*, os aminoácidos foram identificados por CLAE em coluna C18. O processo de degradação de Edman foi repetido até que se alcançasse o número de aminoácidos que se pretendia identificar (de 15 a 30 resíduos).

4.9.6. Detecção de lipídeos por cromatografia de camada delgada

O extrato bruto e as frações eluídas das colunas cromatográficas Octyl Sepharose e Superdex G-200 foram analisadas quanto à presença de lipídeos por cromatografia de camada delgada. As amostras foram aplicadas em placas de sílica gel. A fase móvel consistiu de 14 mL de hexano, 6 mL de éter e 0,2 mL de ácido acético. Foram usados como padrões triacilglicerol, ácido graxo, 1,3 diacilglicerol e uma mistura de 2,3 e 1,2 diacilglicerol. A revelação foi feita por vapor de iodo metálico.

4.10. REAGENTES

Os reagentes utilizados no presente trabalho - nas etapas de purificação por cromatografia e caracterização cinética da enzima - bem como a sua procedência e grau de pureza, estão citados na Tabela 4.2.

TABELA 4.2. - PROCEDÊNCIA E GRAU DE PUREZA DOS REAGENTES UTILIZADOS NO TRABALHO.

Reagente	Marca	Grau de Pureza
Acetona	Merck	p.a
Ácido cítrico	Merck	p.a.
Álcool Isopropílico	Merck	p.a.
Acrilamida	Pharmacia	Para eletroforese
Albumina Bovina (BSA)	Sigma	-
AOT (dioctilsulfosuccinato de sódio)	Sigma	99 %
Azida Sódica	Merck	99 %
Azul de Bromofenol	Pharmacia	p.a.
Bis-Acrilamida (N,N'-Metilenodiacrilamida)	Pharmacia	Para eletroforese
CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio])	Sigma	98 %
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	Pharmacia	Para Eletroforese
Etanol	Merck	p.a.
Glicerol	Pharmacia	87 %
Glicina	Pharmacia	99 %
Goma Arábica	Sigma	-
Hidróxido de Sódio	Merck	p.a.
Isooctano	Merck	p.a.
β -Mercaptoetanol	Pharmacia	Para eletroforese
Nitrato de Prata	Merck	p.a.
acetato de <i>p</i> -nitrofenila	Sigma	p.a.
Butirato de <i>p</i> -nitrofenila	Sigma	p.a.
Caprato de <i>p</i> -nitrofenila	Sigma	p.a.
Caprilato de <i>p</i> -nitrofenila	Sigma	p.a.
Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila	Sigma	p.a.
Óleo de oliva	Galo	grau alimentar
Persulfato de Amônio	Pharmacia	Para Eletroforese
Reagente BCA	Pierce	-
Temed (N,N,N',N'-Tetra metiletlenodiamina)	Pharmacia	99 %
Tiosulfato de Sódio Penta Hidratado	Merck	p.a.
Tributirina	Sigma	99 %
Tricaprilina	Sigma	99 %
Trioleína	Sigma	65 %
Tris (hidroximetil) -Aminometano	Merck	p.a.
Triton X-100	Pharmacia	-

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para maior clareza, a seguir serão descritas as principais etapas realizadas que compõem a estratégia experimental deste trabalho.

Etapa 1. Isolamento e seleção de cepas produtoras de lipases

Esta etapa foi realizada em duas partes, a primeira em meio sólido (placas de Petri) e a segunda em fermentação submersa. Após a seleção, a cepa escolhida para a continuidade dos trabalhos foi cultivada para a determinação das curvas de crescimento do microrganismo e de produção da enzima.

Etapa 2. Produção da enzima

O microrganismo selecionado foi cultivado por fermentação submersa seguindo as condições descritas na seção 4.3.2.

Etapa 3. Determinação de parâmetros cinéticos e de estabilidade

As características cinéticas e de estabilidade da enzima foram estudadas em duas fases do trabalho. Inicialmente, os estudos foram feitos com o sobrenadante de cultura precipitado com sulfato de amônio diretamente a 80% de saturação, que foi chamado de ‘extrato bruto’. O objetivo desta primeira fase foi verificar se a enzima apresentava propriedades interessantes para aplicação em biocatálise e assim, justificar a continuidade dos estudos de purificação.

Em uma segunda fase, após o procedimento de purificação, os ensaios cinéticos e de estabilidade foram repetidos com o objetivo de caracterizar a enzima purificada. Os parâmetros estudados nestas duas etapas foram:

- a) Efeito do pH na atividade e estabilidade;
- b) Efeito da temperatura na atividade e estabilidade;
- c) Estabilidade a solventes orgânicos;
- d) Atividade frente aos diferentes substratos (especificidade ao substrato, no caso da enzima purificada);

- e) Atividade em meio de solvente orgânico;
- f) Efeito da concentração de proteínas na atividade;
- g) Efeito da concentração do substrato na atividade.

Etapa 4. Ensaios de purificação da lipase

Como o extrato bruto apresentava forte turvação e a enzima apresentava tendência de formar agregados, os ensaios de purificação foram iniciados por estudos preliminares de clarificação e desagregação da enzima. Estes ensaios preliminares consistiram em:

- a) Precipitação com sulfato de amônio em duas etapas – 0-10% e 10-80% de saturação;
- b) Precipitação com Mg^{+2} ;
- c) Tratamento com detergente CHAPS;
- d) Tratamento com isopropanol.

Após a clarificação do extrato bruto, a purificação foi realizada pelos seguintes métodos cromatográficos

- a) cromatografia de interação hidrofóbica;
- b) cromatografia de gel permeação.

Em todos os ensaios de atividade - durante cultivo de microrganismos, no estudo de propriedades cinéticas e durante a purificação – foi utilizado o método espectrofotométrico baseado na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) descrito na seção 4.9.1a.

5.1 SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE LIPASES

5.1.1. Seleção em meio sólido

Os resultados obtidos no teste em meio sólido para seleção de cepas produtoras de lipase estão apresentados na Tabela 5.1.

De um total de 36 cepas fúngicas, destacaram-se as cepas de *Metarhizium anisopliae* Ma 03, *Metarhizium anisopliae* Ma 19 e *Aspergillus niger* Z2.13.4 pelos maiores halos de fosforescência. Todas as 11 cepas bacterianas apresentaram resultados positivos, sendo que a cepa LTEB11 foi a que proporcionou halo mais intenso (Figura 5.1).



Figura 5.1. Produção de lipase pela cepa LTEB11 em meio sólido contendo óleo de oliva e Rodamina B. O resultado positivo é indicado pelo halo de fosforescência alaranjada que é visualizado quando a placa é irradiada ao UV 365 nm.

TABELA 5.1 - TESTE EM PLACAS DE PETRI PARA A SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES.

Cepas fúngicas	Lipase	Cepas bacterianas	
			Lipase
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma 03	+++	<i>Bacillus</i> P04	+
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma 06	+	<i>Bacillus</i> P07	+
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma 01	+	<i>Bacillus</i> P11	+
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma 19	+++	<i>Bacillus</i> P14	+
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma 319	++	<i>Bacillus</i> P16	+
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma 02	+	<i>Bacillus</i> P17	+
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma 18	+	<i>Bacillus</i> P18	+
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma 04	++	<i>Bacillus</i> P20	+
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma 26	+	<i>Bacillus</i> P26	++
<i>Aspergillus niger</i> (termófilo)	++	<i>Bacillus</i> P32	++
<i>Aspergillus niger</i> Z2.13.4	+++	LTEB 11	++++
<i>Aspergillus terreus</i>	-		
<i>Aspergillus flavus</i>	++		
<i>Aspergillus flavus</i> LTE	++		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	++		
<i>Penicillium steckii</i>	++		
<i>Penicillium fellutanum</i> IOC 36	+		
<i>Penicillium fellutanum</i> IOC 08	+		
<i>Penicillium fellutanum</i>	-		
<i>Penicillium fellutanum</i> IOC 28	+		
<i>Penicillium corylophilum</i>	+		
<i>Penicillium corylophilum</i> IOC 23	-		
<i>Penicillium corylophilum</i> IOC 35	+		
<i>Penicillium corylophilum</i> IOC 68	+		
<i>Penicillium corylophilum</i> IOC 41	++		
<i>Penicillium corylophilum</i> IOC 03	+		
<i>Penicillium corylophilum</i> LTE	+		
<i>Penicillium waksmanii</i> IOC 37	+		
<i>Penicillium waksmanii</i> IOC 66	++		
<i>Penicillium waksmanii</i> IOC 52	++		

*O repique das cepas foi realizado em ágar contendo Rodamina B e 1% de óleo de oliva. A atividade foi avaliada pela presença de halos alaranjados fosforescentes ao UV 365 nm, após de incubação a 28 °C por 48 h, no caso das cepas bacterianas, e até 7 dias, para as cepas fúngicas.

5.1.2. Seleção de cepas por fermentação submersa

Baseando-se nos resultados acima (Tabela 5.1), algumas cepas que apresentaram maiores halos de fosforescência foram selecionadas para cultivo em fermentação submersa. A produção de lipases durante os cultivos foi acompanhada de coleta de amostras do meio de cultura ao longo do tempo e determinação de sua atividade lipolítica pelo método da hidrólise do *pNPP*. Os

cultivos com cepas bacterianas foram acompanhados pela hidrólise do *p*NPP e do acetato de p-nitrofenila (*p*NPA). O *p*NPA é um substrato típico de esterases, embora também possa ser hidrolisado por lipases. A produção de esterases pelas cepas de *Bacillus* enviadas pela PROIMI já havia sido detectada anteriormente, entretanto, a produção de lipases não havia sido testada. Desta forma, as cepas foram cultivadas e a atividade durante o cultivo foi acompanhada com dois substratos, um de cadeia longa para lipases (*p*NPP) e um cadeia curta para lipases e esterases (*p*NPA). A presença de lipases seria evidenciada pela hidrólise dos dois substratos.

Com as cepas de *Bacillus* enviadas pela PROIMI foram detectados baixos valores de atividade hidrolítica contra *p*NPA (Tabela 5.2) e nenhuma atividade contra *p*NPP. Os resultados indicaram a produção de esterases, as quais, ao contrário de lipases verdadeiras, atuam somente sobre substratos de cadeia curta. Embora todas as cepas tenham apresentado halos de fosforescência com óleo de oliva como substrato (Tabela 5.1), nas condições de cultivo empregadas não houve produção de lipases.

Os cultivos com a cepa de LTEB11 foram acompanhados apenas com *p*NPP como substrato e, ao contrário das outras cepas bacterianas testadas, apresentaram alta atividade hidrolítica contra o *p*NPP (33 U/mL). Assim, dentre as cepas bacterianas estudadas, esta foi selecionada para a continuidade do trabalho.

TABELA 5.2 - PRODUÇÃO DE ESTERASES POR CEPAS DE *Bacillus* sp.

Cepas	Esterase U/mL
<i>Bacillus</i> P4	0
<i>Bacillus</i> P7	0,0007
<i>Bacillus</i> P11	0
<i>Bacillus</i> P14	0
<i>Bacillus</i> P16	0,0037
<i>Bacillus</i> P17	0,004
<i>Bacillus</i> P18	0,0043
<i>Bacillus</i> P20	0,0037
<i>Bacillus</i> P26	0,0077
<i>Bacillus</i> P32	0,008

*Atividade determinada frente ao *p*NPA.

Dos fungos filamentosos, foram selecionados para fermentação submersa: *Aspergillus niger*, *A. niger* Z2.13.4, *Penicillium citrinum*, *Penicillium fellutanum* IOC28 e *Metarhizium anisopliae* Ma19. Entretanto, em meio de fermentação, nenhuma das cepas proporcionou atividades lipolíticas significativas. A cepa de *P. aurantiogriseum* foi previamente identificada como uma boa produtora de lipases (Lima et al., 2003; Lima, 2000). Com este microrganismo, a produção da enzima ocorria em níveis significativos (13 U/mL frente ao *pNPP*) em meio de baixo custo, sem fontes orgânicas de nitrogênio e a enzima apresentava atividade máxima em temperaturas elevadas (60 °C). Devido a estas propriedades, a cepa de *P. aurantiogriseum* foi avaliada juntamente com a cepa de *B. megaterium* na continuidade do trabalho.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DA CEPA BACTERIANA LTEB11

A cepa bacteriana LTEB11, isolada em nosso laboratório a partir de uma contaminação em meio de cultura, foi enviada para o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – FIOCRUZ, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Microrganismos de Referência, Rio de Janeiro-RJ, para identificação.

Morfolologicamente, a cepa apresentou a forma de grandes bacilos gram positivos e os resultados dos testes bioquímicos e de crescimento (Tabela 5.3), juntamente com o seqüenciamento do RNA 16S, permitiram a identificação da cepa como *Bacillus megaterium*. A cepa foi depositada no banco de cepas da FIOCRUZ e codificada como CCOC-P2637.

TABELA 5.3 - CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DA CEPA LTBE11

Teste	Resultado	Teste	Resultado
Coloração de gram	+	Gelatina	+
Cetrimide	-	Lisozima	-
McConkey	-	Mobilidade	+
Ágar sangue	+ (não produz hemólise)	Nitrato	-
Citrato Koser	+	Arginina	-
Caldo Nutriente pH 5.7 e 6.8	+	Manitol	+
Tirosina	+	Maltose	+
TSI	Aeróbio obrigatório	Glicose	+
VP	-	Xilose	+
TSA (42 °C)	+	Arabinose	+
Amido	+		

5.3. CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Bacillus megaterium*

5.3.1. Cinética de crescimento no pré-inóculo

Acompanhando-se o crescimento da bactéria em meio LB, observou-se que a fase *lag* ocorre durante as primeiras 6 h de cultivo conforme mostra a Figura 5.2A. A fase exponencial ocorre entre 6 e 10 h de cultivo, indicando ser este o período adequado para a transferência das células para o meio de fermentação, uma vez que as células estão jovens e se multiplicando.

5.3.2. Cinética de crescimento e produção de lipases durante a fermentação

Bacillus megaterium CCOC-P2637, quando crescido em meio de fermentação, apresentou duas fases exponenciais de crescimento (Figura 5.2B). Durante a primeira fase, de 0 a 20 h, a taxa de crescimento específico (μ) foi de $0,15 \text{ h}^{-1}$, enquanto que durante a segunda fase de crescimento, de 30 a 108 h, μ foi menor ($0,05 \text{ h}^{-1}$), indicando exaustão dos nutrientes no meio de cultura.

Durante a fermentação, observou-se que a produção da enzima ocorre lentamente durante as primeiras 20 h de cultivo, não acompanhando a multiplicação celular (Figura 5.2B). A partir deste ponto, entretanto, a atividade

aumentou rapidamente, alcançando uma atividade máxima de 33 U/mL em 70 h de cultivo. A atividade permaneceu alta entre 70 e 133 h.

Já nas primeiras 24 h, não havia gotas de óleo visíveis nos frascos de cultivo e com o progresso da fermentação, verificou-se turvação do meio, mesmo após a centrifugação a 10.000g por 20 min. O material extracelular, que provocava a turvação e dificultava inclusive a sedimentação das células, que ainda permaneciam em suspensão após várias centrifugações. O problema da turvação poderia ser devido à formação de emulsão pelos ácidos graxos liberados pela ação enzimática sobre triacilgliceróis do óleo de oliva ou pela presença de produtos metabólicos extracelulares, como lipopolissacarídeos, por exemplo (Krieger, 1995; Stuer et al., 1986).

A atividade máxima verificada nos cultivos com *B. megaterium* (33 U/mL) foi superior aos valores observados para outras cepas de *Bacillus*, como por exemplo, *B. thermocatenulatus* – 1,1 U/mL frente ao *p*NPP (Schimdt-Dannert et al, 1994), *B. circulans*, 18,9 U/mL frente ao caprilato (C8) de *p*-nitrofenila (Kademi et al., 2000), *Bacillus* sp THL027, 7,8 U/mL frente ao óleo de oliva (Dharmsthiti e Luchai, 1999) e *Bacillus* sp RSJ-1, 10 U/mL frente ao *p*NPB (Sharma et al., 2002). Os resultados observados também foram superiores aos verificados por Jung et al. (2003), que isolaram uma cepa de *B. megaterium*, mas foram obrigados a clonar o gene e expressar em *E.coli* para que a atividade alcançasse níveis viáveis para os estudos.

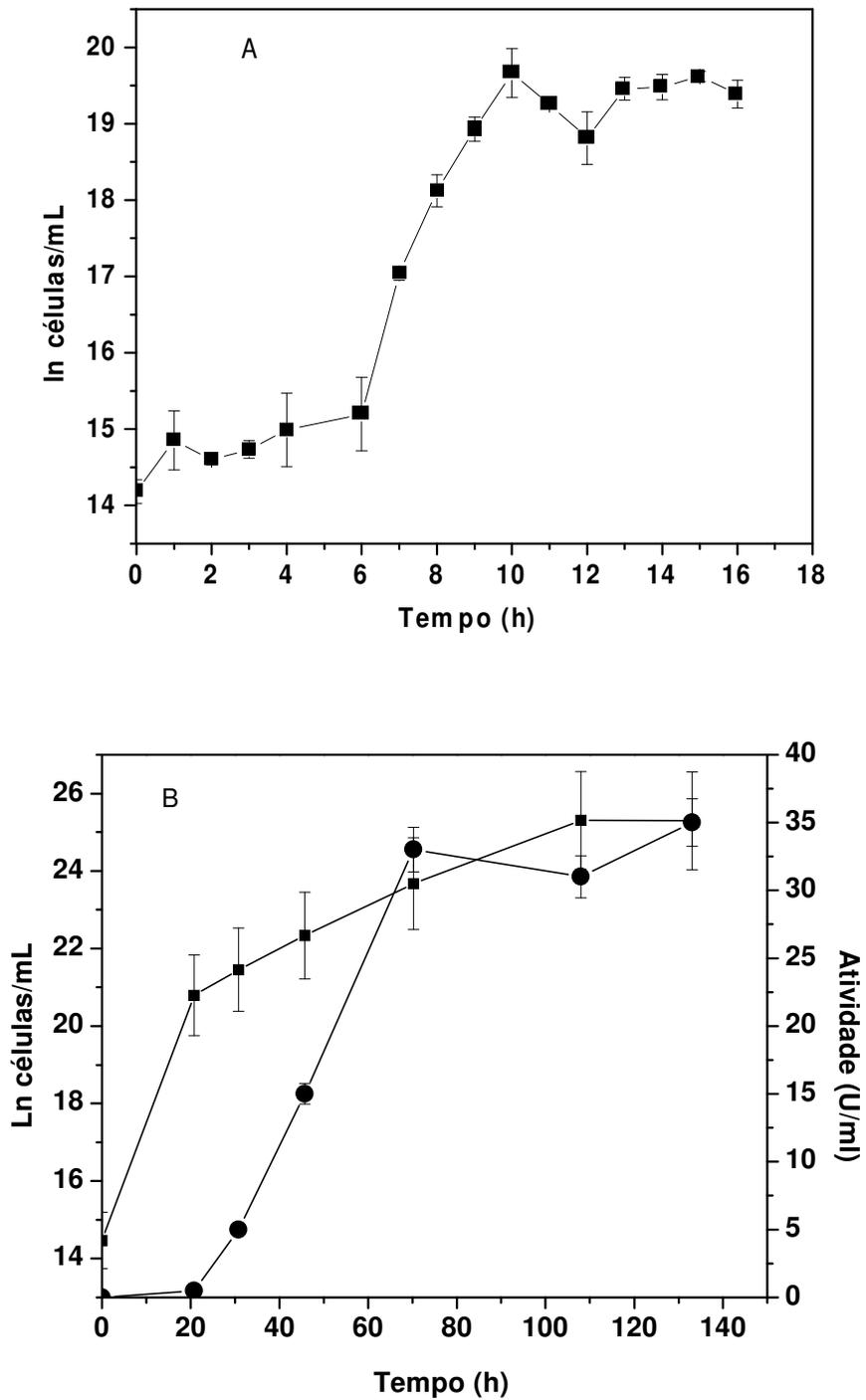


Figura 5.2. Cinética de crescimento e produção de lipases por *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. **A)** Cinética de crescimento em meio LB durante o preparo do pré-inóculo. **B)** Cinética de crescimento (■) e atividade lipolítica (●) durante a fermentação. Condições de cultivo: agitação orbital de 100 rpm, 29°C, atividade lipolítica acompanhada pelo método do pNPP. Experimentos realizados em triplicata.

5.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Após a seleção dos microrganismos, foram realizados cultivos com o objetivo de obter extrato bruto para utilização em estudos de estabilidade. Nesta fase dos estudos a finalidade era detectar características especiais das lipases produzidas (como por exemplo, termoestabilidade e estabilidade em solventes orgânicos) e comparar as enzimas produzidas pelos dois microrganismos: *Bacillus megaterium* e *Penicillium aurantiogriseum*. A enzima que demonstrasse maior potencial para utilização em biocatálise seria então purificada e caracterizada bioquimicamente.

O cultivo do fungo *P. aurantiogriseum* foi realizado como descrito anteriormente (Lima, 2000). A produção do extrato bruto foi também realizada por adição de sulfato de amônio até 80 %, e o fator de purificação obtido foi de 1,2. Ao final, este extrato bruto apresentou uma atividade específica de 48 U/mg.

O sobrenadante de cultura de *B. megaterium*, obtido conforme descrito na seção 4.3.2 e interrompido em 72 h quando a atividade lipolítica era máxima, foi concentrado por precipitação com sulfato de amônio até 80 % de saturação. Para o extrato de *B. megaterium* o rendimento e o fator de purificação estão apresentados na Tabela 5.4.

TABELA 5.4 - PRECIPITAÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 COM SULFATO DE AMÔNIO A 80 % DE SATURAÇÃO.

Frações	Atividade U totais	Proteínas mg	Atividade U/mg	Recuperação de atividade (%)	Fator de Purificação
Sobrenadante de cultura	43000	4171	10,3	100	-
Extrato bruto	26970	1240	21,7	63	2,1

Apesar dos baixos valores de fator de purificação, optou-se por realizar os ensaios de estabilidade com o extrato bruto devido à maior atividade lipolítica por mL na fração precipitada em relação ao sobrenadante de cultura, aumentando a sensibilidade dos ensaios de atividade.

5.5. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E DE ESTABILIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Bacillus megaterium* E *Penicillium aurantiogriseum*

Lipases são amplamente usadas em biocatálise devido à sua habilidade de catalisar não somente a hidrólise de triacilgliceróis em solução aquosa, mas também reações sintéticas enantiosseletivas em meio orgânico. As lipases devem ser razoavelmente termoestáveis e manter a atividade em meio de solvente orgânico para serem usadas em biocatálise. A termoestabilidade também é requerida, pois muitos processos empregam temperaturas ao redor de 50 °C, devido ao alto ponto de fusão dos lipídeos usados como substratos (Cho et al., 2000). A estabilidade em solventes orgânicos é outro fator importante, considerando que sistemas “aquu-restritos” são necessários a fim de deslocar o equilíbrio termodinâmico da reação em favor da síntese. Sistemas de solventes orgânicos também oferecem outras vantagens, tanto em reações hidrolíticas quanto sintéticas, como alta solubilidade de substratos e produtos, modificação da especificidade (Klibanov, 2001) e termoestabilização da enzima (Miroliaei e Nemat-Gorgani, 2002).

Considerando que as características bioquímicas podem variar grandemente entre as lipases encontradas na natureza, foram feitos experimentos de caracterização da atividade lipolítica do extrato bruto de *B. megaterium* e *P. aurantiogriseum*, a fim de avaliar o potencial de aplicação destas enzimas em biocatálise.

O fungo *P. aurantiogriseum* foi isolado em nosso laboratório, sendo que as condições de produção e algumas propriedades cinéticas, tais como efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade enzimática, foram relatadas anteriormente (Lima, 2000). Os resultados referentes à estabilidade a solventes orgânicos e atividade frente a diferentes substratos não foram apresentados previamente, estando incluídos no presente trabalho.

5.5.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade

A Figura 5.3 mostra o efeito da temperatura, em uma faixa entre 20 e 70°C, na atividade da lipase de *B. megaterium*. As maiores atividades foram observadas na faixa de 37 °C (71,4 U/mL) a 65 °C (72 U/mL). Os resultados obtidos para a lipase de *P. aurantiogriseum* não foram muito diferentes: a enzima demonstrou maior atividade a 60 °C (36,2 U/mL), mas altas atividades também foram verificadas a 50 °C (34,3 U/mL) e 70 °C (34,9 U/mL) (Lima et al., 2004; Lima, 2000).

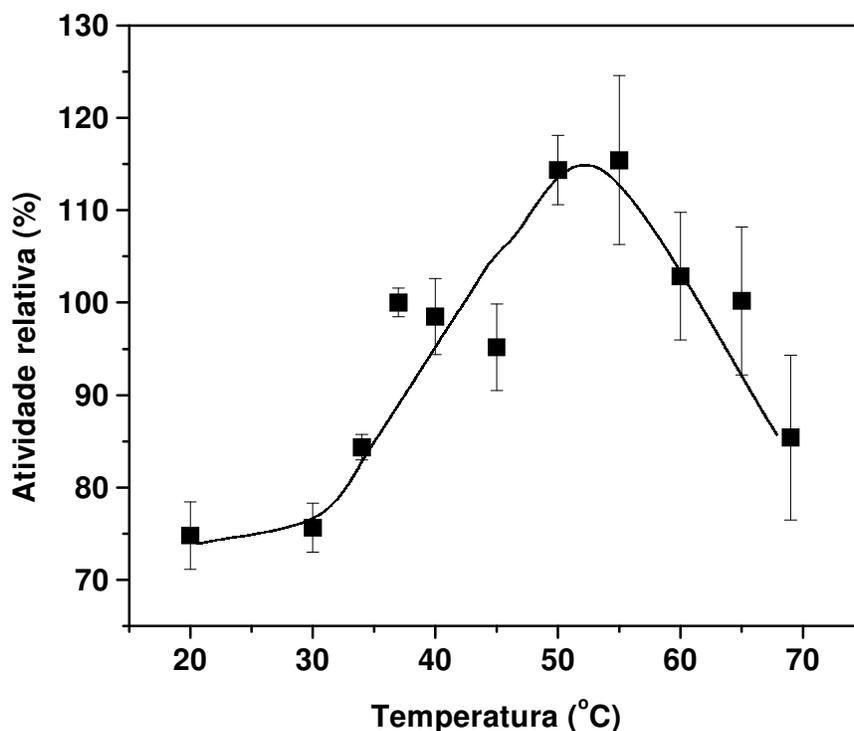


Figura 5.3. Efeito da temperatura na atividade lipolítica do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Condições do ensaio: temperatura entre 20 e 70°C, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, concentração de proteína: 3,8 µg e pNPP 0,03 mg/mL. Ensaio realizado em triplicata. Todas as atividades foram calculadas em relação à atividade medida na temperatura padrão de 37 °C (100%).

Para determinar a estabilidade térmica da lipase de *B. megaterium*, o extrato bruto foi incubado nas temperaturas de 30 a 70 °C. As atividades

residuais estão mostradas nas Figuras 5.4 A e B. Observa-se que a lipase de *B. megaterium*, mesmo após 10 min de incubação a 50 e 60 °C, manteve 77 e 76 % da atividade inicial. Os tempos de meia-vida calculados foram de 42 e 23 min para 50 °C e 60 °C respectivamente (Tabela 5.5). A comparação com os resultados anteriormente obtidos para a cepa fúngica mostrou que a lipase de *P. aurantiogriseum* foi menos estável à temperatura do que a de *B. megaterium*. Após 10 min de incubação nas temperaturas de 45 e 50 °C, observou-se somente 45 e 35 % da atividade inicial, respectivamente (Lima et al., 2004; Lima, 2000).

A atividade e a estabilidade da lipase produzida por *B. megaterium* na faixa de temperatura de 50 a 60 °C podem torná-la interessante para aplicação em biocatálise, pois estas características não são comuns para lipases de cepas mesofílicas de espécies de *Bacillus* como *B. megaterium*. A lipase do mesófilo *B. subtilis*, por exemplo, tem atividade máxima sobre *p*NPP a 35 °C e mantém somente 25 % da atividade residual após 30 min a 50 °C (Lesuisse et al., 1993).

De fato, as características observadas no presente trabalho para a lipase de *B. megaterium* são similares àquelas encontradas para espécies termofílicas de *Bacillus*, como *B. thermocatenulatus* com maior atividade a 65 °C frente a *p*NPP (Schmidt-Dannert et al., 1994), de *B. stearothermophilus*, com maior atividade entre 75 e 80 °C frente ao *p*NPP (Kambourova et al., 2003), *Pseudomonas luteola* com maior atividade entre 50 e 60 °C frente ao *p*NPP (Litthauer et al., 2002) e *Pseudomonas* sp. LP7315 com maior atividade a 70 °C frente ao *p*NPL (laurato de *p*-nitrofenila) (Sakiyama et al., 2001). Entre as fúngicas, lipases termoestáveis são ainda mais raras. As lipases de *Penicillium aurantiogriseum* (Lima et al., 2004), *Aspergillus niger* (Namboodiri et al., 2000) e *Fusarium heterosporum* (Shimada et al., 1993) mostraram boa atividade em temperaturas em torno de 50°C. As lipases de *Humicola lanuginosa*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* destacam-se por sua estabilidade à temperatura de 60 °C. A lipase de *H. lanuginosa* manteve 100 % da atividade após 20 h de incubação (Omar et al., 1987), a de *A. niger* manteve 80 % após 90 min (van Heerden et al., 2002) e a de *A. terreus* manteve 100 % após 24 h (Yadav et al., 1998).

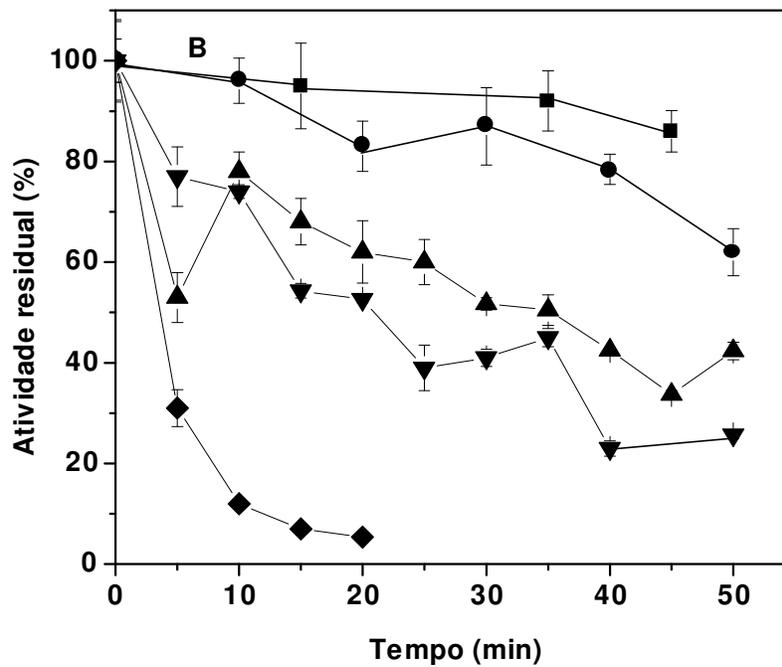
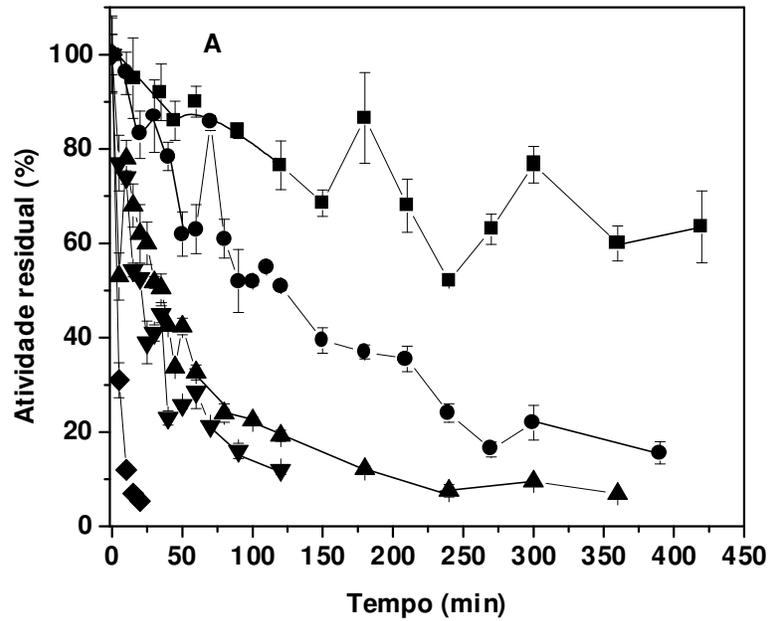


Figura 5.4. A) Estabilidade à temperatura da atividade lipolítica do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. B) Detalhe da Figura 5.4A: Estabilidade à temperatura nos primeiros 50 min de incubação. Atividade residual após incubação a 30 (■), 40 (●), 50 (▲), 60 (▼) e 70 °C (◆), tampão fosfato pH 7,0 0,02 mol/L. Condições de ensaio: temperatura de 37 °C, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, concentração de proteínas: 3,8 µg e pNPP 0,03 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata.

TABELA 5.5 - TEMPO DE MEIA-VIDA DA LIPASE DE *Bacillus megaterium*.

Temperatura (°C)	Meia-vida (min)
30	495
40	123
50	42
60	23
70	4

5.5.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade

O efeito do pH sobre a hidrólise do *p*NPP pela lipase de *B. megaterium* foi investigado em valores de pH entre 2,5 e 10 (Figura 5.5A). Foram verificadas altas atividades no intervalo de pH entre 5,0 e 7,0, com atividade máxima em pH 6,0. Atividades razoáveis foram obtidas mesmo nos valores mais ácidos de pH. Em pH 3,0 e 4,0 observou-se 60 e 73 % de atividade residual, respectivamente.

A estabilidade da atividade enzimática do extrato bruto de *B. megaterium* em diferentes valores de pH também foi investigada. A enzima permaneceu estável em valores de pH entre 5,0 e 8,0, após incubação de 1 h a 29 °C (Figura 5.5B), e mesmo em pH 8,5 ainda apresentou 60 % de atividade residual. Em tampão fosfato pH 7,0, 7,5 e 8,0 observou-se uma ativação em relação à atividade da enzima não incubada. Este efeito tem sido relatado para outras lipases, mas nenhum mecanismo foi proposto para explicar este fenômeno. Em pH 4,0 obteve-se 70 % de atividade residual, mas em pH 3,0, a lipase foi totalmente inativada após 1 h de incubação.

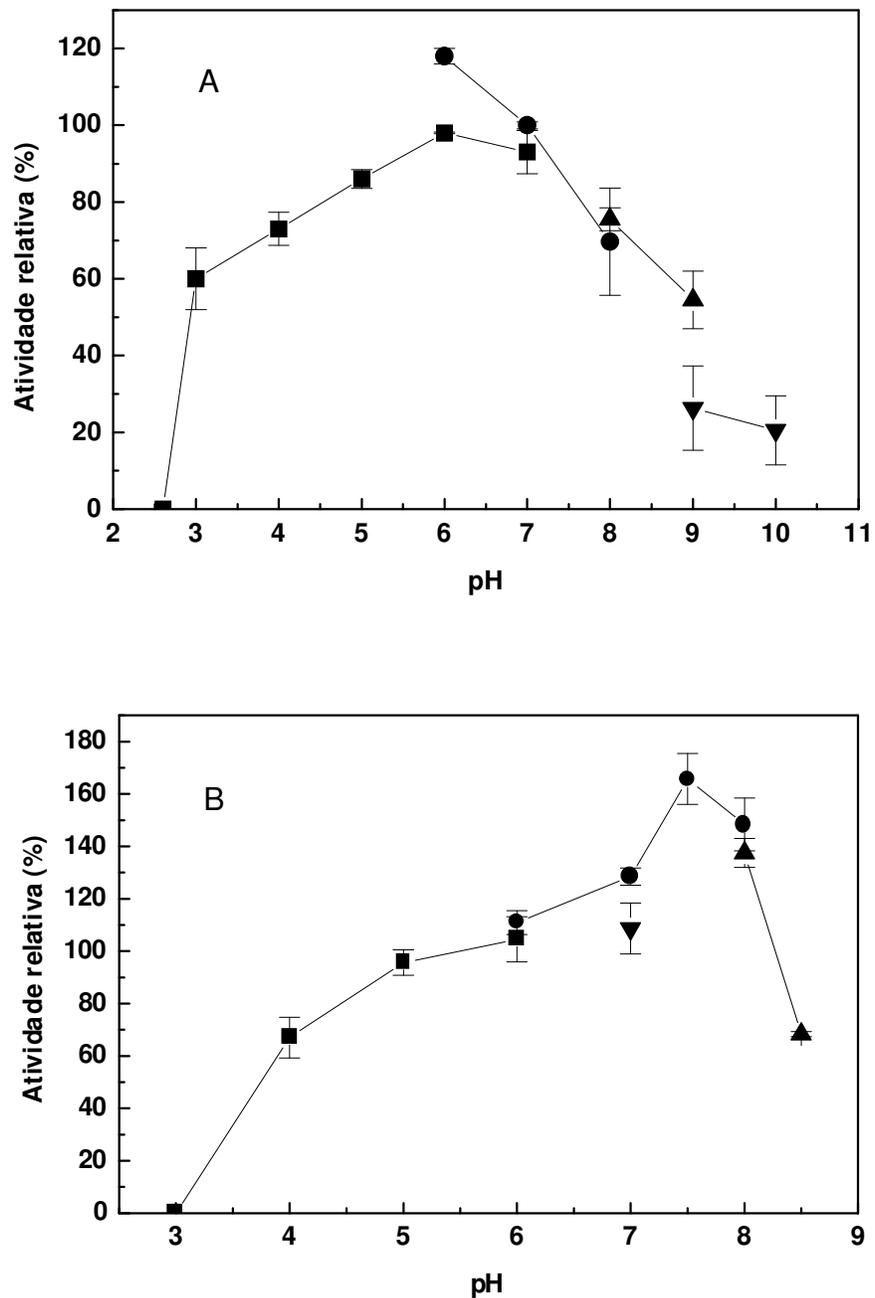


Figura 5.5: A) Efeito do pH na atividade lipolítica do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Condições de ensaio: 37 °C, 3,8 µg de proteínas, 0,03 mg/mL de pNPP. B) Estabilidade ao pH da atividade lipolítica do extrato bruto de *B. megaterium*. Atividade residual após 1 h de incubação a 29°C, tampões utilizados nos dois ensaios (0,02 mol/L): citrato-fosfato pH 2,5 a 7,0 (■), fosfato pH 6,0 a 8,0 (●), Tris-HCl pH 8,0 a 9 (▲), Glicina-NaOH pH 9 e 10 (▼) em (A) ou água destilada (▼) em (B). Condições de ensaio: 37°C, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, concentração de proteínas: 3,8 µg e pNPP 0,03 mg/mL. As atividades foram comparadas com a atividade determinada em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0 sem pré-incubação. Ensaios realizados em triplicata.

A atividade e estabilidade mostradas pela lipase da bactéria *B. megaterium* em valores de pH ácidos não são comuns entre lipases produzidas por bactérias, as quais em geral são mais estáveis e ativas em valores neutros ou alcalinos de pH. Entretanto, há algumas exceções. As lipases produzidas por *B. stearothermophilus* e *B. licheniformis* são estáveis a pH 3,0, mantendo 100 % de atividade residual após 30 min de incubação (Bradoo et al., 1999) e a lipase de *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 mantém 85 % de atividade residual após 2 h em pH 4,0 a 4 °C (Pratuangdejkul e Dharmsthiti, 2000).

Comparativamente, a lipase de *P. aurantiogriseum* apresentou atividade máxima em pH 8,0. Com relação à estabilidade, a enzima manteve 100 % da atividade inicial entre pH 5,0 e 9,0 após incubação por uma hora a 28 °C (Lima et al., 2004; Lima, 2000).

Os resultados aqui encontrados, ou seja, atividade e estabilidade numa faixa relativamente ampla de pH (3,0 a 9,0), também são desejáveis em biocatálise e somam-se às boas características frente à temperatura apresentadas pela lipase produzida por *B. megaterium*.

5.5.3. Atividade frente a diferentes substratos

A definição atual de lipases caracteriza esta classe de enzimas através da hidrólise preferencial de substratos com cadeia acila com mais de 10 carbonos. Enzimas com atividade hidrolítica somente sobre substratos com cadeias menores são classificadas genericamente como esterases (Jaeger et al., 1999; Ferrato et al., 1997; Verger, 1997; Egloff et al., 1995; Jaeger et al., 1994.). A determinação do comportamento hidrolítico de uma enzima, portanto, é importante para a classificação desta dentro da classe adequada, como lipase ou esterase. Assim, a caracterização da atividade frente a diferentes substratos foi feita a fim de determinar se as enzimas contidas nos extratos de *B. megaterium* e *P. aurantiogriseum* eram de fato lipases.

Frente a diferentes ésteres de *p*-nitrofenol, ambos os extratos lipolíticos apresentaram atividade crescente de acordo com o aumento da cadeia acila (Tabela 5.6). O aumento da atividade de acordo com o aumento da cadeia foi mais pronunciado, entretanto, com o extrato bruto de *B. megaterium*. A atividade frente ao butirato de *p*-nitrofenila (*p*NPB) em relação ao palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) foi 2,5 vezes menor com o extrato de *B. megaterium* e 1,8 vezes menor com o extrato de *P. aurantiogriseum*.

A atividade frente a triacilgliceróis demonstrou perfil inverso ao observado com os ésteres de *p*-nitrofenol, obtendo-se maior atividade com os substratos de menor cadeia acila, tanto com o extrato de *B. megaterium*, quanto de *P. aurantiogriseum*. Resultados semelhantes foram observados para as lipases lip A da bactéria *Bacillus subtilis* (Eggert et al., 2000) e para uma lipase termoestável de *Burkholderia cepacia* (Sugihara et al., 1992). A trioleína é o substrato típico de lipases e não é hidrolisada por esterases. Portanto, a capacidade de hidrolisar este triacilglicerol indica a presença de lipases verdadeiras no extrato bruto concentrado, tanto de *B. megaterium* quanto de *P. aurantiogriseum*. Esta definição é válida mesmo considerando-se que a taxa de hidrólise da trioleína tenha sido menor do que a de outros triacilgliceróis de cadeia curta.

A preferência de substrato de lipases de *Bacillus* varia tanto com relação à hidrólise de ésteres de *p*-nitrofenol, quanto de triacilgliceróis. A lipase de *B. megaterium* mostrou-se diferente de outras lipases de *Bacillus* com relação à preferência de substrato. Enquanto a lipase de *B. megaterium* apresentou maior atividade frente a *p*NPP (C16) e tributirina (C4), as lipases de duas cepas de *B. stearothermophilus*, tiveram maior atividade frente a *p*NPCA (C10) e tricaprilina (C8) (Sinhaikul et al., 2001); *p*NPCL (C8) e trilaurina (C12) (Kim et al., 1998). A lipase de *B. thermoleovorans* (Lee et al, 1999) teve maior atividade frente a *p*NPC (C6) e tricaprilina (C8) e a de *B. thermocatenulatus* (Schmidt-Dannert et al, 1994) apresentou maior atividade com *p*NPCA (C10) e tributirina (C4).

A lipase de *P. aurantiogriseum* apresentou atividade crescente de acordo com o aumento da cadeia acila nos ésteres de *p*-nitrofenila, sendo que as maiores atividades foram obtidas com *p*NPCA (C10) - 94 U/mg e *p*NPP (C16) – 88 U/mg (Tabela 5.6). A atividade frente à tributirina foi maior do que a obtida frente à trioleína, 17,8 e 3,2 U/mg, respectivamente (Lima et al., 2004). Os resultados observados para a lipase de *P. aurantiogriseum* com relação à hidrólise de ésteres de *p*-nitrofenila e triacilgliceróis assemelham-se aos observados para a lipase de *Penicillium candidum* (Ruiz et al., 2001): maior atividade sobre ésteres de *p*-nitrofenila com cadeia entre 10 e 16 carbonos e maior atividade frente a tributirina do que frente a trioleína.

TABELA 5.6 - ATIVIDADE DO EXTRATO LIPOLÍTICO BRUTO FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS.

Substrato	<i>B. megaterium</i> (U.mg ⁻¹)	<i>P. aurantiogriseum</i> (U.mg ⁻¹)
acetato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPA) (2:0)	19,4 ± 1	0
butirato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPB) (4:0)	128,3 ± 1	47,1 ± 0,4
caproato de <i>p</i> -nitrofenilal (<i>p</i> NPC) (6:0)	238,8 ± 2	73,9 ± 1
caprato de <i>p</i> -ntrofenila (<i>p</i> NPCA) (10:0)	nd	94,0 ± 1
palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPP) (16:0)	317,7 ± 5	87,8 ± 0,5
Tributirina (4:0)	228,4 ± 19	17,8 ± 0,8
Tricaprilina (8:0)	139,2 ± 14	nd
Trioleína (18:1 (Δ ⁹))	54,7 ± 3	3,2 ± 0,3

*nd: não determinado. Condições de ensaio: 37 °C, pH 7,0. Determinações em triplicata.

5.5.4. Estabilidade em solventes orgânicos

Como citado anteriormente, a estabilidade em solventes orgânicos é uma importante característica de lipases, podendo determinar o uso da enzima como catalisador em reações de síntese, além de predizer quais solventes podem ser utilizados nos meios de reação. Entretanto, apesar das vantagens da biocatálise em meio orgânico, a atividade das enzimas nestes sistemas são normalmente muito menores do que em soluções aquosas (Pencreac`h e Baratti, 2001). Em um aparente paradoxo, a estabilidade das proteínas é menor em solventes miscíveis

em água do que nos solventes hidrofóbicos. A pouca estabilidade em solventes hidrofílicos representa um problema para o uso de lipases envolvendo, por exemplo, a esterificação de açúcares durante a produção de biosurfactantes, dado que nestas reações o meio consiste de solventes polares como 2-metil 2-butanol (Soultani et al, 2001).

O logaritmo de P ($\log P$) é um dos parâmetros utilizados para a escolha do solvente a ser empregado em sistemas de biocatálise. O $\log P$ é uma medida da hidrofobicidade do solvente e é calculado pelo logaritmo do coeficiente de partição de um dado solvente em um sistema padrão octanol/água. De acordo com Zaks e Klivanov (1988) e Sztajer et al. (1992), solventes hidrofílicos ($-2.5 < \log P < 0$), tais como acetona e éteres, são geralmente incompatíveis com a atividade enzimática devido à retirada da água de solvatação da estrutura protéica.

Na Tabela 5.7 estão apresentados os resultados de estabilidade dos extratos brutos de *B. megaterium* e *P. aurantiogriseum*. A enzima de *P. aurantiogriseum* não apresentou atividade após incubação com etanol, isopropanol e acetona (Lima et al., 2004). Entretanto, para o extrato bruto da lipase de *B. megaterium* os resultados foram surpreendentes, mostrando ativação da enzima em alguns casos: com a incubação da lipase em diferentes porcentagens de etanol, isopropanol e acetona, observou-se um aumento na atividade enzimática em relação à atividade obtida com um controle incubado em tampão fosfato. Quando o extrato bruto de *B. megaterium* foi incubado com 50 % (v/v) de isopropanol e 80 % (v/v) de etanol, foram observados valores de atividade 76 % e 95 % maiores do que o controle, respectivamente. A atividade lipolítica mostrou-se estável com até 80 % (v/v) de acetona. Em incubações realizadas em 100 % de isopropanol, observou-se atividade aproximadamente igual à observada com o controle. Incubações em 100 % de acetona ou etanol resultaram em atividades em torno de 80 e 65 % menores do que o controle. As ativações observadas em presença de isopropanol, etanol e acetona podem ser devidas ao rompimento de agregados formados entre estruturas proteicas e

material lipídico residual, como foi observado por Sugihara et al. (1992). Outra possibilidade para explicar a ativação em presença de isopropanol foi proposta e demonstrada por Zhu et al. (2001). O isopropanol promoveu a abertura da *lid* da lipase de *Thermomyces lanuginosa*, como verificado pela mudança na emissão de fluorescência do triptofano presente na *lid*, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo.

A estabilidade de lipases bacterianas ou fúngicas em solventes orgânicos hidrofílicos é uma característica rara, e ativação da enzima por estes solventes, como verificado para a lipase de *B. megaterium*, é mais rara ainda. A lipase de *P. mendocina* PK12CS (Jinwal et al., 2003) é o único exemplo de uma lipase microbiana que é razoavelmente estável em solventes hidrofílicos, quando incubada por 2,5 h em 100 % de etanol a atividade residual foi de 83 %.

Como mostra a Tabela 5.7, a enzima de *B. megaterium* também mostra estabilidade em solventes orgânicos imiscíveis em água, apresentando atividade residual de 121 % com n-heptano, 107 % com tolueno, 101 % com hexano e 102 % com butanol. Estes resultados eram esperados e estão de acordo com os descritos por Zacks e Klibanov (1988 a e b) que observaram que solventes imiscíveis em água ($2 < \log P < 4$), tais como alcanos, não prejudicam a atividade catalítica ou podem até mesmo ativar a enzima. O efeito positivo dos solventes apolares pode ser analisado sob dois aspectos. Primeiro, ao contrário dos solventes com $\log P$ menor do que 2, estes solventes não retiram a água de solvatação da estrutura proteica prevenindo a desnaturação. Segundo, moléculas do solvente podem interagir com a estrutura proteica e exercer efeitos ativadores ou estabilizadores. Rúa et al. (1993) sugeriram que solventes apolares podem manter a enzima em sua conformação aberta, ou seja, em presença destes solventes, a *lid* não estaria cobrindo o sítio ativo, o que poderia justificar a ativação da enzima. Torres e Otero (1996), estudando a lipase de *Candida rugosa*, verificaram uma ativação de 80% após pré-incubação da enzima em n-heptano ($\log P = 4$). A ativação da lipase de *C. rugosa* foi acompanhada por uma alteração na emissão de fluorescência do triptofano, indicando que o solvente

realmente provoca uma alteração conformacional na estrutura proteica, podendo estar relacionada ao aumento da atividade. É interessante ressaltar que a emissão de fluorescência foi determinada após a retirada do solvente e após solubilização da proteína em tampão. Entretanto, moléculas do solvente podem ter permanecido ligadas à lipase, tal como verificado para a γ -quimotripsina, cujo estudo cristalográfico revelou a presença de sete moléculas de n-heptano estabilizando a conformação desta protease (Yennawar et al., 1994).

A lipase de *P. aurantiogriseum* apresentou boa estabilidade em solventes orgânicos imiscíveis em água, observando-se atividade residual de 114 % para n-heptano, 92 % para hexano, 82 % para tolueno e 91 % para isooctano (Lima et al., 2004). Estabilidade em solventes apolares também foi verificada para lipases de outros fungos como de *Penicillium simplicissimum* (Sztajer et al., 1992) e *Mucor hiemalis f. hiemalis* (Hiol et al., 1999).

TABELA 5.7 - ESTABILIDADE EM SOLVENTES ORGÂNICOS

Solvent orgânico	Log P	Atividade residual (%)	
		<i>B. megaterium</i>	<i>P. aurantiogriseum</i>
Tampão fosfato pH 8,0		100	100
Isopropanol 25 %	-0,28	166 ± 13	nd
		50 %	nd
		80 %	nd
		100 %	1,9 ± 0,5
Etanol 25 %	-0,24	111 ± 20	nd
		50 %	nd
		80 %	nd
		100 %	0
Acetona 25 %	-0,23	128 ± 2	nd
		50 %	nd
		80 %	nd
		100 %	0
Butanol	0,8	102 ± 16	6,4 ± 0,7
Tolueno	2,5	107 ± 8	82 ± 0,8
Hexano	3,5	101 ± 4	92 ± 2
n-Heptano	4,0	121 ± 6	114 ± 5
Isooctano	4,51	67 ± 5	91 ± 0,9

* nd: não determinado. Os valores de porcentagens que acompanham os solventes orgânicos correspondem à quantidade de solvente em tampão fosfato pH 8,0. Ensaio em triplicata.

A partir destes dados, verificou-se que a enzima de *B. megaterium* apresentava maior estabilidade em solventes orgânicos do a enzima de *P. aurantiogriseum*, especialmente com relação aos solventes hidrofílicos. Deste modo, considerando-se as propriedades gerais apresentadas pela enzima produzida por *B. megaterium* até aqui determinadas (alta produtividade no meio de cultura - 33 U/ml, estabilidade e atividade em amplas faixas de pH e temperatura - 3,0 a 9,0 para o pH, 37 a 60°C, e estabilidade a solventes orgânicos - mesmo hidrofílicos) decidiu-se dar continuidade aos estudos com esta enzima, verificando-se a sua capacidade de catálise em meio de micelas reversas e realizando-se a sua purificação e caracterização bioquímica.

5.5.5. Atividade da lipase de *Bacillus megaterium* em micelas reversas

As enzimas têm sido tradicionalmente estudadas em meios aquosos, entretanto, o emprego de sistemas “aquo-restritos” pode ser atrativo, especialmente quando substratos ou produtos são lipofílicos e um baixo conteúdo de água é desejado (Fernandes et al 2004, Carvalho e Cabral, 2000). Os sistemas de micelas reversas têm sido estudados como meio de reação para biocatálise e diversas são as vantagens destes sistemas citadas pela literatura. As micelas reversas, por exemplo, são reconhecidas como modelos de estruturas biológicas e permitem a solubilização tanto de substratos e produtos hidrofílicos quanto hidrofóbicos, proporcionando uma grande área interfacial de contato (10-100 m²/mL). Além disso, as micelas impedem contato direto da proteína com o solvente orgânico e possibilitam a utilização de temperaturas mais altas - já que a estabilidade térmica frequentemente aumenta em meios com baixo conteúdo de água. O fato das soluções micelares serem isotópicas também constitui uma vantagem, pois permite o uso de técnicas espectroscópicas simples para o acompanhamento das reações (Carvalho e Cabral, 2000).

Estudos recentes (Pencreac’h e Baratti, 2001), comparando a atividade de 32 lipases comerciais em meio aquoso e em meio orgânico, demonstraram que

não há uma relação fixa entre as atividades lipolíticas nos dois meios, ou seja, não há como prever a atividade de uma enzima em meio orgânico baseando-se em sua atividade em meio aquoso. Estes resultados ressaltam a importância de se estudar a capacidade catalítica de lipases diretamente em meio orgânico e assim avaliar o potencial de aplicação destas enzimas em biocatálise. Visando avaliar o potencial de catálise da lipase de *B. megaterium* em meio orgânico, desenvolveu-se uma metodologia de hidrólise de *p*NPP em meio de micelas reversas, a fim de se comparar com sua atividade hidrolítica sobre o mesmo substrato em meio aquoso. A comparação se dá através do cálculo da relação $R_{O/A}$, onde R é relação entre a atividade em meio orgânico micelar (O) e em meio aquoso (A). Esta relação é possível porque a mesma reação, a hidrólise do *p*NPP, é utilizada em ambos os meios.

A catálise em sistemas de micelas reversas está sob a influência de diversos fatores como natureza do solvente e tensoativo, atividade de água (a_w), temperatura, pH, molaridade do tampão e a razão molar água/tensoativo (W_0). O fator W_0 e a a_w são formas diferentes de expressar a quantidade de água presente nas micelas. Entretanto, enquanto o W_0 é facilmente calculado, a a_w depende de diversos fatores e de equipamento específico. Assim, o grau de hidratação das micelas reversas é geralmente dado através do valor de W_0 . O valor de W_0 mais adequado depende do tamanho da proteína, da concentração de proteína presente na solução e do tipo de reação a ser catalisada: reações hidrolíticas e sintéticas requerem valores de W_0 diferentes. Em valores de W_0 abaixo de 2, a água presente não é suficiente para a solubilização de proteínas, no intervalo entre W_0 4 e 10 a água somente hidrata a cabeça polar do surfactante e acima de W_0 10 há a presença de água livre no interior da micela (Carvalho e Cabral 2000).

Dentro do intervalo de W_0 estudado (Tabela 5.8), as maiores atividades específicas foram verificadas nos valores de W_0 de 5 (609,5 U/mg) e de 10 (571,4 U/mg). Em W_0 de 15 e 20 foi observado grande decréscimo da atividade, obtendo-se menos de 50 % da atividade verificada com W_0 de 5.

Considerando-se a maior atividade específica obtida em meio micelar, 609,5 U/mg em W_0 5, calculou-se a relação $R_{O/A}$. A enzima foi mais ativa em meio micelar do que em meio aquoso, apresentado uma relação $R_{O/A}$ de 1,9. O valor de 1,9 obtido para $R_{O/A}$ é maior do que os valores citados por muitos outros autores para outras lipases. De fato, é muito mais comum a atividade em solvente orgânico ser menor do que a determinada em meio aquoso (isto é, o $R_{O/A}$, tende a ser muito menor que 1). Nos estudos de Pencreac’h e Baratti (2001) de 32 lipases estudadas somente 6 apresentaram um valor de $R_{O/A}$ maior que 1. Mesmo em sistema de micelas reversas, o $R_{O/A}$ tende a ser menor do que 1. Por exemplo, a lipase de *Penicillium corylophilum*, estudada nas mesmas condições do presente trabalho, apresentou um $R_{O/A}$ de 0,004 (Baron, 2003).

TABELA 5.8 - ATIVIDADE DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 EM MICELAS REVERSAS EM DIFERENTES VALORES DE W_0

W_0	Atividade específica (U mg ⁻¹)
5	609,5 ± 43
10	571,4 ± 37
15	224 ± 43
20	176 ± 22

* O sistema reacional foi composto de AOT/heptano, com 0,01mol/L de pNPP. Diferentes volumes de enzima foram adicionados, mantendo-se a mesma concentração de proteínas, de modo a obter valores de W_0 entre 5 e 20: 45, 90, 135 e 180 µL. O sistema foi incubado a 37 °C. Ensaio realizado em triplicata.

5.6. ENSAIOS PRELIMINARES DE PURIFICAÇÃO

5.6.1 Análise do sobrenadante de cultura e do extrato bruto por gel permeação

A cromatografia de gel permeação baseia-se na separação de proteínas de acordo com a massa molar e tem sido utilizada para a purificação de lipases microbianas (Saxena et al., 2003). Trabalhos anteriores mostraram que muitas vezes lipases formam agregados de alta massa molar, que eluem no volume morto da coluna de gel permeação, o que facilita a purificação posterior (Tabela

2.4) (Krieger et al, 1999). Assim, o objetivo deste ensaio foi verificar se a lipase de *B. megaterium* apresentava a tendência de formar agregados, ou se já era produzida como um agregado de alta massa molar no meio de cultura.

O extrato bruto, centrifugado duas vezes a 10.000g por 15 min, foi aplicado em coluna de gel permeação Superose 6. O perfil de eluição está apresentado na Figura 5.6A. A atividade enzimática foi eluída logo após o volume morto da coluna ($V_0 = 6$ mL), indicando a presença de um agregado de alta massa molar (> 200 kDa). O fator de purificação observado foi de 12,4, conforme mostra a Tabela 5.9. As frações com atividade lipolítica eluídas entre os volumes de 7 e 15 mL foram reunidas, concentradas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE (Figura 5.7). As frações eluídas da coluna apresentaram quase tantas bandas quanto o sobrenadante de cultura, o que indicou ineficiência neste passo cromatográfico na purificação da enzima.

O sobrenadante de cultura foi aplicado na mesma coluna (Figura 5.6B) a fim de se verificar se a agregação era causada pelo tratamento com sulfato de amônio. Igualmente a atividade enzimática foi eluída no volume morto, indicando que a interação entre as estruturas protéicas já existia no meio de fermentação e não era devido à concentração das proteínas por precipitação com sulfato de amônio. É interessante notar, que comparando as figuras 5.6 A e B, fica evidente a contribuição da precipitação com sulfato de amônio a 80 % na remoção dos contaminantes. Existe um grande pico de absorvância a 280 nm entre os volumes de eluição de 20 e 30 mL na análise do sobrenadante de cultura (Figura 5.6B), que desaparece após a precipitação com sulfato de amônio (Figura 5.6A).

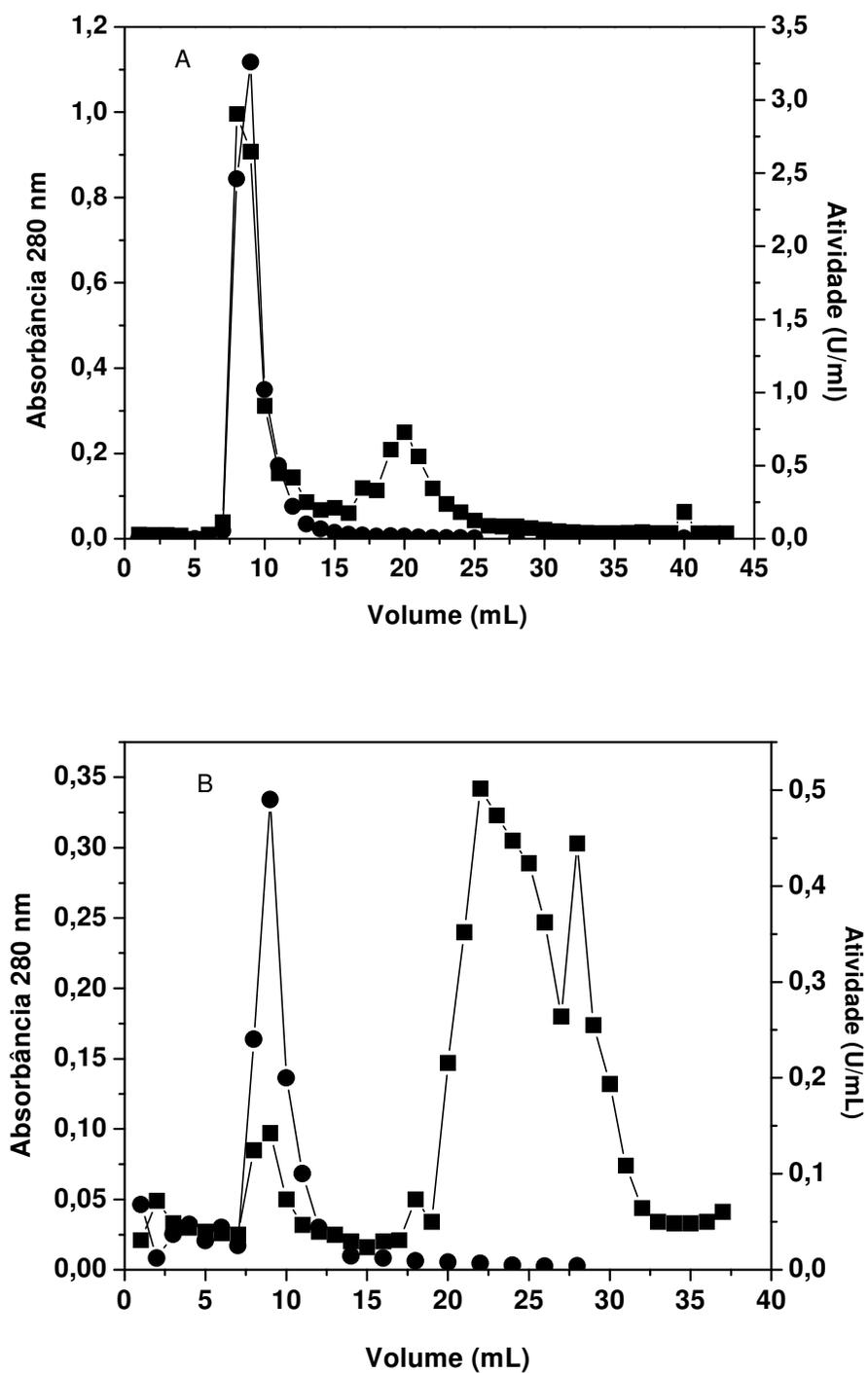


Figura 5.6. Perfil de eluição do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 em coluna Superose 6. **A)** Injeção do extrato bruto; **B)** Injeção do sobrenadante de cultura. Atividade lipolítica (●), Absorbância a 280 nm (■). Condições: tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,0 com NaCl 0,15 mol/L; fluxo de 0,2 mL/min; injeção de 1 mL; coleta de frações de 1 mL.

TABELA 5.9 – ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 POR GEL PERMEAÇÃO .

Fração	Volume (mL)	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator Purificação
Sobrenadante de cultura	5	20	0,5	40	100	-
Extrato bruto	1	95,4	1,02	92,5	92,5	2,3
Superose 6	7,3	6,4	0,013	495	46,7	12,4

*Condições de ensaio: Coluna Superose 6, tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0 contendo NaCl 0,15 mol/L, fluxo de 0,2 mL/min.

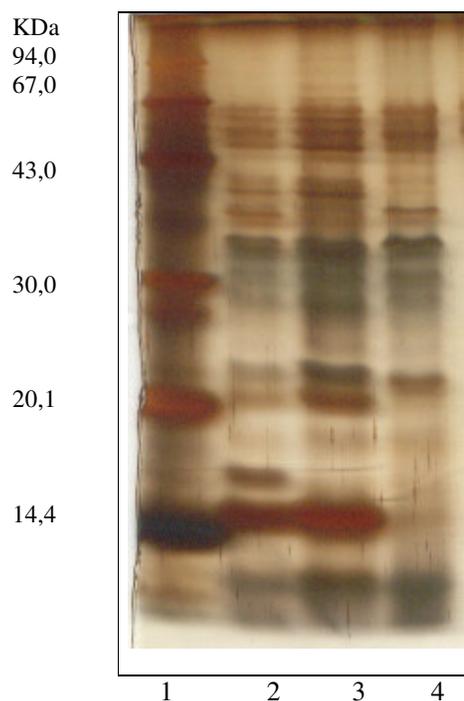


Figura 5.7. Eletroforese SDS-PAGE após análise do extrato bruto por gel permeação em coluna Superose 6. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: sobrenadante de cultura, linha 3: extrato bruto, linha 4: frações reunidas após eluição da coluna Superose 6. Foram aplicados 10 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.

A formação de agregados de alta massa molar tem sido citada em inúmeros trabalhos sobre purificação de lipases. Formam agregados, por exemplo, as lipases de *Bacillus*: *B. subtilis* (Lesuisse et al., 1993), *B. thermocatenuatus* (Schmidt-Dannert et al., 1994, Rúa et al., 1997), *Bacillus* sp THL027 (Dharmisthiti e Luchai, 1999) e *B. thermoleovorans* (Lee et al., 2001a).

O mesmo comportamento ocorreu também com enzimas de outras espécies de bactérias e fungos, como para a lipase de *Pseudomonas cepacia* (Dünhaupt et al., 1992), *Pseudomonas aruginosa* (Stuer et al., 1992) e *Penicillium citrinum* (Krieger et al., 1999). A agregação pode ser devida a um alto conteúdo de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na estrutura protéica (Sugimura et al., 2000) ou à presença de materiais hidrofóbicos, tais como lipídeos e lipopolissacarídeos, que estão no meio de fermentação (Stuer et al., 1986). Isto é especialmente verdadeiro quando se utilizam lipídeos como indutores no meio de cultura para produção de lipases, como foi o caso deste trabalho.

O rompimento destes agregados e a obtenção de enzimas puras têm sido um desafio, e para isto, diferentes metodologias têm sido empregadas, como o tratamento com detergentes (Stuer et al., 1986), técnicas de extração líquido-líquido e cromatografia de interação hidrofóbica (Saxena et al., 2003).

5.6.2. Ensaios para clarificação do extrato bruto e desagregação da enzima

Como citado anteriormente, o sobrenadante de cultura apresentava-se extremamente turvo, mesmo procedendo a várias centrifugações a 10.000g por 30 min. Após a precipitação com sulfato de amônio com 80 % de saturação, o extrato bruto também apresentava-se extremamente turvo e, de acordo com as análises de gel permeação apresentadas anteriormente, a enzima estava presente na forma de agregados de alta massa molar. A natureza dos agregados era desconhecida, podendo ser constituídos de material protéico e lipídico. Alguns autores especulam a possibilidade da interação de lipopolissacarídeos e lipases, ou lipídeos residuais do meio de fermentação e lipases (Stuer et al., 1986, Krieger, 1995). Com o objetivo de obter um extrato enzimático límpido e também para o rompimento dos agregados, diferentes testes foram realizados, como a precipitação com sulfato de amônio em duas etapas: 0-10 e 10-80 %; precipitação com sais de Mg^{+2} ; tratamento com um detergente (CHAPS) a 1 %

(m/v) e tratamento com isopropanol 30 % (v/v). Em todos os testes a atividade enzimática foi acompanhada pela hidrólise do *p*NPP.

5.6.2.1. Ensaio para clarificação

a) Precipitação com sulfato de amônio

Para tentar clarificar o extrato sem perder atividade enzimática procedeu-se a precipitação do sobrenadante de cultura com sulfato de amônio em duas etapas: 0-10 % e em seguida, 10-80 % de saturação. Como a presença de lipopolissacarídeos tem sido citada como responsável pela formação de agregados enzimáticos, além da atividade lipolítica, determinou-se também açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico. Os resultados estão mostrados na Tabela 5.10.

TABELA 5.10 – TRATAMENTO DO SOBRENADANTE DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SULFATO DE AMÔNIO E DOSAGEM DE AÇÚCARES TOTAIS..

Fração	Volume mL	Atividade U total	Proteína mg	Açúcar mg	Recuperação (%)	Fator de purificação
Sobrenadante de cultura	460	3464	340	221	100	-
0-10% precipitado	23,4	356	8,9	12	10	4
10-80% sobrenadante	530	212	-	35	6	-
10-80% precipitado	160	3200	32	112	92	10

A primeira etapa de precipitação não ocasionou perda significativa de atividade enzimática (apenas 10 % de atividade residual foram detectados no precipitado da etapa 0-10 % de saturação) e ainda proporcionou uma redução de 50 % na concentração de açúcar total no precipitado da segunda etapa de precipitação. Entretanto, não se observou vantagem com relação à clarificação do extrato. O precipitado da etapa 10-80 %, que continha 92 % da atividade inicial, após ressuspensão apresentou-se tão turvo quanto nos experimentos em que a precipitação era realizada diretamente com 80 %. Assim, a precipitação em duas

etapas não foi utilizada no prosseguimento dos estudos, mantendo-se a precipitação direta com 80 % de saturação.

b) Precipitação com Mg^{+2}

Os lipopolissacarídeos são exemplos de macromoléculas extracelulares produzidas por bactérias e que dificultam a separação das células e a purificação. A precipitação de lipopolissacarídeos com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} tem sido citada por alguns autores (Stuer et al., 1986, Galanos et al., 1971).

Ao extrato bruto foi adicionado $MgCl_2$ ou $MgSO_4$. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.11 e indicam que não ocorreu precipitação de açúcares com o tratamento com íons Mg^{+2} . Além disso, não foi observada nenhuma vantagem com relação ao aspecto do extrato bruto, que manteve a mesma forte turvação.

TABELA 5.11 - CLARIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO POR PRECIPITAÇÃO COM ÍONS Mg^{+2}

Fração	Atividade U total		Açúcar mg	
	precipitado	sobrenadante	precipitado	sobrenadante
Controle*	9	360	0,62	19
$MgCl_2$	20	270	0,7	19
$MgSO_4$	36	342	0,9	11,5

* submetido ao mesmo procedimento, mas sem adição de sal de magnésio. Ensaios realizados em triplicata.

5.6.2.2. Ensaios para clarificação do extrato bruto e desagregação da enzima

a) Tratamento do extrato bruto com CHAPS

Para o rompimento de agregados de lipases, Stuer et al. (1986) propuseram o tratamento do extrato a ser purificado com um detergente anfifílico, CHAPS, eficiente para a solubilização de proteínas de membrana. Os resultados do tratamento do extrato bruto com CHAPS são apresentados na Tabela 5.12.

TABELA 5.12 - TRATAMENTO DO EXTRATO BRUTO COM CHAPS PARA CLARIFICAÇÃO E ROMPIMENTO DO AGREGADO DE ALTA MASSA MOLAR.

CHAPS (%)	Atividade (U totais)				Aspecto
	Antes da centrifugação	Após a centrifugação			
		Sobrenadante	Precipitado		
0	362 ± 39	308 ± 33	9 ± 0,7	Turvo	
0,5	272 ± 15	198 ± 6	22 ± 1	Turvo	
1,0	258 ± 6	125 ± 19	80 ± 5	Ligeiramente turvo	
1,5	61 ± 14	38 ± 9	97 ± 5	Límpido	

* Ensaio realizado em triplicata. Atividade inicial corresponde a 60 U/mL. Foram utilizados 6 mL de extrato bruto, sendo que após a centrifugação o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0.

Os resultados indicaram que o CHAPS provoca a inibição da atividade enzimática, como pode ser observado comparando-se a atividade inicial com os valores obtidos após a simples adição do detergente, antes da centrifugação. A adição de 0,5 e 1 % de CHAPS provocou uma redução de 27 % na atividade, enquanto a adição de 1,5 % provocou a redução de 79 % da atividade. Além disso, com o aumento da porcentagem de CHAPS, aumentou a atividade enzimática detectada no precipitado após a centrifugação. Com a adição de 0,5 % de CHAPS observou-se 6 % de atividade residual no precipitado, enquanto com 1,5 % de CHAPS esta porcentagem se elevou para 27 %, o que indica que ocorreu a precipitação da enzima. Entretanto, na concentração de 1 e 1,5 % obteve-se significativa clarificação do extrato.

b) Tratamento do extrato bruto com Isopropanol

Rúa et al. (1997) observaram o rompimento de agregados da lipase de *B. thermocatenuulatus* utilizando isopropanol 30 % (v/v). Baseando-se nesta informação, desenvolveu-se uma metodologia para o tratamento do extrato bruto visando a sua clarificação e o rompimento dos agregados. As etapas do tratamento do extrato bruto com isopropanol 30 % (v/v) estão apresentadas na Figura 5.8. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.13. As dosagens de atividade enzimática foram realizadas com o extrato diluído em tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0 ou em isopropanol 30 %.

Após o tratamento com isopropanol e filtração em membrana de 0,2 μm , o extrato obtido estava límpido, mas a recuperação de atividade foi somente de 57 % (dosando-se a atividade enzimática com diluição em isopropanol). Já o extrato bruto tratado com isopropanol e centrifugado apresentou melhores resultados: a recuperação de atividade foi de 97 %, embora tenha permanecido uma ligeira turvação no sobrenadante.

Além disso, todas as diluições realizadas em isopropanol resultaram em atividades maiores do que as realizadas com tampão fosfato, confirmando o efeito positivo do isopropanol sobre a atividade enzimática. O mesmo foi evidenciado por Dunhäupt et al. (1992). Este efeito pode ser devido a rompimento de agregados enzimáticos ou a um efeito sobre a própria estrutura protéica, como discutido anteriormente na seção 5.5.4.

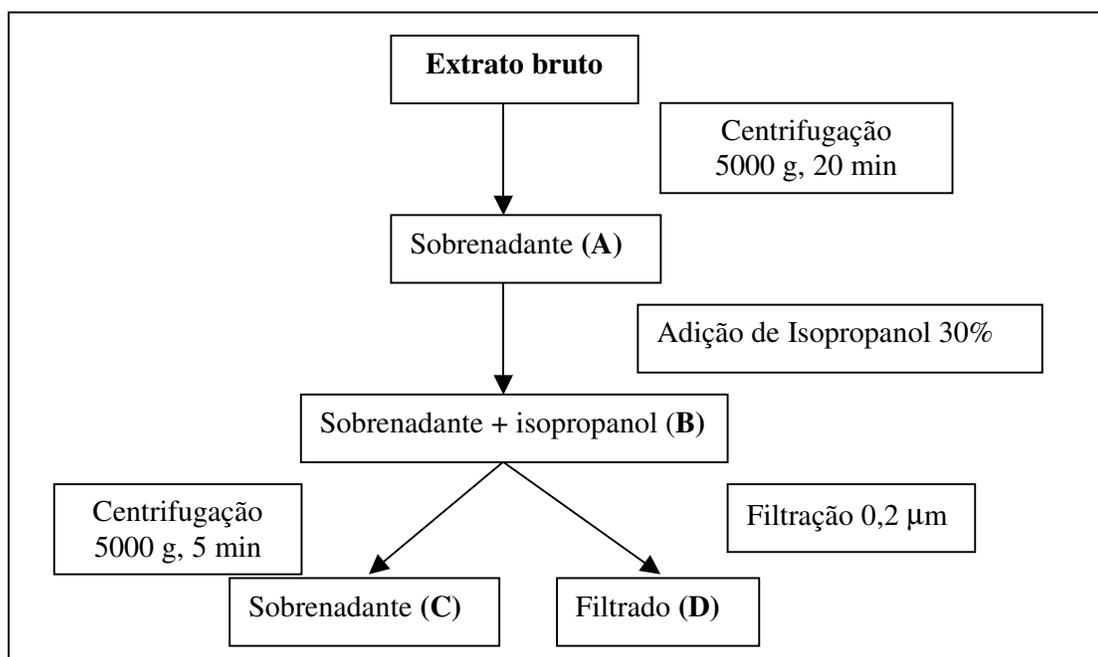


Figura 5.8. Etapas do tratamento do extrato bruto com isopropanol para clarificação e rompimento de agregados.

TABELA 5.13 - TRATAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 COM ISOPROPANOL 30 %.

Étapas	Atividade relativa (%) Diluição em tampão	Atividade relativa (%) Diluição em isopropanol
Extrato bruto	100	-
(A)	86	-
(B)	65	91
(C)	71,7	97
(D)	34	57

* Ensaio realizado em triplicata.

5.7. ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Baseando-se nos resultados obtidos nos testes de clarificação e ciente das características hidrofóbicas da lipase de *B. megaterium*, duas estratégias de purificação foram propostas. A primeira estratégia incluiu a precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio 80 %, a clarificação do precipitado com CHAPS 1% (que tinha proporcionado bons resultados de clarificação), a aplicação do extrato clarificado em coluna de interação hidrofóbica com eluição com CHAPS e a análise das frações ativas por gel permeação. A segunda estratégia de purificação incluiu a precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio 80 %, a clarificação do precipitado com isopropanol 30 % e a aplicação do extrato clarificado em coluna de interação hidrofóbica, eluindo-se com tampão Tris-HCl 0,02 mol/L pH 7,2 e isopropanol 60 % (v/v).

Nas duas estratégias testadas utilizou-se cromatografia de interação hidrofóbica. Este tipo de cromatografia tem sido extensivamente utilizado na purificação de lipases, principalmente devido ao forte caráter hidrofóbico destas enzimas que seria responsável pela formação dos agregados enzimáticos. Dos grupamentos utilizados neste tipo de cromatografia, grupos fenila e octila são os mais freqüentemente empregados (Saxena et al., 2003).

5.7.1. Purificação com tratamento prévio por detergente

Após o cultivo, o sobrenadante de cultura foi centrifugado e precipitado com sulfato de amônio a 80 %. Após nova centrifugação, ressuspensão em tampão e diálise, o extrato bruto foi clarificado por adição de CHAPS 1 % (m/v). O extrato clarificado foi aplicado em colunas de interação hidrofóbica, Octyl Sepharose CL4B e Phenyl Sepharose Fast Flow, que apresentam diferentes graus de hidrofobicidade conferidos pelas cadeias – fenila e octila - dos substituintes ligados à matriz. Em todos os casos a enzima foi eluída com gradiente de tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0 contendo CHAPS 1 % (m/v).

A enzima adsorveu fortemente na coluna de Octyl Sepharose CL4B (Figura 5.9). A atividade específica e o fator de purificação estão mostrados na Tabela 5.14. A análise de eletroforese SDS-PAGE das frações com atividade demonstrou que várias proteínas foram removidas pela cromatografia de interação hidrofóbica, entretanto, ainda permaneceram 5 bandas de proteína reveladas pelo nitrato de prata (Figura 5.10).

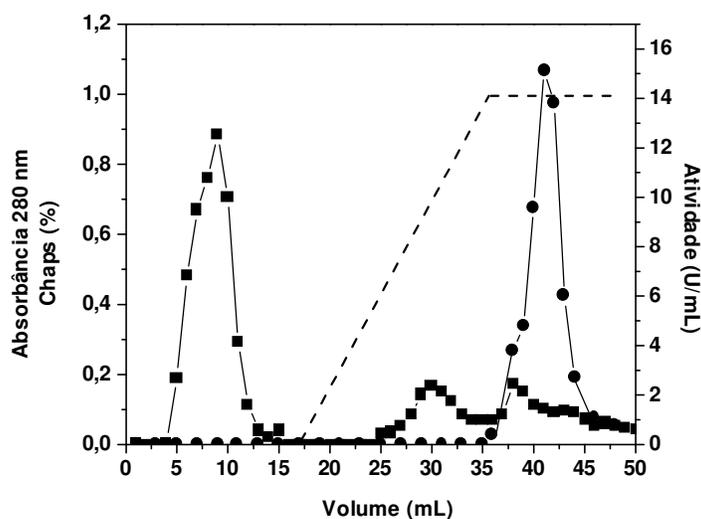


Figura 5.9. Perfil de eluição do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 em coluna Octyl Sepharose CL-4B. Atividade lipolítica (●), Absorbância a 280 nm (■), Gradiente de Chaps (traços). Condições: Eluição com gradiente - 1) tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,0 com $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1,2 mol/L; 2) tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0 com CHAPS 1%. Fluxo de 0,5 ml/min; injeção de 2 mL; coleta de frações de 1 mL.

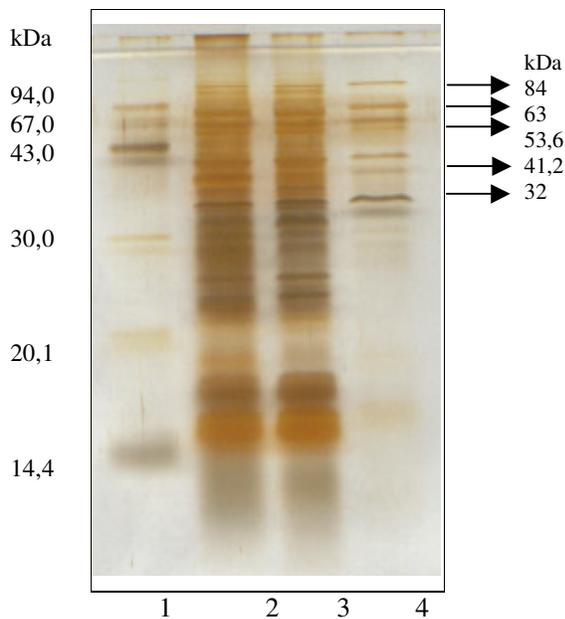


Figura 5.10. Eletroforese SDS-PAGE após análise do extrato bruto (tratado com CHAPS) por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Octyl Sepharose CL-4B. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: sobrenadante e cultura, linha 3: extrato bruto; linha 4: frações (34 a 37) reunidas após eluição da coluna Octyl Sepharose. Foram aplicados 5 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata. As massas moleculares das proteínas da linha 4 estão indicadas por seta à direita do gel.

TABELA 5.14 - PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM COLUNA OCTYL SEPHAROSE.

Fração	Volume (mL)	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator Purificação
1.Sobrenadante de cultura	10	16,3	0,97	16,8	100	-
2.Extrato bruto	2	53	1,466	36	65	2
3.Tratamento com CHAPS	2	30,74	1,310	23,46	37,7	1,4
4.Octyl Sepharose	3	11,5	0,033	351	21	21

A enzima também adsorveu fortemente na coluna Phenyl Sepharose Fast Flow, eluindo apenas em presença de CHAPS (Figura 5.11). Obteve-se valores razoáveis de purificação e atividade específica (70 e 1442 U/mg) (Tabela 5.15). A eletroforese SDS-PAGE mostrou a presença de uma banda intensa de 32 kDa e duas outras bandas de maior massa molar (50 e 60 kDa) (Figura 5.12).

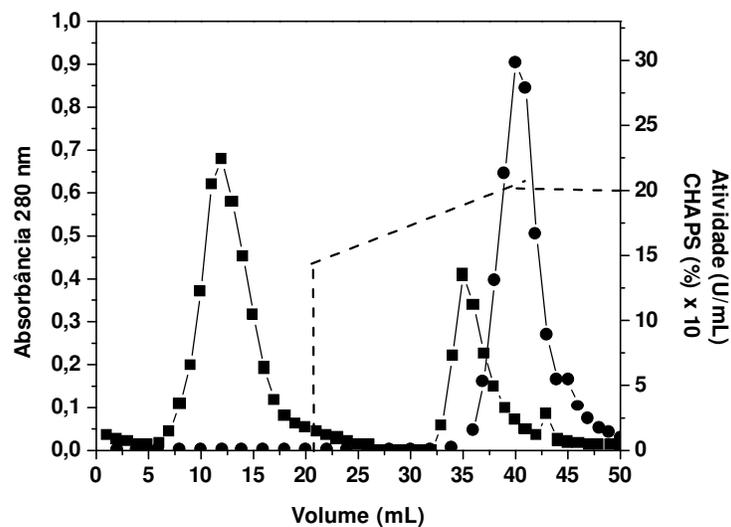


Figura 5.11. Perfil de eluição do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 em coluna Phenyl Sepharose FF. Atividade lipolítica (●), Absorbância a 280 nm (■), Gradiente de CHAPS (traços). Condições: Eluição com gradiente - 1) tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,0; 2) tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,0, com 2 % de CHAPS. Fluxo de 0,5 mL/min, injeção de 1 mL; coleta de frações de 1 mL.

TABELA 5.15 - PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM COLUNA PHENYL SEPHAROSE FF

Fração	Volume (mL)	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator Purificação
1.Sobrenadante de cultura	5	20	0,97	20,6	100	-
2.Extrato bruto	1	76	2	37,4	76	1,87
3.Tratamento com CHAPS	1	43	1,5	27,35	43	1,32
4.Phenyl Sepharose	3	6	0,00416	1442	18	70

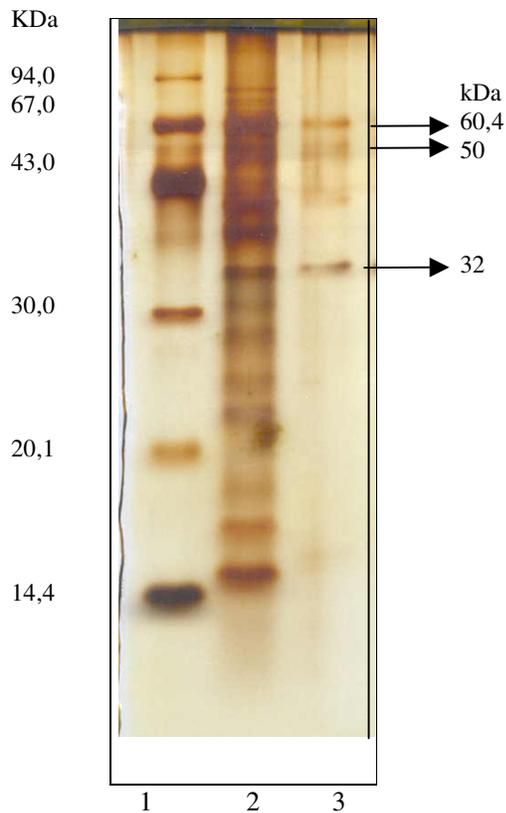


Figura 5.12. Eletroforese SDS-PAGE após análise do extrato bruto por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl Sepharose FF. Linha 1: marcadores de massa molar, linha 2: extrato bruto, linha 3: frações reunidas após eluição pela coluna Fenil Sepharose. Foram aplicados 3 μg de proteína. Revelação por nitrato de prata. As massas das proteínas da linha 3 estão indicadas pelas setas à direita do gel.

O extrato bruto tratado com CHAPS e as frações ativas eluídas da Octyl Sepharose CL4B foram analisados por cromatografia de gel permeação Sephadex G100. Para a eluição utilizou-se tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0 contendo 0,15 mol/L de NaCl. O volume morto da coluna correspondia a 20,8 mL, como determinado pela aplicação de Blue Dextran.

Em todas as injeções as frações ativas foram eluídas nos volumes de 13 a 18 mL, ou seja, no volume morto da coluna, indicando a reagregação da enzima. Este resultado pode ser consequência da diluição do detergente durante a corrida e reagregação das enzimas. Não houve alteração do fator de purificação, o que foi confirmado por eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas da Sephadex G-100 (Figura 5.13).

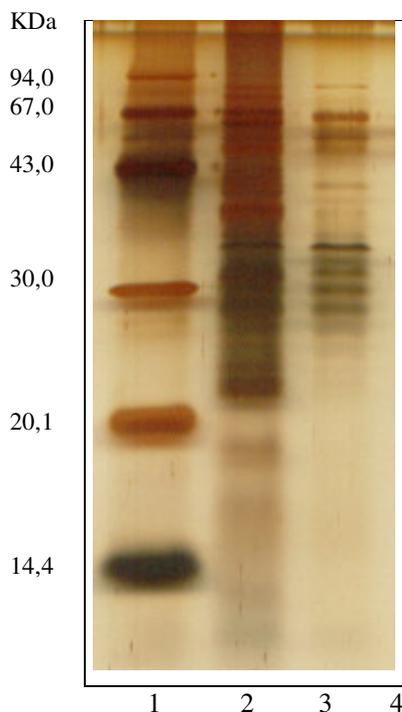


Figura 5.13. Eletroforese SDS-PAGE da amostra eluída da coluna de gel permeação Sephadex G-100. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: extrato bruto tratado com CHAPS 1%; linha 3: frações eluídas da Octyl Sepharose CL4B e aplicadas na Sephadex . Foram aplicados 5 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata. As massas moleculares das proteínas presentes na linha 4 estão indicadas pela seta à direita do gel.

A partir dos resultados relatados pode-se concluir que a estratégia de purificação utilizando CHAPS para tratamento do extrato bruto e para eluição da enzima nas colunas de interação hidrofóbica proporcionou um grau razoável de purificação, especialmente com a coluna Phenyl Sepharose FF, com a qual obteve-se um fator de purificação de 70. Ainda que a enzima não tenha sido purificada à homogeneidade, o grau de purificação obtido foi bastante significativo considerando que a estratégia incluiu um único passo cromatográfico.

5.7.2. Purificação com tratamento prévio com isopropanol

Como descrito anteriormente (seção 5.6.2.2b), o tratamento do extrato bruto com isopropanol resultou na clarificação do extrato bruto, além de ter

exercido um efeito positivo sobre a atividade da enzima como observado no estudo de estabilidade a solventes orgânicos (seção 5.5.4). Além disso, o isopropanol tem sido citado na literatura por seu efeito de romper agregados de lipases (Sugihara et al., 1992). Assim, uma segunda estratégia de purificação da lipase de *B. megaterium* foi proposta, utilizando isopropanol para tratamento do extrato bruto e para eluição da coluna de interação hidrofóbica.

Após o cultivo, o sobrenadante de cultura foi centrifugado e precipitado com sulfato de amônio a 80 %. Após nova centrifugação, ressuspensão em tampão e diálise, o extrato bruto foi clarificado por adição de 30 % (v/v) de isopropanol. A mistura foi centrifugada a 5.000 g por 15 min e o sobrenadante foi aplicado em coluna de interação hidrofóbica Octyl Sepharose CL 4B. A enzima foi eluída com gradiente de tampão Tris-HCl 0,02 mol/L pH 7,5 contendo 60 % (v/v) de isopropanol (Figura 5.14). Obteve-se fator de purificação de 43, atividade específica de 862 U/mg e recuperação de atividade de 40 % (Tabela 5.16). A eletroforese SDS-PAGE indicou a presença de uma banda de 31 kDa e duas outras de maior massa molar, 52 e 63 kDa (Figura 5.15A). A mesma eletroforese foi utilizada para revelação de atividade utilizando MUF-butirato como substrato. Apenas a banda de 31 kDa apresentou atividade enzimática (Figura 5.15B). Não foi observada atividade utilizando-se MUF-palmitato e α -naftil acetato como substratos. O MUF-palmitato não solubilizou completamente, formando uma solução coloidal, o que pode ter impedido a ação da enzima.

É interessante ressaltar, que a mesma coluna, Octyl Sepharose CL4B, foi utilizada para purificação do extrato bruto tratado com CHAPS, proporcionando um fator de purificação menor (21) do que o verificado com o extrato tratado com isopropanol (43). Este fato indica que a purificação obtida deve-se principalmente ao efeito do isopropanol sobre a enzima.

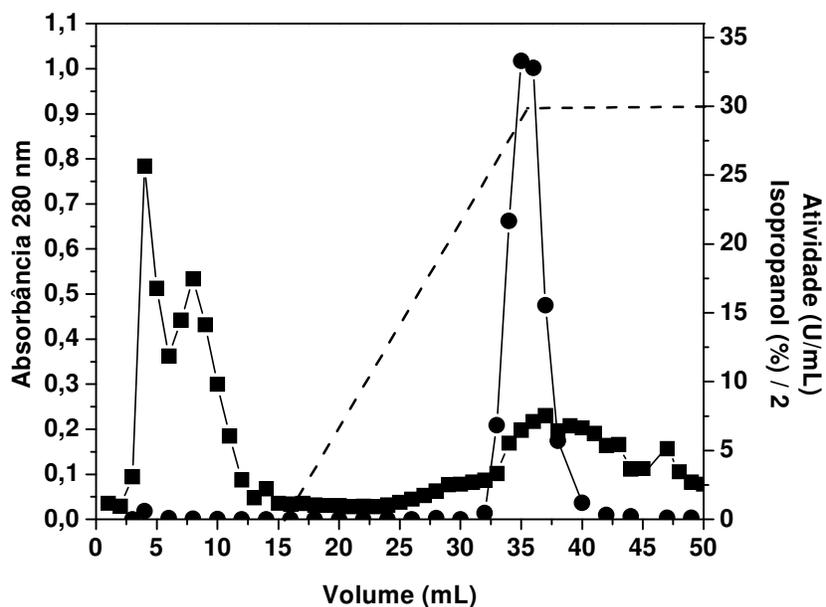


Figura 5.14. Perfil de eluição do extrato bruto de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 em Octyl Sepharose CL-4B. Atividade lipolítica (●), Absorbância a 280 nm (■), Gradiente de Isopropanol (traços). Condições: Eluição com gradiente - 1) tampão Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,5; 2) tampão Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,5, com 60 % de isopropanol; fluxo de 0,5 mL/min; injeção de 1 mL; coleta de frações de 1 mL.

TABELA 5.16 - PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM COLUNA OCTYL SEPHAROSE E ELUIÇÃO COM ISOPROPANOL.

Fração	Volume (mL)	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação
1.Sobrenadante de cultura	5	20	0,97	20,6	100	-
2.Extrato bruto	1	76	2	37,4	76	1,87
3.Tratamento com isopropanol	1	45,5	0,827	55	45,5	1,32
4.Octyl Sepharose	4	10	0,0116	862	40	43

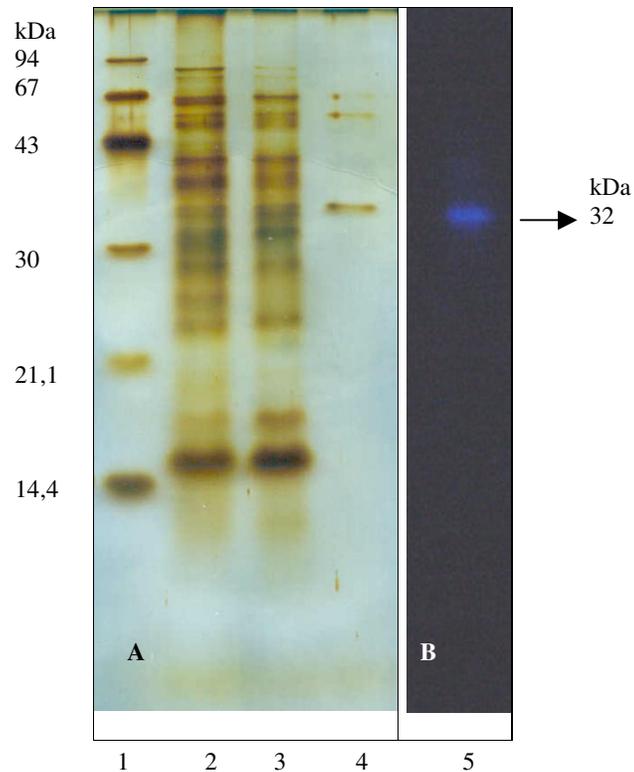


Figura 5.15. A) Eletroforese SDS-PAGE após análise do extrato bruto (tratado com isopropanol) por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Octyl Sepharose CL-4B. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: extrato bruto; linha 3: extrato bruto tratado com isopropanol 30 %, linha 4: frações eluídas da Octyl Sepharose CL4B. Foram aplicadas 3 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata. B) Zimograma utilizando MUF-Butirato como substrato.

5.8. PROTOCOLO FINAL DE PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium*

Após os ensaios preliminares de purificação pode-se definir o protocolo padrão para purificação da enzima de *B. megaterium*. A precipitação com sulfato de amônio a 80 % foi definida como primeiro passo de purificação devido à facilidade, baixo custo e eficiência na recuperação da enzima. Em seguida, adotou-se a clarificação por tratamento com 30 % de isopropanol, pelo maior recuperação de atividade em relação aos resultados verificados com CHAPS, não provocar inibição da atividade enzimática e pela eficiência no rompimento dos agregados. O extrato tratado com isopropanol foi então aplicado em coluna de

interação hidrofóbica Octyl Sepharose CL4B, cuja matriz resiste à eluição com isopropanol.

Baseando-se no protocolo padrão, um volume maior de enzima foi purificado e utilizado nos ensaios de caracterização enzimática.

5.9. ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA AMINO-TERMINAL DA LIPASE DE *Bacillus megaterium*

O extrato bruto de *B. megaterium* foi enviado para o *Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse*, LEIPL, Marselha – França, para o sequenciamento N-terminal da lipase.

O extrato bruto foi purificado seguindo o protocolo de purificação desenvolvido neste trabalho, incluindo o tratamento com isopropanol 30 %, aplicação em coluna Octyl Sepharose e eluição com isopropanol 60 %. A atividade foi determinada usando tributirina e tricaprilina como substratos utilizando o método titulométrico do pH-Stat.

O perfil de eluição da coluna Octyl Sepharose confirmou os resultados anteriormente relatados. A enzima adsorveu fortemente à coluna e eluiu em um único pico de atividade quando o gradiente alcançou 60 % de isopropanol. O fator de purificação observado foi de 28,6 (Tabela 5.17). As frações eluídas foram concentradas, analisadas por eletroforese SDS-PAGE e coradas com Comassie Blue (Figura 5.16). Foram observadas bandas com massas moleculares de 34 e 56 kDa, sendo que inesperadamente foi observada uma banda de 24 kDa que não estava presente nos ensaios anteriores realizados com o mesmo protocolo de purificação (Figura 5.15). Esta alteração pode ter ocorrido devido aos diferentes tamanhos de coluna e volume de amostra que foram empregados anteriormente (coluna de 10 x 1 cm e 1 mL de amostra) em relação aos utilizados no laboratório francês (20 x 1 cm, 5 mL de amostra).

TABELA 5.17 – RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 PARA DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA AMINO-TERMINAL

Fração	Volume	Atividade* U/mL	Proteínas mg/mL	Atividade U/mg	Recuperação (%)	Fator de Purificação
Extrato bruto	5	83	0,475	174,7	-	-
Octyl Sepharose	1	180	0,036	5000	-	28,7
Superdex G 200	5	4	0,0143	279	11,11	1,6

*Atividade determinada pelo método do pH-Stat com tributirina

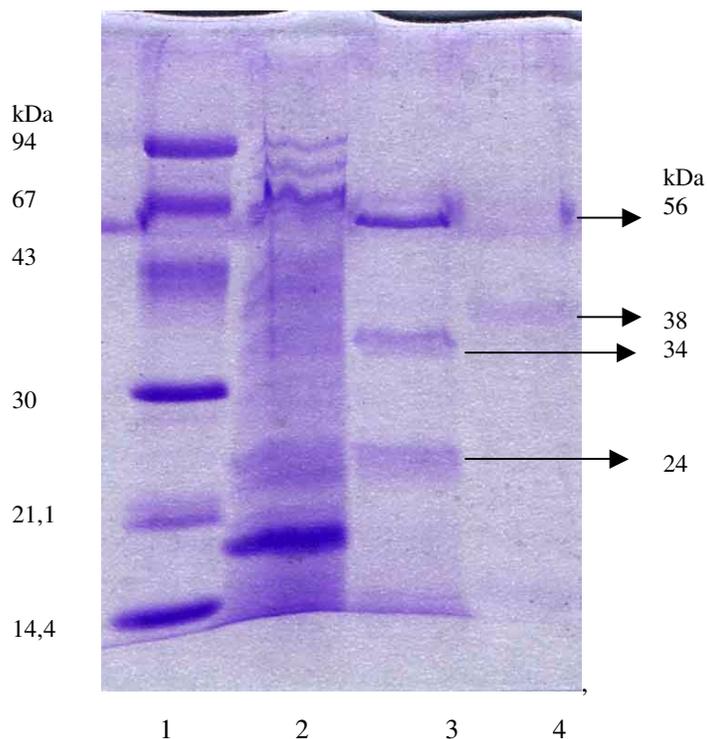


Figura 5.16. Eletroforese SDS-PAGE. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: extrato bruto; linha 3: frações eluídas da Octyl Sepharose; linha 4: frações eluídas da Superdex G200. Revelação por Coomassie Blue. As massas moleculares das proteínas presentes nas linhas 3 e 4 são indicadas pelas setas à direita do gel.

Várias purificações foram realizadas e as frações com alta atividade eluídas da Octyl Sepharose foram concentradas. Um volume de 1 mL destas frações foi injetado em uma coluna de gel permeação Superdex G-200 (de alta resolução) em uma tentativa de separar as três proteínas presentes nas frações da Octyl Sepharose.

O perfil de eluição da coluna de gel permeação Superdex G-200 está apresentado na Figura 5.17. Pode-se observar que a enzima eluiu no volume morto, assim como visto nos ensaios com a coluna de Sephadex G-100, na Figura 5.13. A recuperação de atividade neste ensaio foi de 11,11%, como pode ser visto na Tabela 5.17, o que pode ser devido à reagregação da enzima ou pela precipitação da enzima no interior da coluna pela remoção do isopropanol. O agregado de alta massa molar eluído da coluna Superdex G-200 também foi analisado por eletroforese SDS-PAGE (Figura 5.16). Neste caso observou-se uma banda majoritária com massa molar de 37 kDa e uma banda tênue de 56 kDa. Aqui observou-se um aumento da massa molar da lipase anteriormente eluída da coluna Octyl Superose (34 para 37).

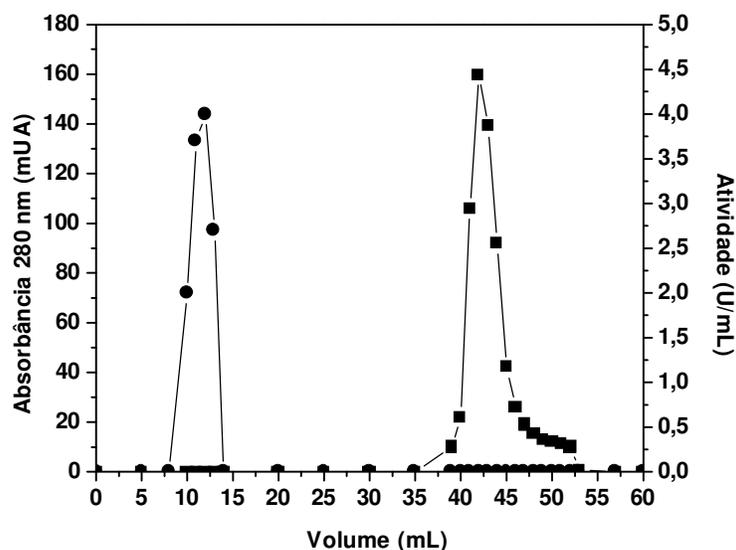


Figura 5.17. Perfil de eluição das frações da Octyl Sepharose em coluna Superdex G200. Eluição com tampão Tris-HCl 0,01 mol/L pH 7,5 com NaCl 0,15 mol/L. Atividade lipolítica (●), Absorbância a 280 nm (■).

Os resultados obtidos para determinação da massa molar da lipase de *B. megaterium* apresentaram três valores diferentes: o primeiro, realizado com *blotting* para determinação da atividade lipolítica com MUF-Butirato (Figura

5.15) 32 kDa, depois, 34 kDa, para a fração eluída da coluna Octyl Sepharose (Figura 5.16), e finalmente, após a filtração gel em Superdex G-200, a enzima apresentou um massa molar de 38 kDa. Estas diferenças são pouco significativas considerando a metodologia empregada (eletroforese SDS-PAGE). Entretanto, a diferença entre as bandas de 34 e 38 kDa é curiosa, uma vez que as proteínas foram aplicadas no mesmo gel e em linhas paralelas, não havendo um motivo evidente para a variação da massa molar. Assumiu-se o valor de 34 kDa como a massa molar média da lipase de *B. megaterium*.

Para verificar a presença de lipídeos, o extrato bruto e as frações eluídas da Octyl Sepharose e da Superdex G-200 foram analisadas por cromatografia de camada delgada. Verificou-se a presença de triacilgliceróis e ácidos graxos em todas as amostras testadas, sugerindo que as dificuldades encontradas na purificação da enzima (dificuldades de centrifugação, agregação e determinação de massa molar) poderiam ser devido à presença destes materiais. A delipidação do sobrenadante de cultura por extração com solventes orgânicos, portanto, deve fazer parte de outros estudos de purificação da lipase desta cepa, a fim de se evitar os problemas de turvação do meio e agregação descritos neste trabalho.

As frações eluídas da coluna Octyl Sepharose foram utilizadas para determinação da seqüência N-Terminal da enzima. Neste caso, analisou-se as bandas de 34 e 56 kDa, pois havia a suspeita de que a banda de 56 kDa poderia ser uma proteína precursora da lipase, ou mesmo uma segunda lipase que eventualmente não teria atividade contra o MUF-butirato (Figura 5.16). Assim, as amostras foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE e depois de coradas com azul Ponceau, foram transferidas para uma membrana de acetato de celulose, recortadas e analisadas quanto à seqüência amino-terminal (Tabela 5.18).

TABELA 5.18. SEQÜÊNCIA N-TERMINAL DAS PROTEÍNAS ELUÍDAS DA COLUNA OCTYL SEPHAROSE.

Peso molecular (kDa)	Seqüência N-terminal
34	APADGYAATRYPIILVHGLTGTDKYAAVL
56	TPGKTPFGFPADILLYKQ

*A=alanina, P=prolina, D=aspartato, G=glicina, Y=tirosina, T=treonina, R=arginina, I=isoleucina, L=leucina, V=valina, H=histidina, K=lisina, Q=glutamina.

A seqüência N-terminal da proteína de 34 kDa foi analisada por comparação com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI através do programa Blastp 2.2.9 (para seqüências curtas) (Atschul et al., 1997). Os resultados da comparação estão apresentados em Anexo. Observou-se uma similaridade de 93% com uma seqüência interna de uma colesterol esterase estável em solvente orgânico de *Burkholderia cepacia* (acesso Genbank NCBI BAD13379) e de 92 %, 89 % e 89 % com seqüências internas de proteínas precursoras de triacilglicerol lipase de *Pseudomonas* sp KWI-56 (acesso Genbank P25275), *Pseudomonas luteola* (acesso Genbank AAC05510) e *Pseudomonas cepacia* (acesso Genbank A39133), respectivamente. A seqüência também apresentou 92 % e 80 % de similaridade com seqüências internas das lipases de *Pseudomonas cepacia* (acesso Genbank gi/1942114/pdb/2LIP) e *Chromobacterium viscosum* (acesso Genbank gi/20985220/pdb/1CVL), além de 95 % de similaridade com o N-terminal da lipase de *Pseudomonas cepacia* depositada pela indústria Amano (acesso Genbank AAB32002.1).

A comparação da seqüência N-terminal da proteína de 34 kDa especificamente com proteínas de *Bacillus* depositadas no Genbank resultou nos seguintes dados de similaridade: 55 % com uma provável lipase de *B. thuringiensis serovar konkunian* (acesso Genbank AAT59991.1), 55 % com a lipase de *B. anthracis* (acesso Genbank YP019249.2, AAT31724.21, AAT54743.1, NP844969), e 72 % com a lipase de *B. cereus* (ZP00239430.1, EAL12983.1).

Ruiz et al. (2002) sequenciaram uma enzima lipolítica de *B. megaterium* (cepa ATCC9885) com 19 kDa (acesso Genbank CAD23620.1). A seqüência de aminoácidos desta enzima apresentou 98 % de similaridade com a lipase de *B.*

subtilis lipB e 72 % com as lipases de *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus*, de onde se concluiu que se tratava de uma enzima pertencente a classe I.4, como descrito por Arpigny e Jaeger (1999). A seqüência amino-terminal da lipase de *B. megaterium* CCOC-P2637 apresentou 60 % de similaridade com a enzima depositada por Ruiz et al. (2002).

Jung et al. (2003) isolaram uma lipase de *B. megaterium* (cepa 20-1) de 38 kDa, que apresentava uma seqüência de aminoácidos similar as esterases/lipases de *Alycyclobacillus acidocaldarius* (55,8 %), *Archaeoglobulus fulgidus* (37,6 %), *Bacillus halodurans* (33,8 %), *Pseudomonas* sp B11-1 (43 %) e *Burkholderia cepacia* (39 %). A lipase de *B. megaterium* CCOC-P2637 não apresentou similaridade com a seqüência da lipase depositada por Jung et al. (2003) e nem mesmo com nenhuma proteína de *Alycyclobacillus*, *Archaeoglobulus* ou *B. halodurans*.

A comparação no banco de dados do NCBI não resultou na identificação de nenhuma proteína com similaridade de seqüência com a proteína de 56 kDa de *B. megaterium*.

Os dados apresentados indicam que as duas proteínas de *B. megaterium* seqüenciadas (34 e 56 kDa) são distintas. Não foram encontrados indícios de que a proteína de 56 kDa seja uma lipase ou uma proteína precursora da lipase de 34 kDa, podendo se tratar simplesmente de proteína contaminante. A seqüência amino-terminal da lipase de 34 kDa apresentou pequena ou nenhuma similaridade com as lipases de *B. megaterium* de outras estirpes (ATCC9885 – Ruiz et al., 2002; 20-1 – Jung et al., 2003), o que sugere que esta lipase seja diferente das enzimas anteriormente relatadas.

Além disso, a região amino-terminal da lipase de 34 kDa apresentou uma inesperada similaridade com proteínas do gênero *Pseudomonas*. A pureza da cultura de *Bacillus megaterium* foi checada e não existe nenhum indício de contaminação por *Pseudomonas*. A alta similaridade entre as proteínas, entretanto, é curiosa, uma vez que os gêneros são bastante diferentes, inclusive com relação à coloração de Gram: o gênero *Pseudomonas* é gram negativo

enquanto o gênero *Bacillus* é gram positivo. A similaridade da lipase de *B. megaterium* com proteínas de *Pseudomonas* deve ser explorada no prosseguimento dos estudos.

5.10. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA LIPASE DE *Bacillus megaterium*

Após a purificação, a lipase de *B. megaterium* foi estudada quanto às suas características cinéticas e de estabilidade. Foram determinados os efeitos do pH e da temperatura na atividade, a estabilidade frente ao pH e à temperatura, o efeito da concentração do substrato e a atividade frente a diferentes substratos, que neste caso passamos a chamar de especificidade da enzima. Com exceção deste último item, a atividade foi determinada pelo método do *pNPP*.

5.10.1. Efeito da concentração de proteína na atividade

A determinação do efeito da concentração de proteínas na dosagem da atividade lipolítica foi realizada com concentrações entre 0,0175 e 0,035 mg/mL (Figura 5.18). É interessante notar que a relação entre a concentração de proteínas e a atividade não apresentou um perfil exatamente linear. Pode-se observar duas regiões: a primeira até 0,017 mg/mL de proteína e a segunda acima desta concentração, de modo que pode-se traçar duas retas com coeficientes angulares distintos. Maiores detalhes serão discutidos conjuntamente com os dados cinéticos na seção 6.1. Para a realização dos experimentos de cinética, utilizou-se 0,035 mg/mL de proteínas nos ensaios.

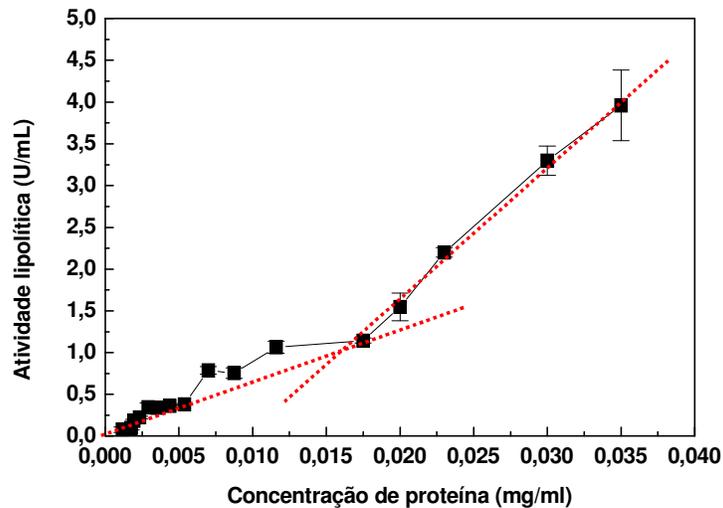


Figura 5.18. Efeito da concentração de proteínas na atividade da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Condições do ensaio: tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, 37 °C, pNPP 0,03 mg/mL. Ensaio realizado em triplicata.

5.10.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade

O efeito do pH na atividade da lipase purificada de *B. megaterium* foi estudado de pH 2,5 a 10,5 (Figura 5.19A). A enzima foi ativa em uma ampla faixa de pH, desde 3,0 a 10,5, sendo que a atividade máxima foi obtida entre pH 6,0 e 9,0. Mesmo em valores extremos de pH também foram verificadas altas atividades. Em pH 3,0 e em pH 10,0, por exemplo, verificou-se 60 % e 70 % da atividade dosada em pH 7,0.

Comparando-se à atividade do extrato bruto, a faixa de pH em que obtêm-se 100 % de atividade é maior com a enzima purificada. Com o extrato bruto verificou-se 100 % de atividade apenas entre pH 6,0 e 7,0 (Figura 5.5A). Em valores ácidos de pH, a enzima purificada e o extrato bruto apresentaram os mesmos resultados de atividade. Entretanto em valores alcalinos de pH foram observadas maiores atividades com a enzima purificada do que com a preparação bruta. Em pH 9,0 e 10,0 a atividade do extrato bruto representou 50 % e 20 % da

atividade determinada a pH 7,0, enquanto a atividade relativa da enzima purificada ficou entre 90 e 70 % nestes mesmos valores de pH.

A estabilidade ao pH foi determinada através da pré-incubação (1 h a 30 °C) da enzima purificada em diferentes tampões, variando-se o pH entre 2,5 e 10,5, medindo-se em seguida a atividade residual pelo método do *p*NPP nas condições padrão (Figura 5.19B). A enzima purificada de *B. megaterium* mostrou-se estável na faixa de pH entre 3 a 10,5, sendo que mesmo após incubação em pH 2,5 observou-se 65 % de atividade residual. Os ensaios de estabilidade ao pH demonstraram que a enzima purificada apresenta estabilidade em uma faixa de pH mais ampla do que a determinada com o extrato bruto (Figura 5.5B), com o qual observou-se 100 % da atividade inicial apenas entre pH 5,0 e 8,0.

Os resultados observados se destacam pelo fato de que, de modo geral, lipases bacterianas são ativas e estáveis em pH acima de 6,0, sendo raramente ativas em valores ácidos como a de *B. megaterium*. Mesmo entre lipases de fungos e leveduras, a faixa mais comum de atividade e estabilidade situa-se no intervalo entre pH 6,0 e 8,0. Embora a atividade em pH ácido seja rara, existem exemplos de lipases estáveis em ampla faixa de pH, como as enzimas das bactérias *B. megaterium* (Ruiz et al., 2002) e *Bacillus* sp BP-6Lip A (Ruiz et al., 2003) estáveis de pH 4,0 a 12,0, *Pseudomonas cepacia* (Sugihara et al., 1992) estável entre pH 3,0 e 11,5, *Staphylococcus epidermidis* (Simons et al., 1998) estável entre pH 2,0 e 10,0, dos fungos *Aspergillus terreus* (Yadav et al., 1998), *Fusarium oxysporum* sp. *vasinfectum* (Rapp, 1995) e *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* (Hiol et al., 1999), estáveis entre pH 4,0 e 10,0 e das leveduras *Candida cylindracea* (Tomizuka et al., 1966) e *Kluyveromyces marxianus* (Deive et al., 2003), estáveis entre pH 2,0 e 8,0.

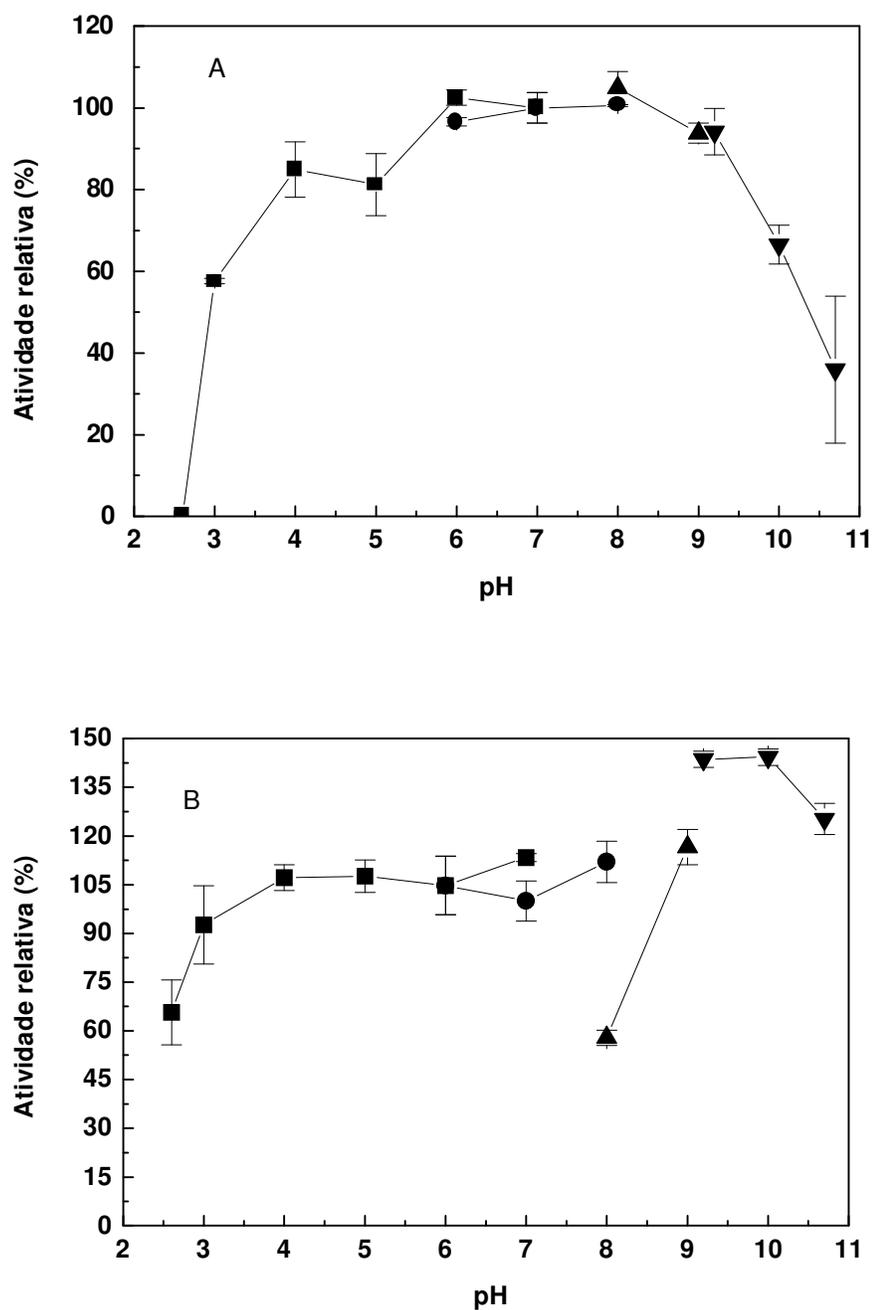


Figura 5.19. Efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Tampões utilizados nos ensaios: citrato fosfato pH 2,6 a 7 (■); fosfato pH 6 a 8 (●); Tris-HCl pH 8 e 9 (▲); carbonato-bicarbonato pH 9,2 a 10,7 (▼), todos 0,02 mol/L Ensaio de atividade: 37 °C, 3,5 µg/mL de proteína. Ensaio de estabilidade: 1 h de incubação, 30 °C. Ensaios realizados em triplicata.

5.10.3. Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade

Para determinar o efeito da temperatura na atividade da lipase de *B. megaterium*, a hidrólise do *p*NPP foi acompanhada em temperaturas entre 37 e 85 °C (Figura 5.20A). Nas condições experimentais utilizadas, a atividade máxima foi obtida nas temperaturas entre 55 e 65 °C. Entretanto, em temperaturas elevadas (75 e 85 °C) ainda foram observadas atividades em torno de 50% da atividade máxima. A energia de ativação (E_a) calculada pelo gráfico de Arrhenius foi de 34,2 kJ/mol (Figura 5.20B).

Com relação à termoestabilidade, a lipase purificada (Tabela 5.19, Figura 5.21) apresentou maior estabilidade a 50 °C do que o extrato bruto (Tabela 5.5), como pode ser verificado pela comparação entre os tempos de meia-vida: 42 min com o extrato bruto e 86 min com a enzima purificada. A 60 e 70 °C, entretanto, o extrato bruto foi mais estável, com tempos de meia-vida de 23 e 4 min, contra 7,7 e 1 min, respectivamente. Nas temperaturas entre 50 e 70 °C, a cinética de decaimento da atividade foi de primeira ordem, sendo a energia de desativação calculada pelo gráfico de Arrhenius de 198,5 kJ/mol. O decaimento da atividade a 40 °C não é uma reação de primeira ordem e exige modelos mais complexos para descrever a desativação.

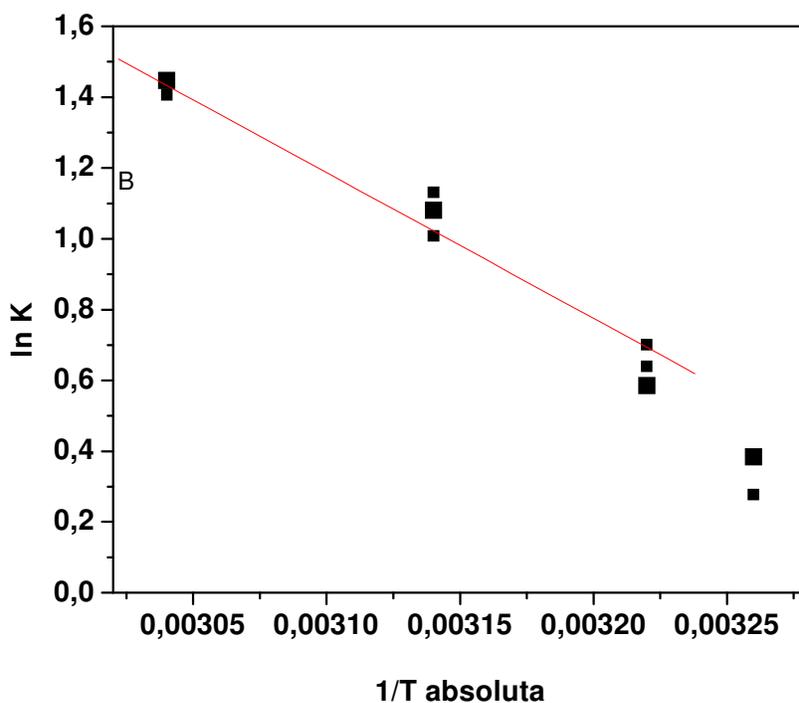
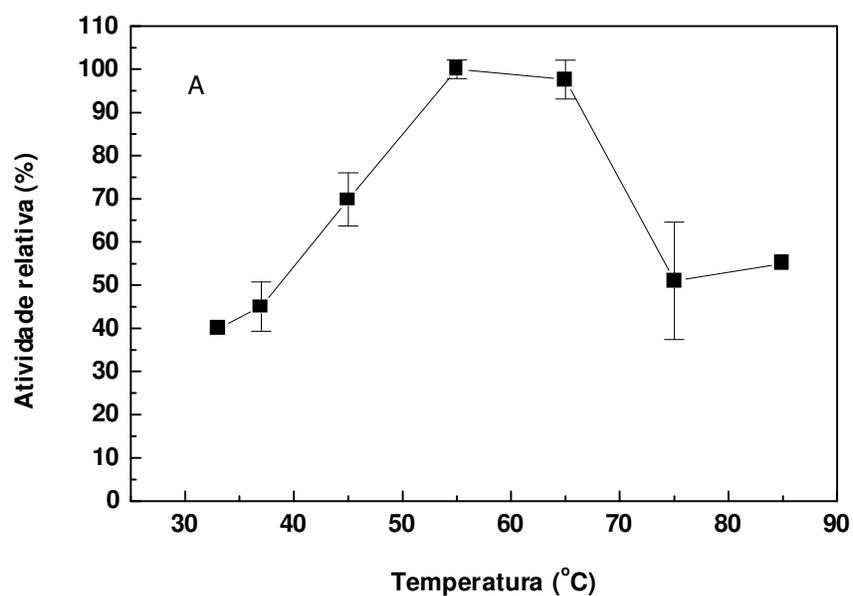


Figura 5.20. A) Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Condições do ensaio: 37 - 85°C, tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0, concentração de proteína: 3,5 µg/mL, pNPP 0,03 mg/mL. B) Gráfico de Arrhenius: para a construção do gráfico foram utilizados os dados apresentados na figura A. Ensaio realizado em triplicata.

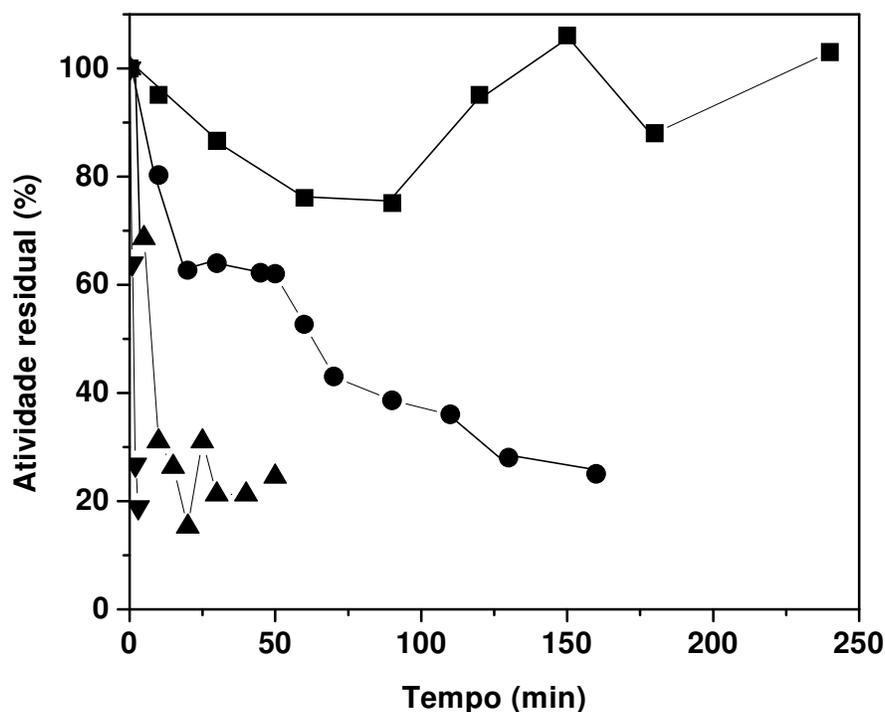


Figura 5.21. Estabilidade à temperatura da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Atividade residual após incubação a 40 (■), 50 (●), 60 (▲) e 70 °C (▼), tampão fosfato pH 7,0 0,02 mol/L. Condições de ensaio: 37 °C, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, *p*NPP 0,03 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata.

TABELA 5.19 - TEMPO DE MEIA-VIDA PARA A LIPASE DE *Bacillus megaterium*.

Temperatura (°C)	Meia-vida (min)
50	86,6
60	7,7
70	1,19

5.10.4. Especificidade da lipase: Atividade frente a diferentes substratos

Para determinar o comportamento hidrolítico da lipase purificada de *B. megaterium*, acompanhou-se a atividade enzimática frente a diferentes ésteres de *p*-nitrofenol e diferentes triacilgliceróis (Tabela 5.20).

O mesmo padrão de hidrólise observado com o extrato lipolítico bruto foi observado para a enzima purificada. Dentre os ésteres de *p*-nitrofenol, foram

obtidas atividades crescentes de acordo com o aumento da cadeia acila, sendo a maior atividade detectada com *p*NPP (16 carbonos). Todos os triacilgliceróis testados foram hidrolisados pela enzima de *B. megaterium*, confirmando que a enzima purificada apresenta um comportamento de lipase verdadeira, com maior especificidade para o *p*NPP, dentre os ésteres de *p*-nitrofenol e para a tributirina, dentre os triglicerídeos estudados.

TABELA 5.20. ATIVIDADE DA LIPASE PURIFICADA DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS.

Substratos	Atividade (U/mg)
acetato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPA) (2:0)	24,9 ± 3
butirato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPB) (4:0)	219 ± 4,7
caproato de <i>p</i> -nitrofenilal (<i>p</i> NPC) (6:0)	510 ± 7,3
caprato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPCA) (10:0)	640 ± 20
palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPP) (16:0)	840 ± 30
Tributirina (4:0)	256 ± 3
Tricaprilina (8:0)	128 ± 2
Trioleína (18:1 (Δ^9))	76,8 ± 2

*Condições de ensaio: 50 °C, pH 7,0. Ensaios realizados em triplicata.

5.10.5. Efeito da concentração do substrato

O efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática foi realizado mantendo-se a concentração de enzima e variando-se a concentração de *p*NPP entre 0,3 e 8 mmol/L. Observou-se que a atividade aumenta de acordo com o aumento da concentração do substrato, mas de maneira não linear (Figura 5.22).

Para tentar descrever o comportamento cinético da lipase de *B. megaterium*, os dados foram analisados segundo a equação de Michaelis-Menten ($V_0 = V_{\max} \cdot [S] / K_M + [S]$). Esta equação é representada graficamente plotando-se V_0 (atividade inicial) contra S (concentração de substrato) e descreve uma hipérbole retangular. O melhor ajuste de uma hipérbole retangular, obtido por regressão não linear, está mostrado na Figura 5.22. A curva, entretanto, não se

ajustou bem aos dados. O gráfico de Hanes-Woolf torna este fato mais evidente (Figura 5.23). A hipérbole retangular do gráfico de V_o contra S deveria ser linearizada pelo gráfico de Hanes-Woolf, o que não aconteceu. Como desvios na reta do gráfico de Hanes-Woolf significam desvios do comportamento michaeliano, pode-se concluir que os dados cinéticos da lipase de *B. megaterium* não se ajustam à equação de Michaelis-Menten, não sendo possível o cálculo das constantes cinéticas K_m e V_{max} por este método.

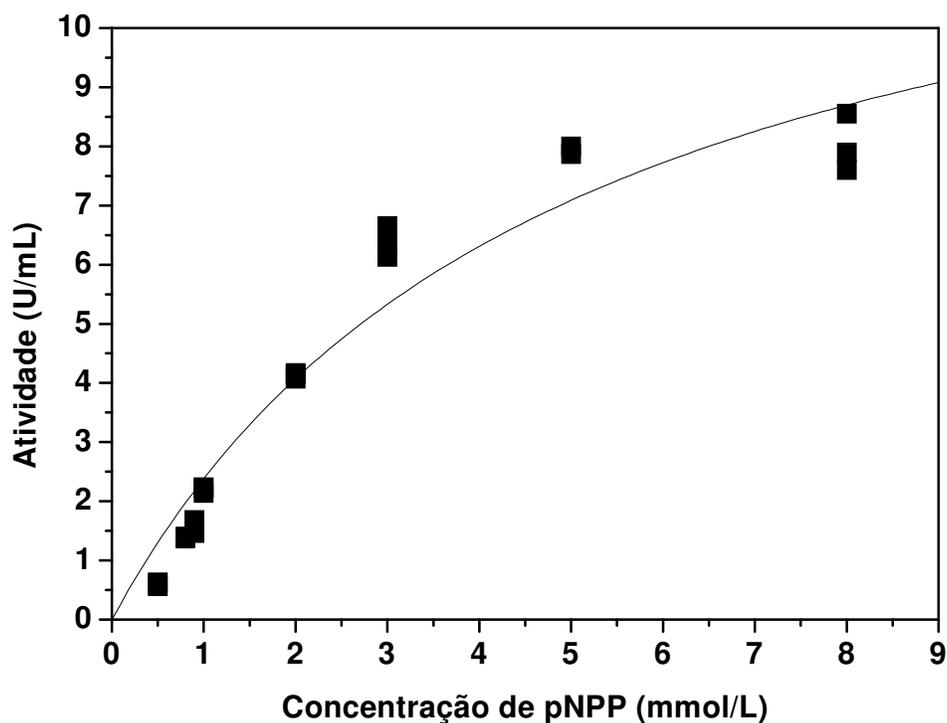


Figura 5.22. Efeito da concentração do substrato na atividade da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637. Condições de ensaio: 50 °C, concentração de proteínas: 3,5 µg/mL, concentração de pNPP: 0,3-8 mmol/L, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0. Ensaios realizados em triplicata.

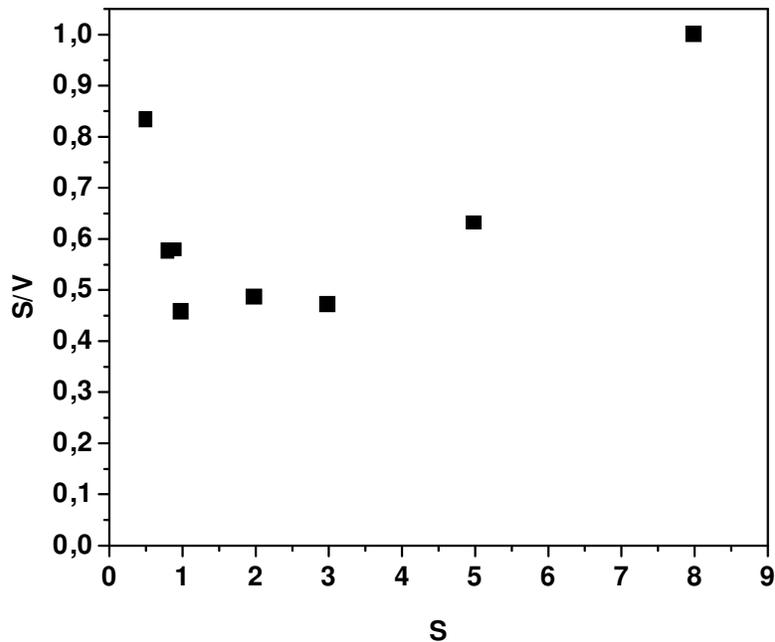


Figura 5.23. Efeito da concentração do substrato na atividade da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 – Análise dos dados da Figura 5.25 pelo Gráfico de Hanes-Woolf.

O formato da curva no gráfico de Hanes-Hoolf, com um desvio para cima no lugar de uma reta, mostra que os dados experimentais descrevem uma sigmóide e não uma hipérbole retangular. Uma equação que foi proposta para descrever uma sigmóide é a equação de Hill (Cornish-Bowden, 1995). A equação de Hill (Equação 1) foi ajustada aos dados cinéticos obtidos com a lipase de *B. megaterium* por regressão não linear e a representação gráfica está apresentada na Figura 5.24. O bom ajuste da equação de Hill sugere que a enzima mostra cooperatividade. Os dados de V_{\max} e $K_{0,5}$ calculados foram 14,0 U/mL e 4,87 mM, respectivamente.

Equação de Hill (1)

$$v = \frac{V_{\max} [S]^a}{K_{0,5}^a + [S]^a}$$

* V_{\max} = velocidade máxima; [S] = concentração de substrato; $K_{0,5}$ =concentração de substrato que corresponde à metade da velocidade máxima; a = coeficiente de Hill

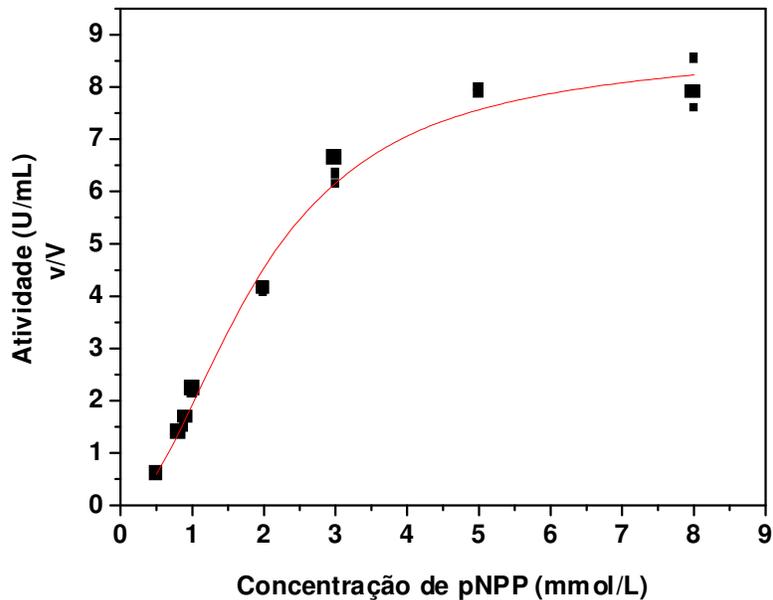


Figura 5.24. Efeito da concentração do substrato na atividade da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 – Análise dos dados da Figura 5.25 pelo Gráfico de Hill.

6. DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS

6.1. Propriedades cinéticas da lipase de *Bacillus megaterium*

Tanto os resultados observados na relação concentração de proteína contra atividade, quanto os observados na relação concentração de substrato contra atividade, podem estar relacionados a aspectos comuns, como será discutido a seguir.

A lipase de *B. megaterium* demonstrou uma relação incomum entre atividade e concentração de proteína. Embora ocorra aumento da atividade de acordo com o aumento da concentração de proteína, os dados não apresentaram um perfil linear, como seria esperado para enzimas na forma monomérica. Na verdade, os dados sugerem a existência de pelo menos duas faixas lineares

distintas, a primeira entre 0,0011 e 0,0175 mg/mL e a segunda entre 0,0175 e 0,035 mg/mL (Figura 5.18).

Por outro lado, estudando o efeito da concentração do substrato na atividade da lipase de *B. megaterium*, verificou-se que a enzima não apresenta um comportamento michaeliano (Figuras 5.22 e 5.23), mas indícios de comportamento cooperativo (Figura 5.24).

Os resultados observados, tanto para o efeito da concentração de proteínas quanto para o efeito da concentração do substrato na atividade da lipase de *B. megaterium*, podem estar relacionados a alguns fatores como: as características estruturais das lipases, o mecanismo cinético destas enzimas, as propriedades do substrato (*p*NPP) em meio aquoso e a formação de agregados enzimáticos.

O primeiro fator a considerar é a estrutura das lipases. Estruturalmente as lipases possuem porções hidrofóbicas, sendo que o sítio catalítico está recoberto por uma *lid* ou tampa hidrofóbica. Duas formas conformacionais foram descritas para as lipases e parecem estar em equilíbrio: uma fechada e inativa (com a *lid* recobrindo o sítio ativo), e outra aberta e ativa. A partir dos dados estruturais destas enzimas, foi proposto um mecanismo cinético que é o segundo fator importante. Presume-se que em presença de superfícies hidrofóbicas – lipídeos, suportes hidrofóbicos e proteínas hidrofóbicas – haveria uma interação da *lid* com estas superfícies, promovendo alteração conformacional e tornando o sítio catalítico exposto e acessível ao substrato. Este mecanismo constitui o fenômeno da “ativação interfacial”. A abertura da *lid* expõe não só os resíduos responsáveis pela catálise, mas também a região ao redor do sítio, que igualmente possui características hidrofóbicas (Jaeger e Reetz, 1998; Schrag e Cygler, 1997).

O terceiro fator se refere à característica dos substratos de lipases. Os substratos para lipases são geralmente insolúveis em meio aquoso, como é caso do *p*NPP, e formam interfaces lipídeo-água. A reação enzimática ocorre na interface e tem um caráter bidimensional.

O quarto fator a considerar é a formação de agregados enzimáticos, que ocorrem basicamente como consequência do forte caráter hidrofóbico da estrutura proteica das lipases. Há que se considerar, entretanto, que diferentes tipos de agregados podem estar presentes na lipase bruta ou na lipase purificada. No extrato bruto, os agregados podem ser compostos de complexos entre material hidrofóbico presente no meio de cultura (lipídeos, lipopolissacarídeos, outras proteínas hidrofóbicas) e lipases. Após a purificação, entretanto, a agregação pode ocorrer principalmente entre porções hidrofóbicas das moléculas de lipase, ocasionando a formação de dímeros, trímeros, tetrâmeros ou até mesmo complexos maiores. Entretanto, verificou-se neste trabalho que triglicerídeos e ácidos graxos estão presentes mesmo na lipase purificada. Uma tendência à formação de agregados pela lipase de *B. megaterium* foi verificada tanto com o extrato bruto quanto com após a purificação (seção 5.6.1.)

O álcool isopropílico foi utilizado tanto no tratamento do extrato bruto quanto durante a purificação da lipase de *B. megaterium* e exerceu um efeito positivo sobre a atividade. O efeito do isopropanol sobre a enzima ainda não está esclarecido, podendo ser devido à promoção de uma conformação favorável ou ao rompimento dos agregados. Se o efeito do isopropanol for sobre a desagregação da enzima, é possível supor que a lipase purificada de *B. megaterium*, cuja solução contém isopropanol, estaria completamente ou parcialmente desagregada e isto poderia influenciar a cinética, como será discutido a seguir.

Os resultados observados para o efeito da concentração de proteínas na atividade da lipase de *B. megaterium* não correspondem ao esperado para uma enzima na forma monomérica. Entretanto, a presença de agregados também não explica o perfil observado. A agregação resultaria em diminuição da atividade de acordo com o aumento da concentração de proteínas, devido à dificuldade de difusão do substrato para dentro do agregado. Ao contrário, os resultados mostram que, nas maiores concentrações de proteína (acima de 0,0175 mg/mL), a atividade aumentou mais rapidamente do que nas concentrações menores. A

explicação para o perfil observado pode estar relacionada ao efeito do isopropanol sobre a enzima.

A desagregação parcial da enzima pela presença de isopropanol poderia resultar na presença de estruturas diméricas. Ainda que a enzima estivesse na forma monomérica pela ação do isopropanol, durante o ensaio de atividade, poderia ocorrer reagregação pela redução na porcentagem de álcool e pelo aumento da concentração de proteínas.

Dadas as propriedades das lipases – presença de regiões hidrofóbicas, sítio ativo recoberto por uma tampa hidrofóbica, catálise promovida por ativação interfacial – e assumindo-se que a lipase purificada de *B. megaterium* esteja na forma dimérica, pode-se supor que esteja ocorrendo uma ativação seguindo o mecanismo proposto por Fernández-Lorente et al. (2003). Os autores postularam que a forma aberta de uma lipase, expondo suas regiões hidrofóbicas, poderia servir de superfície de interação para a ativação interfacial de uma segunda molécula de enzima. Desta forma, o equilíbrio entre as formas aberta e fechada seria deslocado em favor da forma aberta e ativa, devido à presença de uma estrutura bimolecular formada por duas moléculas de lipase ligadas. Esta hipótese tem sido apoiada pelo fato de isoformas da lipase de *C. rugosa* terem sido cristalizadas como uma estrutura bimolecular, com suas regiões hidrofóbicas voltadas entre si e bastante próximas (Pernas et al., 2001 e 2002). Com a abertura da *lid* que cobre o sítio ativo, aumentaria o contato da enzima com o substrato e conseqüentemente aumentaria a atividade. Quanto maior a concentração de proteínas, um número maior de dímeros seriam formados, o que explicaria o efeito apresentado na Figura 5.18.

A formação de dímeros foi verificada para as lipases de *Humicola lanuginosa*, *Candida rugosa*, *Mucor miehei* (Palomo et al., 2003) e *Pseudomonas fluorescens* (Fernández-Lorente et al., 2003). Nestes casos, houve diminuição da atividade específica com o aumento da concentração de proteínas. A lipase de *C. rugosa* Lip 3 na forma dimérica apresentou atividade específica superior à forma monomérica (Pernas et al., 2002). Por outro lado, a lipase de *Candida antarctica*,

que não possui a *lid*, não apresentou alteração na atividade específica independente da concentração de proteína empregada (Palomo et al., 2003). Estes fatos sugerem que a região hidrofóbica da *lid* realmente pode ter relação com a formação de agregados e que a agregação influencia na atividade enzimática.

Estudos adicionais são necessários para confirmar o efeito do isopropanol sobre a enzima e caracterizar os possíveis agregados enzimáticos. O isolamento de dímeros ou complexos maiores pode ser feito por aplicação em coluna de gel permeação testando-se diferentes porcentagens de um agente hidrofóbico no tampão de eluição. Experimentos realizados com a enzima purificada sem adição de um agente desagregante no tampão resultaram na eluição da enzima logo após o volume morto, na forma de agregado de alta massa molar. A influência do isopropanol sobre a conformação da enzima pode ser avaliada por estudos espectrofotométricos como dicroísmo circular e fluorescência.

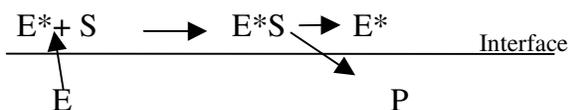
Para explicar o comportamento cinético não michaeliano da lipase de *B. megaterium* devem ser consideradas as características do meio de reação.

Na verdade, a equação de Michaelis-Menten foi proposta para explicar a cinética de enzimas e substratos que são solúveis em água, sendo que a concentração do substrato pode ser expressa em moles por litro. Com substratos insolúveis ou parcialmente solúveis em água a reação enzimática ocorre na interface. Neste caso a concentração efetiva de substrato corresponde ao número de moléculas por unidade de superfície, e esta concentração não pode ser mudada simplesmente por adição de mais lipídeo. Isto significa que uma fração desconhecida de enzima está ligada ao substrato e portanto, V_{\max} e K_M , para lipases, são somente valores aparentes (Verger, 1980).

Um modelo para explicar como lipase e substrato micelizado entram em contato e ocorre a catálise foi sugerido por Verger et al. em 1973 (Esquema 1). O modelo consiste em dois equilíbrios: o primeiro se refere à interação da enzima (E) com a interface água-micela tornando-se ativa (E*); o segundo consiste na ligação da enzima ativada (E*) com uma molécula de substrato (S), formando o

complexo E*S. Este modelo é equivalente ao equilíbrio clássico de Michaelis-Menten em duas dimensões. Após a formação do complexo ocorre a catálise, regenerando a enzima na forma ativa e liberando o produto.

Esquema 1 – Mecanismo de catálise de lipases segundo Verger et al. (1973).



A concordância entre a cinética de lipases, a equação de Michaelis-Menten e o modelo proposto por Verger et al. (1973) tem variado de acordo com as condições experimentais adotadas.

As lipases A e B de *Candida rugosa* (Sigma) (Redondo et al., 1995) e a fosfolipase A₂, obtida de veneno de cobra *Naja naja* (Hendrickson et al., 1984) foram ensaiadas utilizando-se *p*NPP inserido em micelas formadas pelo detergente Triton X-100. A cinética foi realizada variando-se conjuntamente a concentração de substrato (*p*NPP) e do detergente (Triton X-100), de modo que a relação molar ($[p\text{NPP}] / [\text{Triton X-100}]$) fosse mantida constante. Nestas condições o número de micelas na solução aumentou gradativamente, enquanto o tamanho micelar foi mantido constante. A cinética apresentou um comportamento michaeliano e conseqüentemente, concordou com o modelo proposto por Verger et al. (1973).

Entretanto, as mesmas enzimas também foram ensaiadas na mesma condição utilizada para a lipase de *B. megaterium*: com concentrações crescentes de substrato, mas com a concentração de detergente mantida constante. Neste caso, não foi verificado comportamento michaeliano para nenhuma das três enzimas. Ao contrário, todos os resultados indicavam cooperatividade, como verificado com a lipase de *B. megaterium*.

Com algumas enzimas que não seguem a cinética de Michaelis-Menten observa-se curvas de atividade inicial contra concentração de substrato com forma de sigmóide no lugar da hipérbole retangular dada pela equação

michaeliana. Este comportamento é resultado de cooperatividade e acontece principalmente para enzimas alostéricas. O comportamento sigmóide reflete interações cooperativas entre múltiplas subunidades, ou seja, mudanças na estrutura de uma subunidade refletem em mudanças estruturais nas subunidades adjacentes, devido a interações não covalentes nas interfaces subunidade-subunidade. Estas interações têm conseqüências sobre a atividade de cada subunidade protéica. Um dos modelos matemáticos para descrever a cooperatividade é a equação de Hill. A equação de Hill foi proposta em 1910 como uma descrição empírica da ligação do oxigênio à hemoglobina (Cornish-Bowden, 1995).

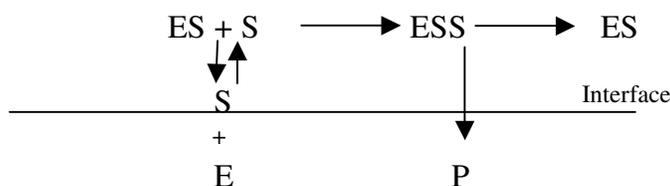
Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar a possível cooperatividade da lipase de *B. megaterium*: a ativação interfacial entre estruturas bimoleculares, como postulado por Fernández-Lorente et al. (2003) ou o mecanismo de dupla ligação ao substrato proposto por Hendrickson e Dennis (1984).

A explicação para o comportamento cooperativo pode ter relação com o mesmo mecanismo proposto para explicar o efeito da concentração de proteínas na atividade: a cooperação se daria pela presença de estruturas bimoleculares (Fernández-Lorente et al., 2003). Se a hipótese de que o isopropanol influencia no estado de agregação da lipase de *B. megaterium* for verdadeira, a redução da concentração do álcool que ocorre durante o ensaio de atividade propiciaria a reagregação, formando dímeros ou complexos maiores, o que foi visto nos experimentos de filtração gel (Figuras 5.6 e 5.17). Por outro lado, a ligação de uma molécula de lipase ao substrato deixa esta enzima na conformação aberta e ativa. Após a catálise, a enzima ainda mantém suas porções hidrofóbicas expostas, possibilitando a interação com outra molécula de substrato ou com uma molécula de lipase. Com o aumento da concentração de substrato, mais moléculas ativas estariam presentes e, portanto, maiores as chances de interação entre as próprias moléculas de lipase. A soma dos dois efeitos, tendência à formação de agregados e ativação por aumento da concentração do substrato,

poderia resultar na propagação da formação de dímeros. A interação entre as moléculas que compõem o agregado poderia resultar em um efeito cooperativo, as porções hidrofóbicas de uma molécula funcionam como superfície hidrofóbica para ativação da segunda molécula. Assim, com o aumento da concentração do substrato, aumenta o número de dímeros em solução e aumenta a atividade enzimática. Pernas et al. (2001) verificaram que a dimerização da lipase Lip 3 de *Candida rugosa* aumentou a capacidade de hidrólise de triacetina em uma condição experimental na qual não havia interface, o que concorda com a hipótese de que, com a formação do dímero, uma molécula propicia a ativação da outra, de modo cooperativo.

O modelo proposto por Hendrickson e Dennis (1984) é uma variação do modelo proposto por Verger et al. (1973). O esquema cinético proposto assume que a enzima (E) liga-se inicialmente à uma molécula de substrato (S) presente na micela e passa a interagir com a interface. Em seguida a enzima (ES) liga-se com uma segunda molécula de substrato (ESS) e só então catalisa a reação (Esquema 2). O mecanismo se diferencia justamente pela hipótese de que a adsorção da enzima na interface é mediada pelo substrato.

Esquema 2– Mecanismo de catálise de lipases proposto por Hendrickson et al. (1984).



De acordo com o modelo proposto por Hendrickson, o efeito cooperativo se dá pela interação do substrato com a enzima. Uma molécula de substrato não só interage com a enzima, tornando-a ativa pela abertura da *lid*, mas permanece ligada a ela, mantendo a conformação aberta e ativa.

Assim, os resultados desta parte do trabalho mostraram que existe um efeito de cooperatividade, corroborado pelos resultados encontrados para o efeito da concentração de enzima e para o efeito da concentração de substrato na

atividade enzimática, cujas constantes foram passíveis de cálculo somente pela equação de Hill, que por sua vez pressupõe a existência de uma cooperatividade para a atividade enzimática. No caso de lipases, e especificamente da lipase de *B. megaterium*, sugere-se que o modelo de Hendrickson seja o mais adequado para explicar a ação da enzima.

6.2. Comparação das Propriedades do Sistema Lipolítico de *Bacillus megaterium* de diferentes cepas

A produção de hidrolases (lipases e esterases) por cepas diferentes de *B. megaterium* foi estudada recentemente por Ruiz et al. (2002) e Jung et al. (2003). As propriedades das enzimas isoladas por estes autores, para comparação com resultados deste trabalho, estão apresentadas na Tabela 5.21.

Ruiz et al. (2002) analisaram o zimograma de SDS-PAGE do sobrenadante de cultura de uma cepa de *B. megaterium* (CECT; ATCC9885). O zimograma foi revelado utilizando butirato de metil-umbeliferila. Os autores verificaram a presença de duas enzimas com diferentes massas moleculares (65 e 19 kDa) no sobrenadante de cultura (extracelulares) e uma enzima no extrato de células (58 kDa) (intracelular ou ligada a célula). Através de clonagem, foi isolada uma enzima de 19 kDa e pI de 9,56. Além disso, a recombinante apresentou comportamento de esterase, com maior atividade frente a substratos de cadeia curta (4 carbonos- *p*NPB), atividade máxima em pH 7,0 e 45 °C, estabilidade entre pH 4,0 e 12,0 e temperatura de 40 °C.

Jung et al. (2003) isolaram uma cepa de *B. megaterium* do solo, e através de SDS-PAGE e zimograma do extrato de células, verificaram uma banda de 38 kDa com atividade contra tributirina. Através de clonagem foi obtida uma enzima recombinante de 34 kDa, com atividade máxima contra a tributirina entre 25 e 35 °C em pH 8,0 e estabilidade em pH entre 6 e 9 e à temperatura de 45 °C.

TABELA 5.21. - SISTEMA LIPOLÍTICO DE DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus megaterium*.

	Presente trabalho	Ruiz et al.(2002)	Jung et al. (2003)
Selvagem ou Recombinante (R)	Selvagem	Selvagem : 1 a 3 e R	Recombinante
MM (kDa)	30-34	1) 65; 2)19; 3)58 R: 19	38
pI	nd	1) 5,7; 2) 9,4; 3) 5,5 R: 9,42	nd
Substrato	<i>p</i> NPP (16 C)	MUF-butirato (4 C)	<i>p</i> NPC (6 C)
Atividade			
Temperatura (°C)	55-60	45 (R)	25-35
pH	6-9	7 (R)	8
Estabilidade			
pH	3-10,5	4-12 (R)	6-9
Temperatura (°C)	40 °C (80% atividade residual, 40 min)	30 °C (40 dias) (R)	45 °C (80 % atividade residual, 30 min)
Especificidade de substrato	Éster de <i>p</i> NP de cadeia longa	Éster de <i>p</i> NP de cadeia curta (R)	nd

* nd: não determinado; *p*NPP: palmitato de *p*-nitrofenila; MUF-butirato: 4-butirato de metil umbeliferila; *p*NPC: caproato de *p*-nitrofenila; MM: massa molar.

A lipase caracterizada no presente trabalho possui características que a diferenciam das enzimas isoladas por Ruiz et al. (2002) e Jung et al. (2003). Estas diferenças estão principalmente nos parâmetros especificidade de substrato, e estabilidade ao pH e à temperatura, além da falta de similaridade entre as seqüências de aminoácidos, conforme discutido anteriormente.

7. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

- Foi isolada uma cepa bacteriana do gênero *Bacillus* produtora de lipases. O microrganismo foi caracterizado morfológicamente como *Bacillus megaterium* e depositado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Materiais de Referência da FIOCRUZ – RJ com o código CCOC - P2637.
- A lipase de *B. megaterium* foi produzida em meio de fermentação submersa, sendo atingido um pico máximo de produção da enzima de 33 U/mL após 70 h de cultivo. Durante o crescimento, foram apresentadas duas fases exponenciais, com taxas de crescimento específico (μ) 0 a 20 h de $0,15 \text{ h}^{-1}$, e de 20 a 108 h de $0,05 \text{ h}^{-1}$.
- Ensaio realizados com o extrato bruto demonstraram que a atividade lipolítica era estável em solventes miscíveis em água, observando-se ativação em concentrações crescentes de etanol, isopropanol e acetona. Observou-se estabilidade em solventes imiscíveis em água, mantendo-se 100% da atividade inicial após 1 h de incubação em butanol, tolueno, hexano e heptano.
- A enzima mostrou atividade no sistema de micelas reversas AOT/n-heptano, com $R_{O/A}$ de aproximadamente 1,9, o que mostrou a sua aplicabilidade neste sistema.
- Ensaio preliminares de purificação do extrato bruto em cromatografia de gel permeação demonstraram que a enzima forma agregados de alta massa molar já no meio de fermentação.
- Observou-se que o tratamento do extrato bruto com CHAPS 1 % ou isopropanol 30 % propiciava a clarificação do extrato. Entretanto, o CHAPS

provocou perda de 50% da atividade, enquanto o isopropanol promoveu aumento da atividade enzimática, sugerindo o rompimento dos agregados.

- A utilização de CHAPS para tratamento prévio do extrato bruto e como componente do tampão de eluição na cromatografia de interação hidrofóbica (coluna Phenyl Sepharose FF) foi eficiente para a purificação do extrato bruto, resultando em um fator de purificação de 70 e recuperação de 18 % da atividade enzimática.
- O tratamento prévio do extrato bruto com isopropanol a 30 % e a utilização de 60 % de isopropanol no tampão de eluição na coluna Octyl Sepharose CL4B (cromatografia de interação hidrofóbica) também foi eficiente na purificação do extrato, observando-se um fator de purificação de 43 e recuperação de 43 % da atividade.
- A análise eletroforética por SDS-PAGE das frações purificadas, tanto pela estratégia empregando CHAPS quanto pela estratégia utilizando isopropanol, resultou em 3 bandas de proteína com massas moleculares médias de 34, 50 e 60 kDa. Apenas a banda em torno de 34 kDa apresentou atividade enzimática frente ao MUF-butirato.
- O seqüenciamento da região N-terminal da proteína de massa molar aproximada de 34 kDa apresentou 93 % de similaridade com a seqüência interna de uma colesterol esterase de *Burkholderia cepacia*.
- Com relação à caracterização cinética e à estabilidade da enzima purificada pode-se concluir que:
 - i. A enzima apresentou atividade frente a triacilgliceróis de cadeia curta (C4), média (C8) e longa (C18), indicando comportamento de lipase verdadeira.
 - ii. Observou-se uma relação incomum entre a concentração de proteínas e a atividade enzimática, sendo verificadas duas regiões com relação linear, uma entre 0,0011 e 0,0175 mg/ml e outra entre 0,0175 e 0,035 mg/mL

- iii. A atividade máxima foi obtida entre as temperaturas de 55 e 65 °C e na faixa de pH entre 6 e 9.
- iv. Observou-se estabilidade à temperatura de 50 °C, observando-se 50% de atividade após 86 min de incubação. Com relação à estabilidade ao pH, a enzima manteve 100% da atividade inicial após incubação por 1 h a 29 °C na faixa de pH entre 3 e 10,5.
- v. A relação entre atividade enzimática e concentração de substrato indicou que a enzima não segue a cinética de Michaelis-Menten. Por outro lado, o perfil sigmoidal dos dados ajustaram-se bem à equação de Hill indicando que a enzima atua em cooperatividade.

Conclusão Geral do Trabalho

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a lipase de *B. megaterium* CCOC P2637 é uma nova enzima, ainda não relatada na literatura, fato que é confirmado pela seqüência N-Terminal, que embora tenha apresentado 93% de homologia com uma colesterol esterase de *B. cepacia*, é uma enzima produzida por outro microrganismo. As propriedades cinéticas e de estabilidade da enzima corroboram esta conclusão, pois são diferentes das reportadas em literatura para o sistema lipolítico de outras cepas de *B. megaterium*. Estas propriedades de alta estabilidade térmica e estabilidade em uma ampla faixa de pH, bem como a elevada razão atividade em meio orgânico/atividade em meio micelar ($R_{O/A} = 1,9$), mostram que a enzima tem potencial para a utilização em biocatálise em solventes orgânicos, tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos, e justificaram os esforços realizados na sua caracterização. Entretanto, a sua caracterização, especialmente com relação a massa molar e presença de isoformas ainda não foi totalmente elucidada, fato este que justifica a continuidade deste tema em trabalhos futuros que esclareçam estas características.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, A.M. Purification and partial characteriation of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 127-132, 2003.

ALMARSSON, O; KLIBANOV A. M. Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 49, p. 87-92, 1996.

ALTSCHUL, S.F.; THOMAS, L.M.; SCHÄFFER A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, GUZZO, J.; BARATTI, J. Molecular characterization of gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. **Biotechnol. Lett.**, v.21, p. 313-319, 1999.

ANDERSEN, H.J.; OSTDAL, H. Partial purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* MF32. **Food Chem.**, v.53, p. 369-373, 1995.

ANDERSON, E. M.; LARSSON, K. M.; KIRK, O. One biocatalyst - many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. **Biocatal. Biotransf.**, v. 16, p. 181-204, 1998.

ANGUITA, J.; APARICIO, L.B.R.; NAHARRO, G. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2411-2417, 1993.

ARNOLD, F.H.; WINTRODE, P.L.; MIYAZAKI, K.; GERSHENSON, A. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. **Trends Biochem. Sci.**, v. 26, p.100 – 106, 2001.

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

BARON, A.M. Biocatálise em ambientes aquo-restritos: comparação de diferentes sistemas reacionais. Curitiba, 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

BENZONANA, G. E DESNUELLE, P. Etude cinétique de l' action de la lipase pancréatique sur des triglycerides en émulsion. Essai d' une enzymologie en milieu heterogène. **Biochim. Biophys. Acta**, 105, 121-136, 1965.

BEVILAQUA, J.V.; PINTO, J.C.; LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J.; ALVES, T.L.M.; FREIRE, D.M.G. Enzymatic hydrolysis by immobilized lipase applied to a new prototype anti-asthma drug. **Biochem. Eng. J.**, v. 21, p. 103-110, 2004.

BIER, M. Lipases. **Methods Enzymol.**, v. 1, p. 627-642, 1955.

BLUM, H. ; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins: RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BORNSCHEUER, U.; REIF, O.W.; LAUSCH, R.; FREITAG, R.; SCHEPER, T.; KOLISIS, F.N.; MENGE, U. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1201, p. 55-60, 1994.

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

BRADDOO, S.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 15, p. 87-91, 1999.

BRADY, L., BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, Z.S., DODSON, E., DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J.P., CHRISTIANSEN, L., HUGE-JENSEN, B., NORSKOV, L. E MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.

BROCKMAN, H.L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Lipases, pp. 1-46. Borgstrom, B. e Brockman, H.L. (Eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.

BRZOZOWSKI, A.M.; SAVAGE, H.; VERMA, C.S.; TURKENBURG, J.P.; LAWSON, D.M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. **Biochemistry**, v. 39, p. 15071 – 15082, 2000.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; PINHEIRO, H.; PRAZERES, D. M. F. Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells. **J. Biotechnol.**, v. 59, p. 133-143, 1998.

- CAMMAROTA, M.C.; TEIXEIRA, G.A.; FREIRE, D.M.G. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with fat contents. **Biotechnol. Lett.**, v. 23, p. 1591-1595, 2001.
- CARREA, G.; RIVA, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 39, p. 2227-2254, 2000.
- CARVALHO, C. M. L.; CABRAL, J. M. S. Reverse micelles as reaction media for lipases. **Biochimie**, v. 82, p. 1063-1085, 2000.
- CASTELLAR, M.R., TAIPA, M.A. E CABRAL, J.M.S. Kinetic and stability characterization of *Chromobacterium viscosum* lipase, and its comparison with *Pseudomonas glumae* lipase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 61, p. 299-314, 1996.
- CAVILLE-LEFEBVRE, D.; COMBES, D. Lipase synthesis of short-chain flavour thioesters in solvent-free medium. **Biocatal. Biotransf.**, v. 15, p. 265-279, 1997.
- CHANDER, H.; RANGANATHAN, B.; SINGHI, J. Purification and some properties of lipase from *Streptococcus faecalis*. **J. Food Sci.**, v.44, p.1747-1751, 1979.
- CHEN, S.J.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. **J. Ferment. Bioeng.**, v.86, p. 308-312, 1998.
- CHO, A.R.; YOO, S.K.; KIM, E.J. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 186, p. 235-238, 2000.
- CHUANG, Y.C.; CHIOU, S.F.; SU, J.H.; WU, M.L.; CHANG M.C. Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. **Microbiology**, v.143, p. 803-812, 1997.
- CORNISH-BOWDEN, A. Fundamentals of enzyme kinetics. Portland Express, London, 1995.
- CYGLER M.; SCHRAG, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods Enzymol.**, v. 284, part A, p. 3-27, 1997.
- DANIELI, B.; LUISETTI, M.; STEURER, S.; MICHELITSCH, A.; LIKUSSAR, W.; RIVA, S.; REINER, J.; SCHUBERT-ZVILAVECZ, M. Application of lipase-catalysed regioselective esterification in the preparation of digitonin derivatives. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p.670-673, 1999.

- DE FELICE, B.; PONTECORVO, G.; BERDAGUE, J.L. Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. **Acta Biotechnol.**, v. 17, p.231-239, 1997.
- DEIVE F.J.; COSTAS, M. LONGO, M.A. Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnol. Lett.**, v. 25; p. 1403-1406, 2003.
- DHARMSTHITI, S., LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 241-246, 1999.
- DIAZ, P.; PRIM, N.; PASTOR, F.I.J. Direct fluorescence-based lipase activity assay. **Biotechniques**, v. 27, p. 696-700, 1999.
- DOSANJH, N.S., KAUR, J. Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from a *Bacillus* sp. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 36, p.7-12, 2002.
- DROUAULT, S.; CORTHER, G.; ERLICH S.D.; RENAULT, P. Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 588-598, 2000.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DÜNHAUPT, A., LANG, S., WAGNER, F. *Pseudomonas cepacia* lipase: studies on aggregation, purification and on the cleavage of olive oil. **Biotechnol. Lett.**, v. 14, p. 953-958, 1992.
- DUPUIS, C.; CORRE, C.;BOYAVAL, P. Lipase and esterase-activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp *freudenreichii*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 4004-4009, 1993.
- EGGERT T.; VAN POUDEROYEN, G.; DIJKSTRA, B.W.; JAEGER, K.E. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties and three-dimensional structure. **FEBS Lett.**, v. 502, p. 89-92, 2001.
- EGGERT, T.; PENCREAC`H, G.; DOUCHET, I.; VERGER, R.; JAEGER, K.E. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 6459-6469, 2000.
- EGGERT, T.; POUDEROYEN, G.; PENCREAC`H, G.; DOUCHET, I.; VERGER, R.; DIJKSTRA, B.W.; JAEGER, K.E. Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. **Colloid Surface B: Biointerfaces**, v.26, p. 37-46, 2002.

EGLOFF, M. P.; RANSAC, S.; MARGUET, F.; ROGALSKA, E.; VAN TILBEURGH, H.; BUONO, G.; CAMBILLAU, C.; VERGER, R. Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux. In: Malcata, F.X. (Ed.). Engineering of/with lipases. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

EGMOND, M.R.; VLIEG, J. *Fusarium solani pisi* cutinase. **Biochimie**, v. 82, p. 1015-102, 2000.

FELLER, G.; THIRY, M.; ARPIGNY, J.L.; GERDAY, C. Cloning and expression in *Escherichia coli* of 3 lipase-encoding genes from the psychrotrophic antarctic strain *Moraxella* TA144. **Gene**, v. 102, p. 111-115, 1991.

FELLER, G.; TLURY, M.; ARPIGNY, J.L.; MERGEAY, M.; GERDAY, C. Lipases from psychrotrophic antarctic bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 66, p. 239-244, 1990.

FERNANDES, M.L.M.; KRIEGER, N.; BARON, A.M., ZAMORA, P.P.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isocetane reversed micellar system. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; FUENTES, M.; MATEO C.; GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnol. Bioeng.**, v.82, p. 232-237, 2003.

FERRATO, F; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods Enzimol.**, v. 284, part B, p. 327-347, 1997.

FRASER, C. M.; DUJON B. The genomics of microbial diversity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, p. 443-444, 2000.

GALANOS, C., RIETSCHER, E.T., LÜDERITZ, O., WESTPHAL, O. Interaction of lipopolysaccharides and lipid A with complement. **Eur. J. Biochem.**, v. 19, p. 143-152, 1971.

GHANEM, E.H.; AL-SAYED, A.; SALEH, K.M. An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** , v.16, p. 459-464, 2000.

GUPTA, R.; GUPTA, N; RATHI P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p. 763–781, 2004.

HAN, S.J.; BACK, J.H.; YOON, M.Y.; SHIN, P.K.; CHEONG, C.S.; SUNG, M.H.; HONG, S.P; CHUNG, I.Y.; HAN, Y.S. Expression and characterization of

a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* species SY-01. **Biochimie**, v. 85, p. 501-510, 2003.

HEINSMAN, N. W. J. T.; ORRENIUS, S. C.; MARCELIS, C. L. M.; SOUSA TEIXEIRA, A.; FRANSSEN, M. C R.; PADT, A.; JONGEJAN, J. A.; GROOT, A. Lipase mediated resolution of γ -branched chain fatty acid methyl esters. **Biocatal. Biotransf.**, v. 16, p. 145-162, 1998.

HENDRICKSON, H.S.; DENNIS, E.A. Kinetic-analysis of the dual phospholipid model for phospholipase-A2 action. **J. Biol. Chem.**, v.259, p. 5734-5739, 1984.

HIOL, A.; JONZO, M.D.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 25, n. 1-2, p. 80-87, 1999.

HOLWERDA, K.; VERKADE, P.E.; WILLINGEN, A.H.A. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas**, v. 55, p.43, 1936.

HONG, M.C.; CHANG, M.C. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1. **Biotechnol. Lett.**, v. 20, p. 1027-1029, 1998.

HUMEAU, C.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M. Enzymatic esterification of bixin by L-ascorbic acid. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p.165-168, 2000.

IMAMURA, S., KITAURA, S. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **J. Biochem.**, v. 127, p. 419-425, 2000.

INGHAM, E.; HOLLAND, K.T.; GOWLAND, G.; CUNLIFFE, W.J. Partial purification and characterization of lipase (E.C.3.1.1.3) from *Propionibacterium acnes*. **J. General Microbiol.**, v.124, p. 393-401, 1981.

JAEGER, K .E., DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications os lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; RANSAK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, KE; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 390 – 397, 2002.

JAERGER, K. E., REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 396-403, 1998.

- JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v. 18, p. 650-657, 1983.
- JINWAL, U.K.; ROY, U.; CHOWDHURY, A.R.; BHADURI, A.P.; ROY, P.K. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, p. 1041-1046, 2003.
- JUNG, W.H.; KIM, H.K.; LEE, C.Y.; OH, T.K. Biochemical properties and substrate specificity of lipase from *Staphylococcus aureus* B56. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 12, p. 25-30, 2002.
- JUNG, Y.J.; LEE, J.K.; SUNG, C.G., OH, T.K.; KIM, H.K. Nonionic detergent-induced activation of an esterase from *Bacillus megaterium* 20-1. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 26, p. 223–229, 2003.
- JÜRGENS, D.; HUSER, H.; BRUNNER, H.; FEHRENBACH, F.J. Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* lipase. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 12, p. 195-199, 1981.
- KADEMI, A.; AÏT-ABDELKADER, N.; FAKHREDDINE, L.; BARATTI, J.C. Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 10, p. 395-401, 2000.
- KAKARIARI, E.; GEORGALAKI, M.D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Purification and characterization of an intracellular esterase from *Propionibacterium freudenreichii* ssp *freudenreichii* ITG14. **LAIT**, v. 80, p. 491-501, 2000.
- KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA, R., DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.22, p. 307-313, 2003.
- KAMYSHNY, A.; TROFIMOVA, D.; MAGDASSI, S.; LEVASHOV, A. Native and modified glucose oxidase in reversed micelles. **Colloid Surface B: Biointerfaces**, v. 24, p. 177-183, 2002.
- KIERKELS, J.G.T., VLEUGELS, L.F.W., KERN, J.H.A., MEIJER, E.M. E KLOOSTERMAN, M. Lipase Kinetics: on-line measurement of the interfacial area of emulsions. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 12, p. 760-763, 1990.
- KIERKELS, J.G.T.; PEETERS, W.P.H. Process for the enzymatic preparation of optically active transglycidic acid esters, 1994, Patente no. EP0602740.

KIM, H.K.; LEE, J.K.; KIM, H.; OH, T.K. Characterization of an alkaline lipase from *Proteus vulgaris* K80 and the DNA sequence of the encoding gene. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 135, p. 117-121, 1996a.

KIM, H.K.; SUNG, M.H.; KIM, H.M.; OH, T.K. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.58, p. 961-962, 1994.

KIM, HK; CHOI, HJ; KIM, MH; SOHN, CB; OH, TK. Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. **Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids**, v. 1583, p. 205 – 212, 2002.

KIM, M.H., KIM., H.K., LEE, J.K., PARK, S.Y., OH, T.K. Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: high-level production, purification, and calcium dependent thermostability. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, n. 2, p. 280-286, 2000.

KIM, M.K.; RHEE, J.S. Purification and biochemical properties of extracellular phospholipase A(1) from *Serratia* sp MK1. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 6, p. 407-413, 1996b.

KIRK, O; BORCHERT T.V.; FUGLSANG C.C. Industrial Enzymes applications **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 345–351, 2002.

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

KOJIMA, Y.; SHIMIZU, S. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 96, p. 219-226, 2003.

KORDEL, M.; HOFFMAN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHMID, R.D. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. **J. Bacteriol.**, v.173, p. 4836-4841, 1991.

KORNBERG, A. Why purify enzymes? **Methods Enzimol.**, v. 182, p.1-5, 1990

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. Editors, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins Ed., Baltimore, 1984.

KRIEGER, N. Produção, Purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum*. Curitiba, 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KRIEGER, N.; TAIPA, M. A.; AIRES-BARROS, M. R.; FONTANA, J. D.; MELO, E. H. M.; LIMA-FILHO, J. L.; CABRAL, J. M. S. Purification of the

Penicillium citrinum lipase using AOT-isoostane reverse micelles. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 69, p. 77-85, 1997a.

KRIEGER, N.; TAIPA, M. A.; MELO, E H. M.; LIMA, J. L.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Purification of a *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. **Bioprocess Eng.**, v. 20, p. 59-65, 1999.

KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; FONTANA, J. D.; MELO, E. H. M.; LIMA-FILHO, J. L.; CABRAL, J. M. S. Kinetics characteristics of *Penicillium citrinum* lipase in AOT/isooctane reversed micelles. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 85-87, 1997b.

KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnol. Adv.**, v. 20, p. 239-267, 2002.

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

LEAL, M.C.M.R., CAMMAROTA, M.C.; SANTANNA JR, G.L.; FREIRE, D.M.G. Enzimas hidrolíticas como coadjuvantes do tratamento anaeróbico de efluentes de laticínios. XII Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM), Teresópolis, 2000.

LEE, D.W., KIM, H.W., LEE, K.W., KIM, B.C., CHOE, E.A., LEE, H.S., KIM, D.S., PYUN, Y.R. Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v.29, p.363-371, 2001a.

LEE, D.W.; KOH, Y.S.; KIM, K.J.; KIM, B.C.; CHOI, H.J.; KIM, D.S.; SUHARTONO, M.T.; PYUN, Y.R. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 393-400, 1999.

LEE, H.K.; AHN, M.J.; KWAK, S.H.; SONG, W.H.; JEONG, B.C. Purification and characteriation of cold active lipase from psychrotrophic *Aeromonas* sp LPB 4. **J. Microbiol.**, v. 41, p. 22-27, 2003.

LEE, H.W.; KO, J.K.; KIM, W.J.; BYUN, S.M. Isolation, analysis and expression of lipase with cephalosporin-C deacylation activity from *Staphylococcus* sp. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 34, p. 274-277, 2001b.

LESUISSE, E.; SCHANK, K.; COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **Eur. J. Biochem.**, v. 216, p.155-160, 1993.

LI, X.Y.; TETLING, S.; WINKLER, U.K.; JAEGER, K.E.; BENEDIK, M.J. Gene cloning, sequence-analysis, purification and secretion by *Escherichia coli*

of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2674-2680, 1995.

LIMA, V. M. G., KRIEGER, N., MITCHELL, D. A., FONTANA, J. D. Kinetic characterization and stability in aqueous media and in organic solvents of a crude lipase preparation obtained from *Penicillium aurantiogriseum*. **Biochem. Eng. J.**, v.18, p.65-71, 2004.

LIMA, V.M.G. Lipase de *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx IOC 4212. Curitiba, 2000. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LIMA, V.M.G., KRIEGER, N., SARQUIS, M.I.M., MITCHELL, D.A., RAMOS, L.P., FONTANA, J.D., Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*, **Food Technol. Biotechnol.**, v. 41, p. 105-110, 2003.

LITTHAUER, D.; GINSTER A.; SKEIN, E.E. *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320 residue *Pseudomonas* lipase family. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 30; p. 209-215, 2002.

LONGHI, S.; CAMBILLAU, C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1441, p.185-196, 1999.

LOTRAKUL, P.; DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. **J. Biotechnol.**, v. 54, p. 113 – 120, 1997.

LU, J.Y.; LISKA, B.J. Lipase from *Pseudomonas fragi*. **Appl. Microbiol.**, v. 18, p. 108 - 113, 1969.

MACEDO, G.A.; LOZANO, M.M.S.; PASTORE, G.M. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. **Electronic J. Biotechnol.** , v. 7, p. 72-75, 2004.

MAKHZOUM, A.; OWUSU-APENTEN, R.K.; KNAPP, J.S. Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D. **Dairy J.**, v. 6, p. 459 - 472, 1996.

MANCO, G.; DI GENNARO, S; DE ROSA, M.; ROSSI, M. Purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius*. **Eur. J. Biochem.**, v. 221, p. 965 - 972, 1994.

MANUAL AMERSHAM BIOSCIENCE – Affinity chromatography: Principles and methods (b).

MANUAL AMERSHAM BIOSCIENCE – Gel filtration chromatography: Principles and methods (a).

MAQBOOL, Q.A., JOHRI, A., VERMA, L., RIYAZ-UL-HASSAN, S., VERMA, V., KOUL, S., TANEJA, S.C., PARSHAD, R., QAZI, G.N. Purification and characterization of a novel enantioselective hydrolase from *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 36, p. 227 - 234, 2002.

MARHUENDA-EGEA, F. C.; VELÁZQUEZ, S. P.; CADENAS, C.; CADENAS, E. Kinetic regulation of an alkaline p-nitrophenylphosphate phosphatase from *Halobacterium salinarum* in low water system by Mn^{+2} and monovalent cations. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 198, p. 111 - 115, 2001

MARHUENDA-EGEA, F. C.; VELÁZQUEZ, S. P.; CADENAS, C.; CADENAS, E. An extreme halophilic enzyme active at low salt in reversed micelles. **J. Biotechnol.**, v. 93, p. 159 - 164, 2002.

MARTINEK, K.; LEVASHOV, A. V.; KHMELNITSKY, Y. L.; KLYACHKO, N. L.; BEREZIN, I. V. Colloidal solution of water in organic solvents: a microheterogeneous medium for enzymatic reactions. **Science**, v.218, p.889 - 891, 1982.

MARTINELLE, M. E HULT, K. Kinetics of triglyceride lipases. In: Lipases, Their Structure, Biochemistry and Applications, pp. 159 - 180. Wooley, P. e Petersen, S.B. (Eds.) Cambridge University Press, U. K., 1994.

MATSUMA, H.; SHIBATANI, T. Purification and characterization of the lipase from *Serratia marcescens* SR41-8000 responsible for asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid-esters. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 77, p. 152 - 158, 1994.

MAUGARD, T.; REMAUD-SIMEON, M.; PETRE, D.; MONSAN, P. Enzymatic synthesis of surfactants via amide bonds. **Biocatal. Biotransf.**, v. 16, p. 383 - 393, 1998.

MELO, E. P.; FOJAN, P. CABRAL, J. M. S.; PETERSEN, S. P. Dynamic light scattering of cutinase in AOT reverse micelles. **Chem. Phys. Lipids**, v. 106, p. 181 -189, 2000.

MILED, N., BUSSETTA, C., DE CARO, A., RIVIERE, M., BERTI, L., CANAAN, S. Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases **Comp. Biochem. Physiol.**, Part B, v. 136, p. 131-38, 2003.

MIROLIAEI, M.; NEMAT-GORGANI, M. Effect of organic solvents on stability and activity of two related alcohol dehydrogenases: a comparative study. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, p. 169 – 175, 2002.

MITSUHASHI, K.; YAMASHITA, M.; HWAN, Y.S.; IHARA, F.; NIHIRA, T.; YAMADA, Y. Purification and characterization of a novel extracellular lipase catalyzing hydrolysis of oleyl benzoate from *Acinetobacter* nov sp strain KM109. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 63, p. 1959 - 1964, 1999.

MÖLLER, B.; VETTER, R.; WILKE, D.; FOULLOIS, B. Patent Application WO, 91/16422, 1991.

MURAOKA, T.; ANDO, T.; OKUDA, H. Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. **J. Biochem.**, v. 92, p. 1933 - 1939, 1982.

MURRAY, P.R.; JO BARON, E.; PFALLER, F.C.; TENOVER, R.H.; YOLKEN, R.H. Manual of Clinical Microbiology, Murray PM Ed, Washington, 1999.

NAMBOODIRI, V.M.H.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. **Lipids**, v. 35, p. 495 - 502, 2000.

NISHIO, T.; CHIKANO, T.; KAMIMURA, M. Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. **Agric. Biol. Chem.**, v.51, p. 181 -186, 1987.

NTHANGENI, M.B.; PATTERTON, H.G.; TONDER, A.; VERGEER, W.P.; LITTHAUER, D. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 28, p. 705-712, 2001.

NURY, S., GAUDRY-ROLLAND, N., RIVIÈRE, C., GARGOURI, Y., BOIS, A., LIN, M., GRIMALDI, M., RICHO, J. E VERGER, R. Lipase kinetics at the triacylglycerol-water interface. In: Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering, pp.123 - 127. Alberghina, L., Schmid, R.D. e Verger, R. (Eds.). GBF Monographs, vol. 16, Verlag-Chemie, Weinheim, 1991.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 367 – 375, 2002.

OGINO, H. NAKAGAWA, S.; SHINYA, K.; MUTO, T.; FUGIMURA, N.; YASUDA, M.; ISHIKAWA, H. Purification and characterization of organic solvent stable lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 89, p. 451-457, 2000.

OGINO, H.; HIROSHIMA, S.; HIROSE, S.; YASUDA, M.; ISHIMI, K.; ISHIKAWA, H. Cloning, expression and characterization of a lipase gene (lip3)

from *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Mol. Genet. Genomics**, v.271, p. 189 - 196, 2004.

OH, B.C.; KIM, H.K.; LEE, J.K.; KANG, S.C.; OH, T.K. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 385 - 392, 1999.

OMAR, I.C., HAYASHI, M., NAGAI, S. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* n.3. **Agric. Biol. Chem.**, v. 51, p. 37 - 45, 1987.

PALOMO, J.M.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; GUISAN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. General trends of lipase to self-assembly giving biomolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1 - 6, 2003.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCOOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 29, p. 119 - 131, Part 2, 1999.

PENCREAC` H, G.; LEULIER, M; BARATTI, J.C. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 56, p.181-189, 1997.

PENCREAC` H, J.; BARATTI, J.C. Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 28, p. 473 - 479, 2001.

PERNAS, M.; LOPEZ, C.; PRADA, A.; HERMOSO, J. RUA, M.L. Structural basis for the kinetics of *Candida rugosa* Lip1 and Lip3 isoenzymes. **Colloid Surface B- Biointerfaces**, v. 26, p. 67 - 74, 2002.

PERNAS, M.A.; LÓPEZ, C.; RÚA, M.L.; HERMOSO, J. Influence of the conformational flexibility on the kinetics and dimerisation process of two *Candida rugosa* lipase isoenzymes. **FEBS Lett.**, v. 501, p. 97 - 91, 2001.

POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K.E.; DIJKSTRA B.W. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme. **J. Mol. Biol.**, v. 309, p. 215 - 226, 2001.

PRATUANGDEJKUL, J., DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of a lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. **Microbiol. Research**, v. 155, n. 2, 95 - 100, 2000.

PRAZERES, D.M.F., GARCIA, F.A.P. E CABRAL, J.M.S. Kinetics and stability of a *Chromobacterium viscosum* lipase in a reversed micellar and aqueous media. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 53, p.159 - 164, 1992.

QUYEN, D.T.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R.D. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. **Protein Expr. Purif.**, v. 28, p. 102 - 110, 2003.

RAPP, P. Production , regulation, and some properties of a lipase activity from *Fusarium oxysporum* sp. *vasinfectum*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 17, p. 832 - 838, 1995.

REDONDO, O.; HERRERO, A.; BELLO, J.F.; ROIG, M.C.; CALVO, M.V.; PLOU, F.J.; BURGUILLO, F.J. Comparative kinetic study of lipases A e B form *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid p-nitrophenyl esters in mixed micelles with Triton X-100. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1243, p.15 - 24, 1995.

RIVA, S.; CHOPINEAU, J.; KIEBOOM, A. P. G.; KLIBANOV, A. M. Protease-catalysed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 110, p. 584 - 589, 1988.

ROLLOF,J.; HEDSTROM, S.A.; NILSSONEHLE, P. Purification and characterization of a lipase form *Staphylococcus aureus*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 921, p. 364 - 369, 1987.

RÚA, M.L., SCHMIDT-DANNERT, C., WAHL, S., SPRAUER, A., SCHMID, R.D. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus* large-scale, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. **J. Biotechnol.**, v. 56, p. 89 - 102, 1997

RÚA, M.L.; DIAZMAURINO, T.; FERNANDEZ, V.M.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and characterization of 2 distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1156, p. 181-189, 1993.

RUIZ, B.; FARRES, A.; LANGLEY, E.; MASSO, F.; SANCHEZ, S. Purification and characterization of an extracelular lipase from *Penicillium candidum*. **Lipids**, v. 36, p. 283 - 289, 2001.

RUIZ, C., BLANCO, A., PASTOR, J., DIAZ, P. Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of Lip A, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 217, p. 263 - 267, 2002.

RUIZ, C.; JAVIER PASTOR, F.I.; DIAZ, P. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 37, p.354–359, 2003.

SAKIYAMA, T.; YOSHIMI, T.; MIYAKE, A.; UMEOKA, M.; TANAKA, A.; OZAKI, S.; NAKANISHI, K. Purification and characterization of a

monoacylglycerol lipase from *Pseudomonas* sp. LP7315. **J. Biosci. Bioeng.**, v.91, p. 27 - 32, 2001.

SARADA, R; JOSEPH, R. Purification and properties of a lipase from the anaerobe *Propionibacterium acidi propionici*. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 69, p. 974 - 977, 1992.

SARDA, L. E DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 30, p. 513 - 521, 1958.

SAXENA RK; GHOSH PK; GUPTA R; DAVIDSON WS; BRADDOO S; GULATI R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Curr. Sci.**, v. 77, p.101 - 115,1999.

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Methods**, v. 52, p.1 - 18, 2003.

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

SCHLIEBEN, N.H.; NIEFIND, K.; SCHOMBURG, D. Expression, purification, and aggregation studies of His-tagged thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. **Protein Expr. Purif.**, v. 34, p. 103 – 110, 2004.

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

SCHMID, A.; HOLLMANN, F.; PARK J.B.; BÜHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.13, p. 359 –366, 2002.

SCHMIDT-DANNERT,C., SZTAJER,H., STÖCLEIN, W., MENGE, U., SCHMID, R.D. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1214, p. 43 - 53, 1994.

SCHØNHEYDER, F.; VOLQVARTZ, K. On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. **Acta Physiol. Scand.**, v. 9, p. 57-67, 1945.

SCHRAG, J.D., LI, Y., WU, S. E CYGLER, M. Ser-His-Glu triad form the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Nature**, v. 351, p. 761 - 764, 1991.

SCHRAG, J.D.; CYGLER, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. **Methods**

Enzymol., v. 284, p. 85 – 107, 1997.

SCHUEPP, C.; KERMASHA, S.; MICHALSKI, M.C.; MORIN, A. Production, partial purification and characterization of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. **Process Biochem.**, v.32, p. 225 - 232, 1997.

SHARMA, R.; SONI, S.K.; VOHRA, R.M.; GUPTA, L.K.; GUPTA, J.K. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp RSJ-1. **Process Biochem.**, v. 37, p. 1075 - 1084, 2002.

SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MACRAE, I.C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **J. Microb. Methods**, v. 6, p. 123 - 137, 1987.

SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.; TSUNASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel solvent tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 75, p. 349 - 352, 1993.

SIMONS, J.W.F.A.; ADAMS, H.; COX, R.D.; DEKKER, N.; GÖTZ, F. The lipase from *Staphylococcus aureus* Expression in *Escherichia coli*, large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hycus* lipase. **Eur. J. Biochem.**, v. 242, p. 760 - 769, 1996.

SIMONS, J.W.F.A.; GÖTZ, F.; EGMOND, M.R.; VERHEIJ, H.M. Biochemical properties of staphylococcal (phospho)lipases. **Chem. Phys. Lipids**, v. 93, p. 27 -37, 1998.

SINCHAIKUL, S., SOOKKHEO, B., PHUTRAKUL, S., PAN, F.M. Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: overexpression , purification and characterization. **Protein Expr. Purif.**, v. 22, p. 388 - 398, 2001.

SMITH, P.K, KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.J., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v. 150, p.76 - 85, 1985.

SNELLMAN, E.A.; SULLIVAN, E.R.; COLWELL, R.R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 5771 - 5779, 2002.

SOULTANI, S.; ENGASSER, J.M.; GHOUL, M. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 11, p. 725 - 731, 2001.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular

lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 168, p. 1070 - 1074, 1986.

SU, J.H.; CHANG, M.C.; LEE, Y.S., TSENG, I.C.; CHUANG, Y.C. Cloning and characterization of the lipase and lipase activator protein from *Vibrio vulnificus* CKM-1. **Biochim. Biophys. Acta – Gene Struct. Expr.**, v. 1678, p. 7 - 13, 2004.

SUAN, C.L.; SARMIDI, M.R. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. **J. Mol. Catal. B-Enzymatic**, v. 28, p. 111-119, 2004.

SUGIHARA, A.; TANI, T.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. **J. Biochem.**, v. 109, p. 211 - 216, 1991.

SUGIHARA, A.; UESHIMA, M.; SHIMADA, Y.; TSUNASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. **J. Biochem.**, v. 112, p. 598 - 603, 1992.

SUGIMURA, Y., FUKUNAGA, K., MATSUNO, T., NAKAO, K., GOTO, M., NAKASHIO, F. A study on the surface hydrophobicity of lipases. **Biochem. Eng. J.**, v. 5, p.123 - 128, 2000.

SUGIURA, M. ISOBE, M. Studies on lipase of *Chromobacterium viscosum*. 3. Purification of a low molecular weight lipase and its enzymatic properties. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 341, p. 195 - 200, 1974.

SUGIURA, M. ISOBE, M.; YAMAGUCHI, T. Studies on *Chromobacterium* lipase 2. Purification and properties of a *Chromobacterium* lipase with high molecular weight. **Agric. Biol. Chem.**, v. 38, p. 947 - 952, 1974.

SUGIURA, M.; OIKAWA, T.; KAZUYUKI, H.; INUKAI, T. Purification, crystallization and properties of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas fluorescens*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 488, p. 353 - 358, 1977.

SULLIVAN, E.R.; LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Cloning and sequence analysis of the lipase chaperone-encoding genes from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 and redefinition of a Proteobacterial lipase family and an analogous lipase chaperone family. **Gene**, v. 230, p. 277 - 285, 1999.

SUZUKI, T.; NAKAYAMA, T.; CHOO, D.W.; HIRANO, Y.; KURIHARA, T.; NISHINO, T.; ESAKI, N. Cloning, heterologous expression, renaturation, and characterization of a cold-adapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas* sp. strain B11-1. **Protein Expr. Purif.**, v. 30, p. 171 - 178, 2003.

SUZUKI, T.; NAKAYAMA, T.; KURIHARA, T.; NISHINO, T. ESAKI, N. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp strain n. 6. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 92, p. 144 - 148, 2001.

SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMIDT, R. Purification and some properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1124, p. 253 - 261, 1992.

TAIPA, M.A.; LIEBETON, K.; COSTA, J.V.; CABRAL, J.M.S; JAEGER, K.E. Lipase from *Chromobacterium viscosum*- Biochemical characterization indicating homology to the lipase from *Pseudomonas glumae*. **Biochim. Biophys Acta – Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1256, p. 396 - 402, 1995.

TAIPA, M.A.; MOURAPINTO, P.; CABRAL, J.M.S. Identification and characterization of *Chromobacterium viscosum* lipase. **Biotechnol. Techniques**, v.8, p. 27 - 32, 1994.

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

TEO, J.W.P.; ZHANG, L.H.; POH, C.L. Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. **Gene**, v. 312, p. 181 - 188, 2003.

TOMIZUKA, N.;OTA, Y.; YAMADA, K. Studies on lipase from *Candida cylindracea*. I-Purification and properties. **Agric. Biol. Chem.**, v. 30, p. 576-584, 1966.

TORRES, C.; OTERO, C.; Influence of the organic solvents on the activity in water and the conformation of *Candida rugosa* lipase: description of a lipase-activating pretreatment. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 19, p.594 - 600, 1996.

TRIPATHI, M.K.; ROY, U.; JINWAL, U.K.; JAIN, S.K.; ROY, P.K. Cloning, sequencing and structural features of a novel *Streptococcus* lipase. **Enzyme Microbial Technol.**, v.34, p. 437 - 445, 2004.

TURNER, N.J.; WINTERMAN, J.R.; MC CANGUE, R.; PARRATT, J.S.; TAYLOR, S.J.C. Synthesis of homochiral L-(S)-tert-leucine via lipase catalysed dynamic resolution process. **Tetrahedron Lett.** , v.36, p. 1113 - 1116, 1995.

VAN HEERDEN, E., LITTHAUER, D., VERGER, R. Biochemical characterisation and kinetic properties of a purified lipase from *Aspergillus niger* in bulk phase and monomolecular films. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 30, p.902 - 909, 2002.

VAN KAMPEN, M.D.; ROSENSTEIN, R.; GÖTZ, F.; EGMOND M.R. Cloning, purification and characterization of *Staphylococcus warneri* lipase 2.

- Biochim. Biophys. Acta** – Protein Struct. Mol. Enzymol., v. 1544, p. 229 - 241, 2001.
- VERGER, R. E DE HAAS, G.H. Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. **Ann. Rev. Biophys. Bioeng.**, v. 5, p. 77-117, 1976.
- VERGER, R. Enzyme kinetics of lipolysis. **Methods. Enzymol.**, v. 64, p. 340 - 392, 1980.
- VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends Biotechnol.**, v. 15, p.32 -38, 1997.
- VERGER, R.; MIERAS, M.C.E.; HAAS, G.H. Action of phospholipase A at interfaces. **J. Biol. Chem.**, v.248, p. 4023, 1973.
- VITOLO, S. PETRARCA, L.; BRESCI, B. Treatment of olive oil industry wastes. **Biores. Technol.**, v. 67, p. 129-137, 1998.
- VULFSON, E. Industrial applications of lipases. In: WOOLEY, P & PETERSEN, S. B. Lipases: their structure, biochemistry and applications. Cambridge University Press, p. 271-288, 1994.
- WANG, I-F., LALONDE, J.J., MOMOGAN, M., BERGBREITER, D.E. E WONG, C.-H. Lipase catalysed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective synthesis of alcohols, glycerol derivatives, sugars and organometallics. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 110, p. 7200-7205, 1988.
- WEI, Y.L.; KURIHARA, T.; SUZUKI, T.; ESAKI, N. A novel esterase from a psychrotrophic bacterium, *Acinetobacter* sp strain n.6, that belongs to the amidase signature family. **J. Mol. Catal B:Enzymatic**, v. 23, p. 357-365, 2003.
- WINKLER, F.K., D' ARCY, A. E HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.
- WINKLER, U.K. E STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 3, p. 663-670, 1979.
- WU, H.; ZHONG, M.H.; WANG, J.F.; LUO, D.H.; LOU, W.Y. Lipase-catalysed kinetic resolution of racemic 1-trimethylsilylethanol in organic solvent. **Chinese J. Chem. Eng.** , v. 12, p. 421-424, 2004.
- WU, J-Y.; LIU, S-W. Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctane: under controlled water activity. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 26, p. 124-130, 2000.

XIN, J.Y.; LI, S.B.; XU, Y.; WANG, L.L. Enzymatic resolution of (S) (+) Naproxen in a trapped aqueous organic solvent biphasic continuous reactor. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 68, p. 78-83, 2000.

XING GW; YE YH; LI CX. Progress in enzymatic syntheses of peptides and peptide derivatives in organic solvents. **Chem. J. Chinese Universities-Chinese**, v. 19, p. 1602-1607, 1998.

YADAV, R.P., SAXENA, R.K., GUPTA, R., DAVIDSON, W.S. Purification and characterization of a regio-specific lipase from *Aspergillus terreus*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 28, p. 243-249, Part C, 1998.

YAMAGUCHI, T.; MUROYA, N.; ISOBE, M.; SUGIURA, M. Production and properties of lipase from a newly isolated *Chromobacterium*. **Agric. Biol. Chem.**, v.37, p. 999-1005, 1973.

YAMAMOTO, K.; FUJIWARA, N. Purification and some properties of a castor-oil-hydrolyzing lipase from *Pseudomonas* sp. **Agric. Biol. Chem.**, v. 52, p.3015-3021, 1988.

YENNAWAR, N.H.; YENNAWAR, H.P.; FABER, G.K. X-ray crystal structure of γ -quymotrypsin in hexane. **Biochem.**, v.33, p. 7326-7336, 1994.

YOON, M.Y.; SHIN, P.K.; HAN, Y.S.; LEE, S.H.; PARK, J.K.; CHEONG, C.S. Isolation of an *Acinetobacter junii* SY-01 strain producing an extracellular lipase enantioselective hydrolyzing Itraconazole precursor and some properties of the lipase. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.14, p. 97-104, 2004.

ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalysed processes in organic solvents. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 82, p. 3192-3196, 1985.

ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 8017-8021, 1988 a.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymic catalysis in non-aqueous solvents. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 3194-3201, 1988 b.

ZHANG, J.; HOU, Z.; YAO, C.; YU, Y. Purification and properties of a lipase from a *Bacillus* strain for catalytic resolution of (R)-Naproxen. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 18, p. 205-214, 2002.

ZHANG, X.; KAMIYA, T.; OTSUBO, N.; ISHIDA, H.; KISO, M. Chemoenzymatic synthesis of ganglioside GM4 analogs as potential immunosuppressive agents. **J. Carbohydr. Chem.**, v. 18, p. 225-239, 1999.

ZHU, K.; JUTILA, A.; TUOMINEM, E.K.J.; KINNUNEN, P.K.J. Effects of i-propanol on the structural dynamics of *Thermomyces lanuginosa* lipase revealed by tryptophan fluorescence. **Protein Sci.**, v. 10, p. 339-351, 2001.

Anexos

DADOS DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA ENTRE A REGIÃO AMINO-TERMINAL DA LIPASE DE *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 E PROTEÍNAS DEPOSITADAS NO BANCO DE DADOS DO NCBI:

1. Resultado da comparação entre a sequência amino-terminal da lipase de *Bacillus megaterium* com proteínas de todos os organismos presentes no banco de dados:

[gi|45752472|dbj|BAD13379.1|](#) cholesterol esterase [Burkholderia cepacia]

Length = 364
Score = 85.9 bits (195), Expect = 9e-17
Identities = 27/29 (93%), Positives = 27/29 (93%)
Query: 1 APADGYAATRYPIILVHGLTGTKYAAVL 29
APAD YAATRYPIILVHGLTGTKYA VL
Sbjct: 43 APADNYAATRYPIILVHGLTGTKYAGVL 71

[>gi|10638019|emb|CAC11021.1|](#) lipase [synthetic construct]
[gi|126329|sp|P25275|LIP_PSES5](#) Lipase precursor (Triacylglycerol lipase)
[gi|243480|gb|AAC60400.1|](#) lipase [Pseudomonas]
[gi|77815|pir||JT0579](#) triacylglycerol lipase (EC 3.1.1.3) precursor
- Pseudomonas sp

[gi|216899|dbj|BAA00960.1|](#) lipase [Pseudomonas sp.]
Length = 364
Score = 83.8 bits (190), Expect = 4e-16
Identities = 26/28 (92%), Positives = 27/28 (96%)
Query: 1 APADGYAATRYPIILVHGLTGTKYAAV 28
APADGYAATRYPIILVHGL+GTKYA V
Sbjct: 43 APADGYAATRYPIILVHGLSGTKYAGV 70

[>gi|2952336|gb|AAC05510.1|](#) triacylglycerol lipase precursor [Pseudomonas luteola]
Length = 360
Score = 82.9 bits (188), Expect = 7e-16
Identities = 26/29 (89%), Positives = 26/29 (89%)
Query: 1 APADGYAATRYPIILVHGLTGTKYAAVL 29
APAD YA TRYPIILVHGLTGTKYA VL
Sbjct: 39 APADNYATRYPIILVHGLTGTKYAGVL 67

[>gi|94838|pir||A39133](#) triacylglycerol lipase (EC 3.1.1.3) precursor - Pseudomonas cepacia
Length = 364
Score = 82.1 bits (186), Expect = 1e-15
Identities = 26/29 (89%), Positives = 27/29 (93%)
Query: 1 APADGYAATRYPIILVHGLTGTKYAAVL 29
APA GYAATRYPIILVHGL+GTKYA VL
Sbjct: 43 APAAGYAATRYPIILVHGLSGTKYAGVL 71

[gi|1942114|pdb|2LIP|](#) Pseudomonas Lipase Open Conformation
Score = 80.0 bits (181), Expect = 5e-15

Identities = 25/27 (92%), Positives = 25/27 (92%)
Query: 3 ADGYAATRYPIILVHGLTGTDKYAAVL 29
AD YAATRYPIILVHGLTGTDKYA VL
Sbjct: 1 ADNYAATRYPIILVHGLTGTDKYAGVL 27

>[gi|2098520|pdb|1CVL|](#) Crystal Structure Of Bacterial Lipase
From Chromobacterium
Viscosum Atcc 6918
Length = 319
Score = 65.5 bits (147), Expect = 1e-10
Identities = 21/26 (80%), Positives = 23/26 (88%)
Query: 3 ADGYAATRYPIILVHGLTGTDKYAAV 28
AD YAATRYPIILVHGL GTDK+A V
Sbjct: 1 ADTYAATRYPIILVHGLAGTDKFNANV 26

>[gi|807162|gb|AAB32002.1|](#) lipase, triacylglycerol lipase {N-terminal} {EC 3.1.1.3}
[Pseudomonas cepacia, Amano, Peptide Partial, 22 aa]
Length = 22
Score = 65.1 bits (146), Expect = 2e-10
Identities = 20/21 (95%), Positives = 20/21 (95%)
Query: 3 ADGYAATRYPIILVHGLTGT 23
AD YAATRYPIILVHGLTGT
Sbjct: 1 ADNYAATRYPIILVHGLTGT 21

2. Resultado da comparação entre a seqüência amino-terminal da lipase de *Bacillus megaterium* e proteínas especificamente do gênero *Bacillus*:

>[gi|49329345|gb|AAT59991.1|](#) probable lipase (triacylglycerol lipase)
[Bacillus thuringiensis
serovar konkukian str. 97-27]
[gi|49477789|ref|YP_036713.1|](#) probable lipase (triacylglycerol
lipase) [Bacillus thuringiensis
serovar konkukian str. 97-27]
Length = 413
Score = 28.2 bits (59), Expect = 0.48
Identities = 11/20 (55%), Positives = 12/20 (60%), Gaps = 4/20 (20%)
Query: 6 YAATR----YPIILVHGLTG 21
YA R YPIILV+G G
Sbjct: 25 YAEERQQNNYPIILVNGFAG 44

>[gi|21400493|ref|NP_656478.1|](#) hypothetical protein predicted by
GeneMark [Bacillus anthracis
A2012]
Length = 395
Score = 28.2 bits (59), Expect = 0.48
Identities = 11/20 (55%), Positives = 12/20 (60%), Gaps = 4/20 (20%)
Query: 6 YAATR----YPIILVHGLTG 21
YA R YPIILV+G G
Sbjct: 7 YAEERQQNNYPIILVNGFAG 26

>[gi|30257224|gb|AAP26455.1|](#) lipase, putative [Bacillus anthracis
str. Ames]
[gi|49185440|ref|YP_028692.1|](#) lipase, putative [Bacillus anthracis
str. Sterne]

[gi|47778067|ref|YP_019249.2|](#) lipase, putative [Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor']
[gi|47551772|gb|AAT31724.2|](#) lipase, putative [Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor']
[gi|49179367|gb|AAT54743.1|](#) lipase, putative [Bacillus anthracis str. Sterne]
[gi|30262592|ref|NP_844969.1|](#) lipase, putative [Bacillus anthracis str. Ames]

Length = 400
Score = 28.2 bits (59), Expect = 0.48
Identities = 11/20 (55%), Positives = 12/20 (60%), Gaps = 4/20 (20%)
Query: 6 YAATR----YPIILVHGLTG 21
YA R YPIILV+G G
Sbjct: 12 YAEERQQNNYPIILVNGFAG 31

>[gi|47568734|ref|ZP_00239430.1|](#) lipase [Bacillus cereus G9241]
[gi|47554628|gb|EAL12983.1|](#) lipase [Bacillus cereus G9241]

Length = 413
Score = 26.9 bits (56), Expect = 1.2
Identities = 8/11 (72%), Positives = 9/11 (81%)
Query: 11 YPIILVHGLTG 21
YPIILV+G G
Sbjct: 34 YPIILVNGFAG 44

3. Resultado da comparação entre a seqüência amino-terminal da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e proteínas especificamente de *Bacillus megaterium*:

>[gi|18857878|emb|CAD23620.1|](#) extracellular esterase [Bacillus megaterium]

Length = 210
Score = 22.7 bits (46), Expect = 0.27
Identities = 6/10 (60%), Positives = 10/10 (100%)
Query: 12 PIILVHGLTG 21
P++LVHG++G
Sbjct: 34 PVVLVHGIGS 43