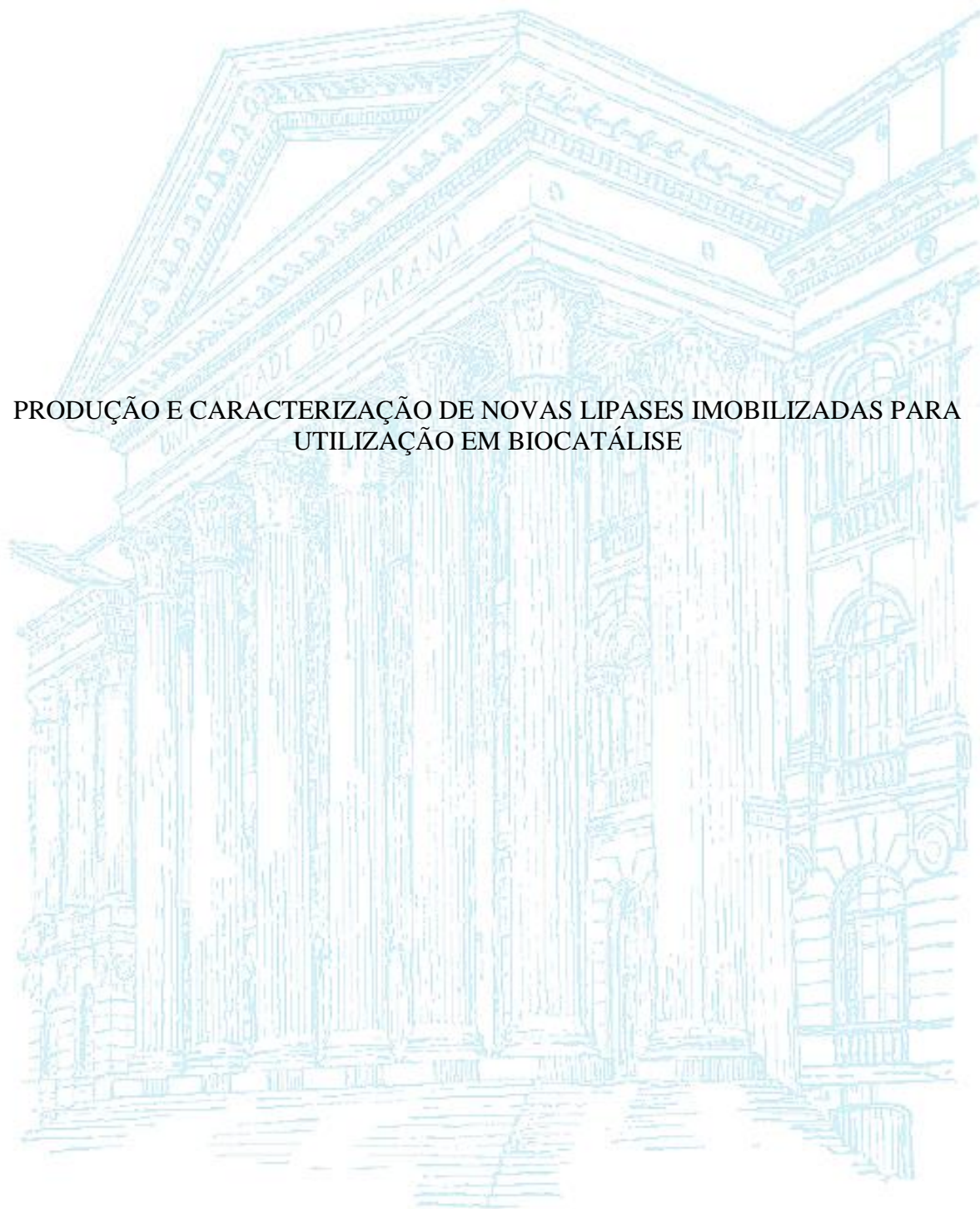


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ROBSON CARLOS ALNOCH**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS LIPASES IMOBILIZADAS PARA  
UTILIZAÇÃO EM BIOCATALÍSE**



**CURITIBA  
2017**

ROBSON CARLOS ALNOCH

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS LIPASES IMOBILIZADAS PARA  
UTILIZAÇÃO EM BIOCATÁLISE

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadia Krieger

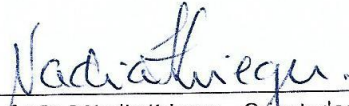
CURITIBA  
2017

## TERMO DE APROVAÇÃO

ROBSON CARLOS ALNOCH

Produção e Caracterização de novas Lipases Imobilizadas para Utilização em Biocatálise

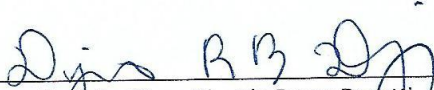
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



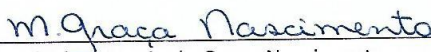
Prof.ª Dr.ª Nadia Krieger – Orientadora  
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos  
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti  
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Maria da Graça Nascimento  
Departamento de Química, UFSC



Dr. Arnaldo Glogauer  
Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR

Curitiba, 29 de março de 2017.

## AGRADECIMENTOS

À professora Nadia Krieger pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação, pela paciência e por todo o conhecimento transmitido.

Ao professor Cesar Mateo pelo aceite e orientação durante o estágio sanduíche desenvolvido no ICP em Madrid-Espanha, além de todo ensinamento, paciência e disposição que teve comigo no desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Marcelo Müller pela atenção, orientação, paciência e a valiosa colaboração neste trabalho.

Aos professores David A. Mitchel e Emanuel M. de Souza pelas sugestões, críticas e correções que muito contribuíram para esse trabalho.

Ao professores Diogo Ducatti e Wanderson D. da Rocha pelas correções no projeto e nos relatórios e por toda ajuda durante a execução do projeto.

Ao Dr. Arnaldo Glogauer pelas correções e sugestões na tese.

Ao doutorando Adriano A. Stefanello por todo ensinamento e pela disposição em ajudar sempre que precisei durante a realização do trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Luis Alves Cardoso e ao Dr. Dieval Guizelini pela montagem do genoma da bactéria *Burkholderia contaminans* e toda ajuda na identificação e anotação dos genes.

À professora Viviane de Paula Martini por toda ajuda modelagem molecular da proteína LipBC.

Aos colegas e amigos do LTEB, Maura, Janaina, Aline, Glauco, Maribel, Alessandra Biz, Fernanda, Jonas, Maritza, Mirian, Michelle, Jeferson e Andrei, por todo ensinamento e ajuda ao longo de todo o trabalho.

Ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio, em especial ao pessoal do Laboratório anexo, Sarah, Thalita, Cícero, Vivian, Adrian e Ana Paula por toda ajuda ao longo de todo o trabalho.

Aos Técnicos Valter Antônio e Roseli Prado por todo auxílio nas etapas do trabalho, além de todo ensinamento e paciência.

Às professoras Sílvia Maria e Gláucia Regina, coordenadoras do curso de pós-graduação em Bioquímica, e ao secretário Thiago Velo por todo apoio e atenção em todas às solicitações.

À UFPR e ao departamento de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao CNPQ e CAPES pelo auxílio financeiro.

À Grazielle, meu amor, que esteve sempre ao meu lado, compartilhando os momentos difíceis e as alegrias. Agradeço também pela sua paciência e apoio durante esses anos. Agradeço por todo amor e carinho que tem comigo, meu enorme reconhecimento e retribuição.

Aos meus queridos pais, àqueles que eu amo muito, e que sem eles eu nada seria: Seu Luiz e Dona Alice, que sempre acreditaram em mim. Agradeço também aos meus irmãos Jackson e Anderson, por todo carinho, amizade e força nessa etapa tão especial da minha vida.

*“Tornamos nosso mundo significativo pela coragem  
de nossas perguntas e pela profundidade  
de nossas respostas.”*

*Carl Sagan*

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo geral a produção, imobilização e caracterização das lipases LipC12 e LipBC visando futuras aplicações em biocatálise. Para obtenção da lipase LipBC, os genes *lipA* e *lipB* que codificam para lipase (LipBC) e foldase (LifBC), respectivamente, foram identificados no genoma da bactéria *Burkholderia contaminans* LTEB11, e clonados em vetores de expressão. As proteínas LipBC e LifBC foram expressas, purificadas e ensaios de caracterização foram realizados. LipBC e LifBC apresentam massas moleculares correspondentes a 33 kDa e 37 kDa, respectivamente, e permanecem complexadas após a purificação. LipBC livre apresenta alta atividade específica para substratos de cadeia curta (tributirina, 1400 U mg<sup>-1</sup>) e longa (óleo de oliva, 845 U mg<sup>-1</sup>), além de atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH (6,5 - 10) e temperatura (25 - 45 °C). LipBC foi imobilizada no suporte Sepabeads e apresentou atividade de esterificação (4 U g<sup>-1</sup>) quando aplicada na síntese de oleato de etila em *n*-hexano, com 90% de conversão em 6 h. Este trabalho também teve por objetivo a síntese de novos suportes para imobilização de lipases, assim como o desenvolvimento de novos protocolos de imobilização. Novos suportes bifuncionais foram preparados a partir de agarose e a lipase LipC12 foi utilizada como modelo de estudo. Os novos suportes apresentam grupos hidrofóbicos (diferentes grupos alquila) para promover a adsorção da lipase e grupos aldeídos para promover ligações covalentes com a enzima adsorvida. A melhor preparação imobilizada, C12-aldeído-LipC12, apresentou uma hiperativação acima de 300% e um aumento significativo na estabilidade (5000 vezes) a 80 °C em comparação com a enzima livre. C12-aldeído-LipC12 foi aplicada com sucesso na hidrólise regioseletiva do substrato peracetilado D-glucal, apresentando 69% de conversão do produto C-3 mono-desacetilado após 96 h. As diferentes estratégias de imobilização propostas nesse trabalho podem ser aplicadas em materiais como celulose, sílica ou resinas acrílicas, o que permite a obtenção de novos biocatalisadores com alta atividade e estabilidade para a aplicação em diferentes sistemas reacionais em biocatálise.

Palavras-chave: Imobilização, lipases, hiperativação, agarose, novos suportes, regioseletividade, biocatálise.

## ABSTRACT

This work aimed the production, immobilization and characterization of the lipases LipC12 and LipBC for future applications in biocatalysis. To obtain the LipBC lipase, *lipA* and *lipB* genes encoding lipase (LipBC) and foldase (LifBC), respectively, were identified in the genome of the bacterium *Burkholderia contaminans* LTEB11. The genes were amplified and cloned into expression vectors. LipBC and LifBC proteins were expressed, purified and characterization assays were performed. LipBC and LifBC have molecular weights corresponding to 33 kDa and 37 kDa, respectively, and remained complexed after purification. LipBC has high specific activity against short (tributylin, 1400 U mg<sup>-1</sup>) and long chain substrates (olive oil, 845 U mg<sup>-1</sup>), as well as activity and stability over a wide range of pH (6.5 - 10) and temperature (25 - 45 °C). LipBC was immobilized on Sepabeads and 90% of efficiency of immobilization was obtained in 1 h. The immobilized preparation catalyzed the synthesis of ethyl-oleate with an activity of 4 U g<sup>-1</sup>, with a yield of 90% obtained in 6 h. This work also aimed the synthesis of novel supports for lipase immobilization, as well as the development of new immobilization protocols. New bifunctional supports were prepared and LipC12 lipase was used as the study model. The new supports contained hydrophobic groups (different alkyl groups) to promote interfacial adsorption of the lipase and aldehyde groups to react covalently with the amino groups of side chains of the adsorbed lipase. The best immobilized preparation, C12-aldehyde-LipC12 was 3.5-fold more active (hyperactivation) and 5000-fold more stable (at 80 °C) than the soluble enzyme. C12-aldehyde-LipC12 was successfully applied in the regioselective hydrolysis of peracetylated D-glucal, producing high yields (69%) of the C-3 monodeacetylated product after 96 h of reaction. The different strategies of immobilization proposed in this work can be applied in materials such as cellulose, silica or acrylic resins, which allows the production of new biocatalysts with high activity and stability for the application in biocatalysis.

Key-words: Immobilization, lipases, hyperactivation, agarose, new supports, glutaraldehyde, regioselectivity, biocatalysis.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICEROL CATALISADA POR LIPASES.....	3
FIGURA 2 - MODELO ESTRUTURAL DE $\alpha/\beta$ HIDROLASES. ....	4
FIGURA 3 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> (PDB:1YS1) NA CONFORMAÇÃO "ABERTA". ....	5
FIGURA 4 – MODELO DE REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS CATALISADAS POR LIPASES NÃO ESPECÍFICAS E 1,3 ESPECÍFICAS.....	6
FIGURA 5 - MODELO ESTRUTURAL DO SÍTIO ATIVO DE LIPASES SEGUNDO A REGRA DE KAZLAUSKAS .....	7
FIGURA 6 - MODELO MOLECULAR DA LIPASE LipC12. ....	11
FIGURA 7 - EXEMPLO DE IMOBILIZAÇÃO COM UMA INTERAÇÃO ENZIMA-SUPORTE.....	17
FIGURA 8 - PRINCIPAIS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO.....	18
FIGURA 9 - IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES POR ADSORÇÃO FÍSICA EM SUPORTES HIDROFÓBICOS.....	19
FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO.....	22

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - EXPRESSION AND PURIFICATION OF LIPASE AND FOLDASE OF <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11.....	45
FIGURA 2 - PHYLOGENETIC ANALYSIS OF LipBC AND CLOSELY RELATED PROTEINS.....	46
FIGURA 3 - SECONDARY STRUCTURE ESTIMATION AND SEQUENCE ALIGNMENT OF LipBC AND TEMPLATES.....	48
FIGURA 4 - HOMOLOGY MODELED LipBC STRUCTURE SUPERPOSED OF THE TEMPLATE STRUCTURES.....	49
FIGURA 5 - EFFECT OF TEMPERATURE ON RECOMBINANT LipBC ACTIVITY AND STABILITY.....	51
FIGURA 6 - EFFECT OF PH ON RECOMBINANT LipBC ACTIVITY AND STABILITY.....	52
FIGURA 7 - KINETICS OF ADSORPTION OF RECOMBINANT LipBC ON SEPABEADS.....	53
FIGURA 8 - KINETICS OF SYNTHESIS OF ETHYL-OLEATE IN N-HEXANE CATALYZED BY IMMOBILIZED RECOMBINANT LipBC.....	54
FIGURA 9 - ETHYL-OLEATE YIELDS IN N-HEXANE DURING SUCCESSIVE REACTION CYCLES.....	55

### **CAPÍTULO 3**

SCHEME 1 - PREPARATION OF NEW TAILOR-MADE ALKYL-ALDEHYDE SUPPORTS.....	66
FIGURA 1 - IMMOBILIZATION COURSES OF LipC12 ON NEW ALKYL-ALDEHYDE SUPPORTS.....	67
FIGURA 2 - THERMAL INACTIVATION OF LipC12 IMMOBILIZED ON DIFFERENT ALKYL-ALDEHYDE SUPPORTS.....	68
FIGURA 3 - EFFECT OF TEMPERATURE ON FREE AND C12-ALDEHYDE/LipC12 ACTIVITY.....	69
FIGURA 4 - EFFECT OF PH ON FREE AND C12-ALDEHYDE/LipC12 ACTIVITY ..	69
FIGURA 5 - THERMAL STABILITY OF DIFFERENT PREPARATIONS OF LipC12 .....	77
FIGURA 6 - HYDROLYSIS OF 3,4,6-TRI-O-ACETYL-D-GLUCAL DURING SUCCESSIVE REACTION CYCLES .....	78
FIGURA 7 - SDS-PAGE ANALYSIS OF THE LIPASE LipC12 PURIFICATION.....	78

### **CAPÍTULO 4**

FIGURA 1 - MECANISMO DE IMOBILIZAÇÃO-ESTABILIZAÇÃO EM SUPORTES HETEROFUNCIONAIS.....	84
FIGURA 2 - ESTABILIDADE DE LipBC LIVRE E IMOBILIZADA FRENTE À TEMPERATURA.....	88

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 - ENZIMAS LIPOLÍTICAS OBTIDAS POR METAGENÔMICA COM APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE .....	9
--	---

### CAPÍTULO 1

TABELA 1 - GENOME FEATURES OF <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11. ....	27
--	----

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 - EXPRESSION AND CO-EXPRESSION ASSAYS AND LIPASE ACTIVITY OF THE DIFFERENT CONSTRUCTS. ....	44
TABELA 2 - ENZYMATIC ACTIVITY OF RECOMBINANT LipBC AGAINST NATURAL TRIACYLGLYCEROLS.....	50

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 - QUANTIFICATION OF GROUPS ON THE NEW ALKYL-ALDEHYDE SUPPORTS.....	66
TABELA 2 - PRINCIPAL PARAMETERS FOR IMMOBILIZATION OF THE LIPASE LipC12 ON NEW ALKYL-ALDEHYDE SUPPORTS. ....	67
TABELA 3 - HALF-LIVES (IN HOURS) OF THE DIFFERENT IMMOBILIZED PREPARATIONS AT 80 °C.....	68
TABELA 4 - REGIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF 3,4,6-TRI-O-ACETYL-D-GLUCAL (1) USING C12-ALDEHYDE/LipC12.....	70

### CAPÍTULO 4

TABELA 1 - PRINCIPAIS PARÂMETROS DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE LipBC EM SUPORTES HETEROFUNCIONAIS.....	85
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2. 1 LIPASES .....	3
2.1.1 Características Gerais .....	3
2.1.2 Fontes de Lipases .....	8
2.1.3 A lipase LipC12 obtida por prospecção metagenômica.....	11
2.1.4 A Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 (LipBC) .....	13
2.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	16
2.2.1 Imobilização de lipases .....	17
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 OBJETIVO GERAL .....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
3.3 ESTRATÉGIA DE AÇÃO.....	22
<b>4. CAPÍTULO 1:</b> Genome sequencing of <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11 reveals the presence of a lipolytic arsenal with biotechnological potential.....	23
<b>5. CAPÍTULO 2:</b> Co-expression, purification and characterization of the lipase and foldase of <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11.....	31
<b>6. CAPÍTULO 3:</b> New Tailor-Made Alkyl-Aldehyde Bifunctional Supports for Lipase Immobilization .....	63
<b>7. CAPÍTULO 4:</b> Imobilização da lipase recombinante LipBC em diferentes suportes heterofuncionais .....	79
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	90
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	92
<b>10. REFERÊNCIAS</b> .....	93

## 1 INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam sobre ésteres carboxílicos, promovendo sua hidrólise em ambientes aquosos ou a síntese em ambientes aquo-restritos (JAEGER, et al., 1994). Lipases apresentam propriedades de regio e enantiosseletividade e são estáveis em meios orgânicos (GUPTA et al., 2004; JAEGER et al., 1999). Essas características justificam a ampla aplicação de lipases em diferentes processos, fazendo com que ocupem uma posição de destaque entre as enzimas mais utilizadas em biocatálise (KAPOOR e GUPTA, 2012).

O sucesso na aplicação de lipases se dá, em grande parte, pela sua capacidade em catalisar reações com uma grande variedade de substratos não naturais, permitindo a sua aplicação para obtenção de diferentes classes de compostos orgânicos. Por exemplo, trabalhos de revisão foram publicados recentemente dando ênfase ao número de patentes de processos envolvendo lipases (DAIHA et al., 2015), ao emprego destas enzimas na síntese de ésteres (ZHAO et al., 2015), na produção de intermediários quirais (CARVALHO et al., 2015) e em relação às perspectivas de aplicação em biocatálise (ANGAJALA et al., 2016).

Devido a esse mercado, têm-se buscado cada vez mais obter novas e melhores lipases com alta atividade e propriedades de regio e enantiosseletividade diferenciadas (KAPOOR e GUPTA, 2012). Nesse sentido, diferentes abordagens vêm sendo utilizadas com objetivo de identificar e selecionar novas lipases com propriedades requeridas, impulsionando uma grande procura por novos micro-organismos produtores destas enzimas (ROH e VILLATTE, 2008).

Recentemente, duas novas lipases (LipC12 e LipBC) foram obtidas em nosso grupo de pesquisa a partir de diferentes estratégias. A lipase LipC12 foi isolada de uma biblioteca metagenômica construída a partir de solo contaminado com gordura animal (GLOGAUER et al., 2011), e no caso da lipase LipBC, essa enzima é produzida pela bactéria *Burkholderia contaminans* LTEB11 (anteriormente descrita como *Burkholderia cepacia*), isolada a partir de um meio de cultura suplementado com óleo vegetal (LIMA et al., 2004). Trabalhos prévios de caracterização envolvendo as lipases LipC12 e LipBC mostraram que essas lipases possuem características promissoras para aplicação em biocatálise, como estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, e em solventes orgânicos, além de alta

atividade contra triacilgliceróis naturais de cadeia longa (LIMA et al., 2004; SALUM et al., 2008; GLOGAUER et al., 2011; MADALOZZO et al., 2015). Além disso, estas lipases também já foram imobilizadas e aplicadas com sucesso em diferentes reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (SALUM et al., 2010; SOARES et al., 2013; BARON et al., 2014; MADALOZZO et al., 2016).

Os resultados apresentados demonstram o grande potencial de LipC12 e LipBC e motivaram a proposta geral desse trabalho, que envolve a produção e a imobilização das lipases em diferentes suportes e sua investigação em novas aplicações em biocatálise. Dentro dessa proposta, a investigação do processo de imobilização das lipases se torna fundamental, uma vez que já é bem descrito na literatura que a interação enzima-suporte pode promover mudanças significativas em relação a atividade, seletividade e estabilidade (MATEO et al., 2007c; MARCIELLO et al., 2012).

Assim, a síntese de diferentes e novos suportes para a imobilização de lipases e o desenvolvimento de novos protocolos de imobilização foram objeto de estudo desse trabalho visando obter biocatalisadores com propriedades diferenciadas daquelas já relatadas na literatura. Para alcançar esse objetivo, a estratégia de ação adotada envolveu a superexpressão e a purificação das lipases LipC12 e LipBC e a posterior imobilização e caracterização nos novos suportes sintetizados. Os resultados estão divididos em capítulos e são apresentados em forma de manuscritos.

No Capítulo 1 são apresentados os resultados em relação à montagem e anotação do genoma de *Burkholderia contaminans* LTEB (anteriormente classificada como *Burkholderia cepacia*) e identificação dos genes *lipA* e *lipB* correspondentes à lipase e foldase dessa cepa. O Capítulo 2 apresenta os resultados correspondentes à clonagem e a co-expressão dos genes *lipA* e *lipB*, e posterior purificação e caracterização da lipase LipBC. No Capítulo 3 é proposto um novo protocolo de imobilização para lipases baseado na síntese de uma nova classe de suportes a partir da agarose, utilizando a lipase LipC12 como modelo de estudo. No Capítulo 4 são apresentados os resultados complementares de imobilização da lipase LipBC em diferentes suportes heterofuncionais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LIPASES

#### 2.1.1 Características Gerais

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) têm como função natural a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, liberando di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (FIGURA 1). Em adição à sua atividade de hidrólise, as lipases podem catalisar diferentes reações em um meio reacional onde a quantidade de água do sistema seja suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio da reação no sentido da síntese (JAEGER, et al., 1994; JAEGER et al., 1999). Devido a essa versatilidade, os processos básicos catalisados por lipases podem ser combinados para resultar em diferentes reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (KLIBANOV, 2001; KRIEGER et al., 2004).

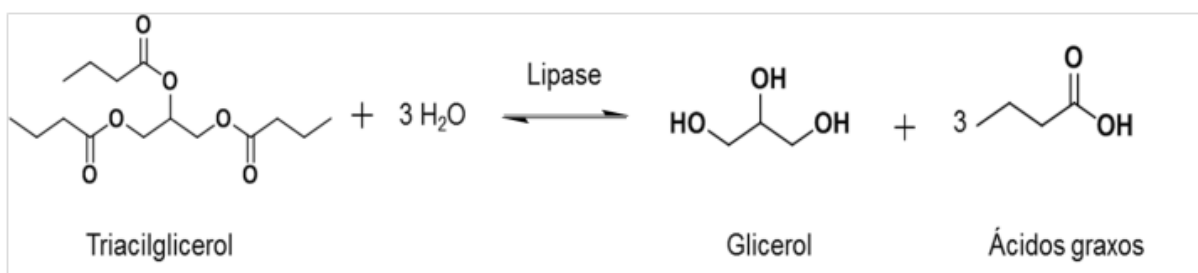


FIGURA 1 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICEROL CATALISADA POR LIPASES

Fonte: O AUTOR (2017).

As lipases apresentam como estrutura terciária comum uma dobra padrão do tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase. Esse modelo de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas  $\beta$  paralelas, rodeado por porções  $\alpha$ -hélice (FIGURA 2). As fitas  $\beta$  têm orientação para a esquerda, sendo que a primeira e a última fita apresentam um ângulo de aproximadamente  $90^\circ$  entre si. O núcleo central é composto por até oito fitas  $\beta$  paralelas rodeadas por até seis  $\alpha$ -hélices (OLLIS et al., 1992; CYCLER; SCHRAG, 1997; JAEGER et al., 1999).

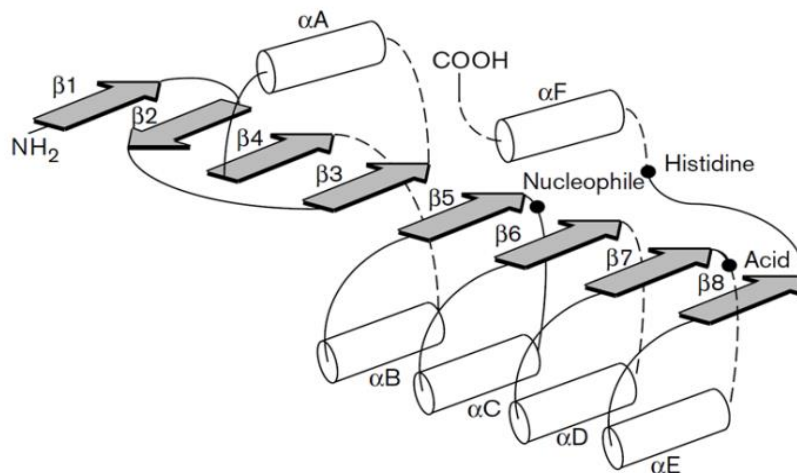


FIGURA 2 - MODELO ESTRUTURAL DE  $\alpha/\beta$  HIDROLASES

As  $\alpha$ -hélices são representadas pelos cilindros e as folhas  $\beta$  pelas setas planas. Os círculos sólidos em preto representam as posições topológicas dos resíduos que compõem o sítio ativo.

Fonte: JAEGER et al. (1999).

O sítio ativo de lipases é constituído por uma tríade catalítica composta pelos aminoácidos serina (Ser), histidina (His), aspartato (Asp) ou glutamato (Glu). O resíduo de serina fica localizado na fita  $\beta 5$  e faz parte de um pentapeptídeo altamente conservado GX SXG, onde G= glicina; S= Serina; X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico (CYCLER; SCHRAG, 1997; JAEGER et al., 1999). O sítio catalítico também é recoberto por uma curta alfa-hélice chamada de “tampa hidrofóbica” ou *lid*. Em meio aquoso, a *lid* cobre o sítio catalítico deixando-o completamente isolado do meio de reação, sendo que, nesta conformação, a lipase se encontra na sua forma “fechada” e é inativa. Na presença de substratos hidrofóbicos em solução aquosa, as lipases são “adsorvidas” na interface hidrofóbica e a *lid* desloca-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, expondo o sítio ativo favorecendo a ligação com o substrato (FIGURA 3). Esta mudança conformacional da lipase em interfaces água/óleo é conhecida como ativação interfacial (SARDA e DESNUELLE, 1958; CYCLER; SCHRAG, 1997; VERGER, 1997; JAEGER et al., 1999).

O fenômeno da ativação interfacial e a presença *lid* foram as principais características utilizadas para diferenciar lipases (E.C. 3.1.1.3) de esterases (E.C.3.1.1.1). Entretanto, apesar da presença da *lid* ainda ser comumente correlacionada com o fenômeno da ativação interfacial, foram descritas lipases que



não seguem essa correlação, como por exemplo, as lipases de *Burkholderia glumae* e de *Pseudomonas aeruginosa*, que não apresentam ativação interfacial, mas possuem a *lid* em suas estruturas (JAEGER et al., 1999). Por outro lado, a lipase de *Bacillus subtilis* não possui *lid* e não precisa da interface para exibir atividade de hidrólise (HOLMQUIST et al., 1997; VERGER, 1997; ALI et al., 2004).

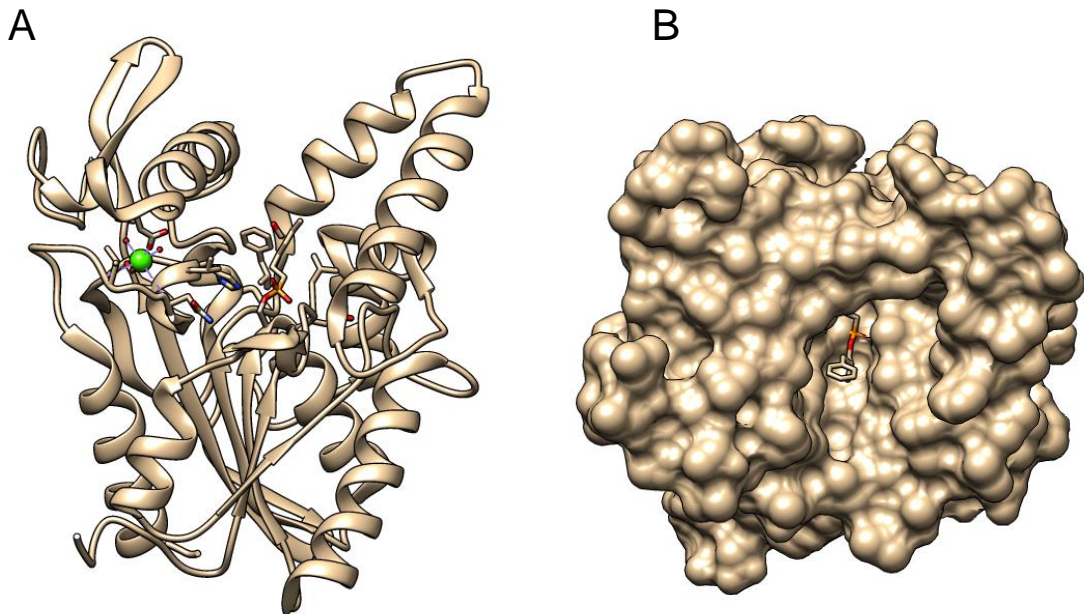


FIGURA 3 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* (PDB:1YS1) NA CONFORMAÇÃO "ABERTA"

(A) Os aminoácidos que compõem sítio ativo estão destacados em vermelho e o sítio de ligação ao íon cálcio destacado em verde. (B) sítio catalítico visto de cima, com os aminoácidos destacados em vermelho.

Fonte: O AUTOR (2017).

Assim, em termos de classificação, a presença da *lid* e o fenômeno da ativação interfacial não são critérios adequados para se classificar uma enzima como lipase. Atualmente na literatura as lipases têm sido definidas como carboxilesterases que atuam na hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de dez átomos de carbono), enquanto as esterases (E.C. 3.1.1.1) catalisam a hidrólise de triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia curta (KAPOOR e GUPTA, 2012).

O destaque das lipases como biocatalisadores se deve principalmente a sua especificidade e seletividade frente a diferentes substratos. Em termos de

classificação, lipases podem ser quimiosseletivas, atuando em um único tipo de grupo funcional no substrato, enantiosseletivas, com capacidade de reconhecer preferencialmente um enantiômero em relação ao outro e regiosseletivas, apresentando uma especificidade posicional entre grupos funcionais quimicamente idênticos localizados em diferentes posições na mesma molécula de substrato (FABER, 2000).

A classificação das lipases em relação à regiosseletividade está dividida em três diferentes grupos: lipases 1,3 específicas, que são aquelas que hidrolisam a ligação éster especificamente nas posições *sn*-1 e *sn*-3 de triacilgliceróis, lipases 2-específicas, que hidrolisam a ligação éster especificamente nas posições *sn*-2 de triacilgliceróis e lipases não específicas, que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de modo aleatório, a exemplo do que ocorre na catálise química (FIGURA 4) (KAPOOR e GUPTA, 2012).

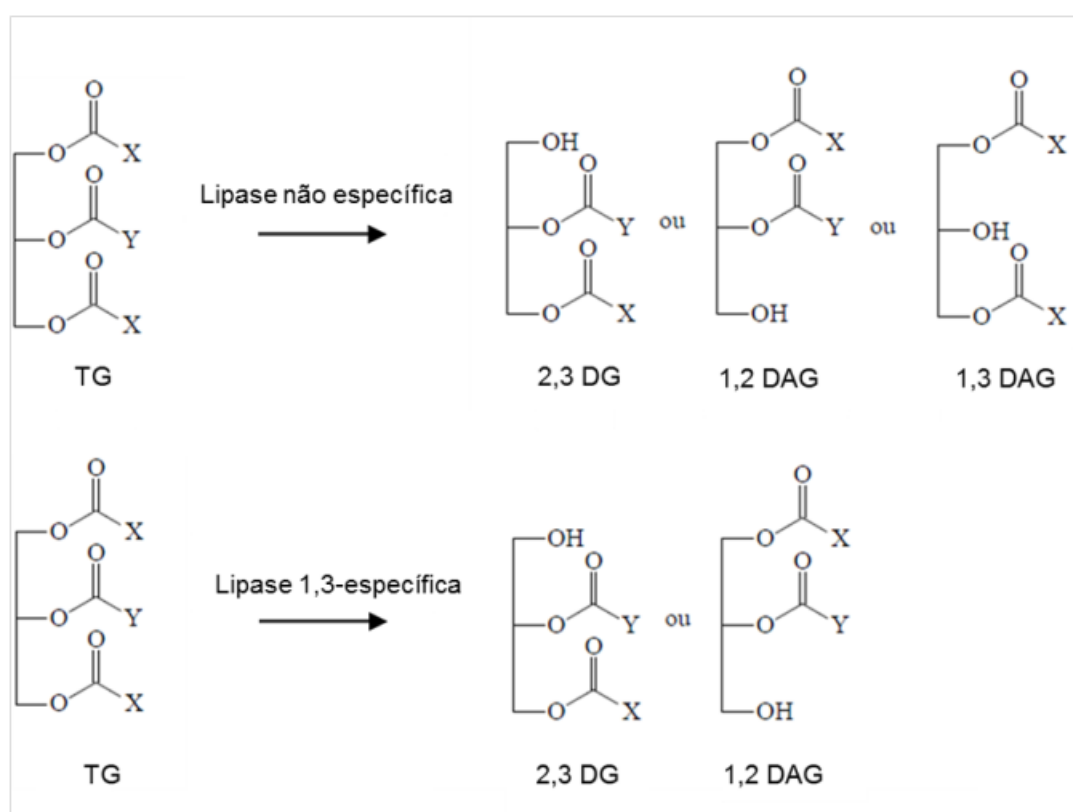


FIGURA 4 – MODELO DE REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS CATALISADAS POR LIPASES NÃO ESPECÍFICAS E 1,3 ESPECÍFICAS

Fonte: PAQUES e MACEDO (2006).

As lipases enantiosseletivas são de grande destaque em biocatálise devido à sua utilização na resolução de misturas racêmicas, visando à produção de compostos opticamente puros e de alto valor agregado. A aplicação de lipases nessas reações baseia-se na capacidade da enzima reagir com diferentes velocidades com os dois enantiômeros, catalisando assim a reação com formação preferencial de um enantiômero em relação ao outro. O enantiômero que permitir a melhor interação dos grupos substituintes com o sítio ativo da enzima será, portanto, o enantiômero preferido (FABER, 2000).

Um modelo bem descrito na literatura em relação à enantiosseletividade de lipases frente a álcoois secundários é o modelo de Kazlauskas (KAZLAUSKAS et al., 1991). Nesse modelo, o reconhecimento quiral ocorre com base no tamanho e na forma das moléculas quando estas estão no sítio ativo da enzima, o qual consiste de duas regiões de diferentes tamanhos, um “bolso” grande e outro pequeno (FIGURA 5). O substrato liga-se ao sítio ativo da enzima com maior eficiência, segundo uma geometria denominada de “modo produtivo” (FIGURA 5A). Quando o outro enantiômero interage com o sítio ativo da enzima, é então forçado a acomodar seu maior substituinte no menor espaço (modo não produtivo) (FIGURA 5B). Esse encaixe é energeticamente desfavorável e provoca um impedimento estérico, diminuindo assim, a velocidade de reação para este enantiômero (GHANEM, 2007).

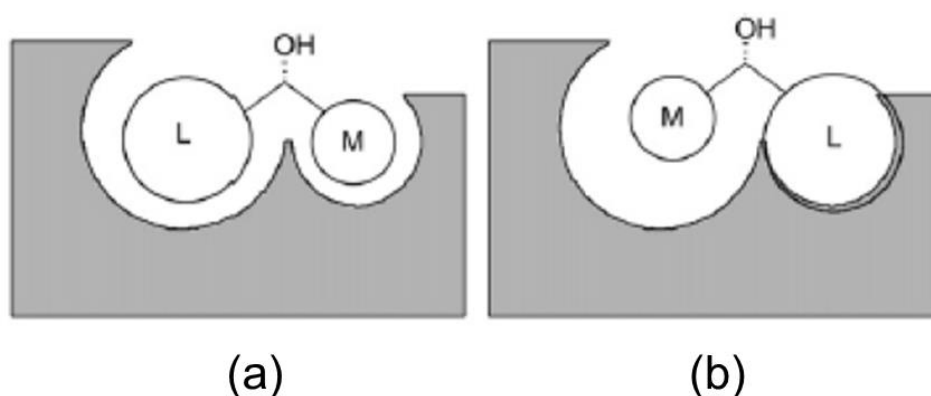


FIGURA 5 - MODELO ESTRUTURAL DO SÍTIO ATIVO DE LIPASES SEGUNDO A REGRA DE KAZLAUSKAS

(a) Enantiômero de reação mais rápida; (b) enantiômero de reação mais lenta.

Fonte: GHANEM (2007).

### 2.1.2 Fontes de Lipases

As lipases são produzidas pela maioria dos seres vivos e podem ser classificadas de acordo com sua origem como animal, vegetal ou microbiana. As lipases microbianas são as mais utilizadas na indústria pela facilidade na produção e de manipulação genética. Além disso, o fácil controle nas condições de cultivo também contribui para a produção em escala industrial relativamente com baixos custos (HASAN et al., 2006).

Lipases microbianas apresentam propriedades interessantes, como por exemplo, atividade em amplo intervalo de pH (3 - 11) e temperatura (30 - 60 °C), não dependência de cofatores e estabilidade a solventes orgânicos (GUPTA et al., 2004; KAPOOR e GUPTA, 2012). Essas características são requeridas em diferentes aplicações industriais e impulsionam uma grande procura por novos micro-organismos produtores de lipases (ROH e VILLATTE, 2008). Entretanto, os métodos convencionais de isolamento e cultivo dos micro-organismos apresentam limitações, pois apenas uma pequena proporção (cerca de 5%) destes micro-organismos pode ser cultivada *in vitro*. Para superar essa limitação, diferentes abordagens baseadas em biologia molecular vêm sendo utilizadas para obtenção de novas enzimas. Nos últimos anos, a triagem de enzimas em bibliotecas metagenômicas tem-se mostrado uma abordagem eficiente para obtenção de novas enzimas de origem diversificada (HANDELSMAN et al., 1998; RONDON et al., 2000; GLOGAUER et al., 2011; BAWEJA et al., 2016; DECASTRO et al., 2016).

A técnica de metagenômica para prospecção de novas enzimas ou outras biomoléculas pode ser dividida em quatro grandes etapas: a) isolamento de DNA de uma amostra ambiental, (b) clonagem do DNA em vetores apropriados, (c) transformação dos clones recombinantes em uma célula hospedeira (d) prospecção (triagem) dos clones da biblioteca metagenômica, que pode ser baseada na função ou na sequência (HANDELSMAN, 2004). Por essa técnica, a limitação imposta pelo cultivo de micro-organismos *in vitro* é superada, pois a técnica envolve a clonagem direta de fragmentos de DNA de amostras ambientais sem a necessidade de isolamento e cultivo. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de enzimas lipolíticas que já foram obtidas de bibliotecas metagenômicas e que foram aplicadas em biocatálise.

TABELA 1 - ENZIMAS LIPOLÍTICAS OBTIDAS POR METAGENÔMICA COM APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE (CONTINUA).

Fonte/ambiente	Enzima	Principais características	Aplicação	Ref.
Solo contaminado com gordura animal	Lipase LipG9	Atividade: 817 U mg <sup>-1</sup> / trioleína Temperatura ótima: 30 °C pH ótimo: 6,5 a 10,0 Imobilizada no suporte Accurel MP 1000	RCE de álcoois e ésteres e síntese do éster oleato de etila	ALNOCH et al. (2015)
Solo de fonte termal	Lipase Lip479	Atividade: 598 U mg <sup>-1</sup> /pNP Temperatura ótima: 65 °C pH ótimo: 8,0	Produção de biodiesel	SAHOO et al. (2016)
Chorume	Esterase Est22	Atividade: 60 U mg <sup>-1</sup> /pNP Temperatura ótima: 30 °C pH ótimo: 8,0	Hidrólise de antibióticos β-lactâmicos	MOKOENA et al. (2013)
Solo e água	Lipases LipS e LipT	Atividade: 1,2 U g <sup>-1</sup> (LipS)/pNP e 0,6 U g <sup>-1</sup> (LipT)/pNP Temperatura ótima: 70 °C (LipS) e 75 °C (LipT)	RCE de esteres de Ibuprofeno; Síntese do éster laurato de propila	CHOW et al. (2012)

RCE: Resolução cinética enzimática.

pNP: Ésteres de *p*-nitrofenol

TABELA 1. ENZIMAS LIPOLÍTICAS OBTIDAS POR METAGENÔMICA COM APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE (CONCLUSÃO).

Fonte/ambiente	Enzima	Principais características	Aplicação	Ref.
Solo contaminado com gordura animal	Lipase LipC12	Atividade: 1800 U mg <sup>-1</sup> / trioleína Temperatura ótima: 30 °C pH ótimo: 6,5 a 10,0 Imobilizada no suporte Immobead®	Síntese do éster oleato de etila	MADALOZZO et al. (2015)
Solo de fonte termal	Lipase LipR1	Atividade: 121 U mg <sup>-1</sup> / pNP Temperatura ótima: 50 °C pH ótimo: 8,0	RCE de álcoois secundários	KUMAR et al. (2017)
Solo contaminado com óleo	Lipase LipZ01	Atividade: 42 U mL <sup>-1</sup> / azeite de oliva Temperatura ótima: 60 °C pH ótimo: 7,0 a 10,0	Produção de biodiesel	ZHENG et al. (2013)
Solo de compostagem	Esterase Est2K	Atividade: 17 U mg <sup>-1</sup> /pNP Temperatura ótima: 50 °C pH ótimo: 10,0	Hidrólise de antibióticos β-lactâmicos	KIM et al. (2010)

RCE: Resolução cinética enzimática.

pNP: Ésteres de *p*-nitrofenol

### 2.1.3 A lipase LipC12 obtida por prospecção metagenômica

Uma biblioteca metagenômica foi construída por Glogauer et al. (2011) a partir de amostras de solo contaminado com alto teor de gordura animal. A biblioteca, denominada SCGA (Solo Contaminado com Gordura Animal) possui cerca de 500.000 clones e está depositada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular desta Universidade. Glogauer et al. (2011) realizou uma seleção dos clones com atividade lipolítica contra diferentes substratos. A partir dessa triagem, uma nova lipase, denominada LipC12 (FIGURA 6), foi isolada e caracterizada. A nova lipase possui uma massa molecular de 33 kDa e apresenta 72% de identidade com a putativa lipase de *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleoartica* Y11. A análise filogenética classificou LipC12 como pertencente à família I.1, na qual estão inclusas as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia mollaretii* e *Proteus vulgaris* (GLOGAUER et al., 2011).

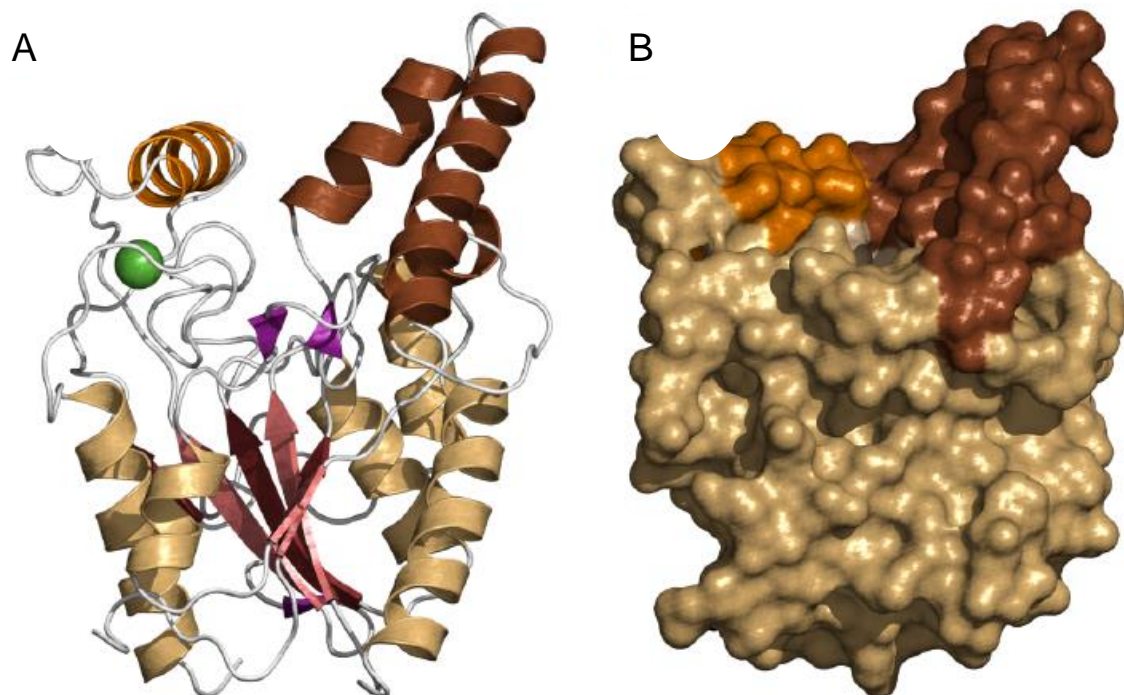


FIGURA 6 - MODELO MOLECULAR TEÓRICO DA LIPASE LIPC12

O sítio de ligação ao íon cálcio é destacado em verde (A) e a *lid* em marrom e laranja (B).

Fonte: GLOGAUER et al. (2011).

Os estudos de caracterização de LipC12 em meio aquoso revelaram que a enzima é estável em concentrações de até 3,7 mol L<sup>-1</sup> de NaCl, a temperaturas entre 20 e 50 °C, com máxima atividade a 30 °C, após 1 h de incubação. LipC12 também foi estável após 48 h de incubação em soluções com 30% de solventes orgânicos, permanecendo com 100% da atividade inicial. A enzima purificada apresentou atividade específica de 1722 U mg<sup>-1</sup> e 1767 U mg<sup>-1</sup> contra óleo de oliva e gordura de porco, respectivamente. Essas atividades específicas são comparáveis às das lipases comerciais de *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus* (GLOGAUER et al., 2011).

Os resultados promissores de caracterização reportados por Glogauer et al. (2011) motivaram a continuação dos estudos e posteriormente, ensaios de imobilização e caracterização em meio orgânico da lipase LipC12 foram realizados. Madalozzo et al. (2015) imobilizaram LipC12 purificada no suporte Immobead 150 (polímero acrílico) e aplicaram o derivado imobilizado na síntese de oleato de etila em *n*-heptano. LipC12 imobilizada apresentou uma atividade de esterificação de 91 U g<sup>-1</sup> de suporte e uma conversão em éster de 99% em 1 h. Essa mesma preparação foi utilizada por 10 ciclos de reação mantendo mais de 95% de sua atividade inicial (MADALOZZO et al., 2015).

LipC12 também foi imobilizada no suporte Immobead 150 a partir do extrato bruto livre de células (Ibead-EBLipC12) e foi caracterizada. Essa preparação se mostrou estável em 100% de solventes orgânicos, mantendo 60% de sua atividade frente a solventes polares e mais de 90% frente a solventes apolares após 24 h de incubação. A preparação Ibead-EBLipC12 foi caracterizada como sendo regioseletiva (1,3 específica) e tiposseletiva, tendo preferência para ácidos graxos saturados de cadeia média e longa (C12:0, C16:0 e C18:0) (MADALOZZO et al., 2016).

A preparação Ibead-EBLipC12 também foi aplicada com sucesso em reações de síntese do oleato de etila em meio reacional livre de solvente (onde os solventes são os substratos da reação), um sistema-modelo para a síntese do biodiesel. Após a otimização do processo, foi obtida uma conversão em éster de 85% em 48 h. Em adição, essa preparação foi aplicada na síntese de um lipídio estruturado, promovendo a inserção de 23% de ácido caprílico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 dos triacilgliceróis do azeite de oliva (MADALLOZO et al., 2016).



Os resultados apresentados pela LipC12 demonstram o grande potencial dessa lipase e motivaram sua utilização nesse trabalho, sendo promissora sua imobilização em novos e diferentes suportes e sua investigação em novas aplicações em biocatálise.

#### 2.1.4 A Lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 (LipBC)

A cepa de *Burkholderia cepacia* LTEB11 foi isolada no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise e está depositada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da UNICAMP. Essa estirpe, anteriormente classificada como *Bacillus megaterium*, produz uma lipase, denominada LipBC, que foi caracterizada e parcialmente purificada por Lima et al. (2004). LipBC apresenta uma massa molecular de 33 kDa e uma alta atividade volumétrica ( $30 \text{ U mL}^{-1}$ ) frente ao substrato pNPP (palmitato de *p*-nitrofenila) quando produzida por fermentação submersa. LipBC também apresenta atividade em uma ampla faixa de pH (3,5 - 10) e temperatura (30 - 70 °C), com atividade máxima a 55 °C (LIMA et al., 2004). Em relação à sua utilização em biocatálise, LipBC apresenta características interessantes como estabilidade em solventes orgânicos polares e apolares e à temperatura (LIMA et al., 2004; SALUM et al., 2008).

Outra característica importante de LipBC é alta atividade de esterificação e transesterificação, já descrita em estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa. Salum et al. (2008) reportaram 99% de conversão na síntese de oleato de etila em *n*-heptano após 3 h de reação utilizando LipBC imobilizada em Accurel EP 100 (polipropileno). Baron et al. (2011) imobilizaram LipBC pela técnica de SPIL (Simultânea Produção e Imobilização de Lipases) no suporte Accurel EP 100 e aplicaram em reações de esterificação. Foram obtidos 95% de conversão na síntese de oleato de etila em apenas 1 h de reação (BARON et al., 2011). Mais recentemente, Baron et al. (2014) aplicaram LipBC imobilizada nesse mesmo suporte em reações de transesterificação em sistema livre de solventes, utilizando óleo de mamona como substrato. Os autores reportaram resultados promissores, tendo uma conversão em ésteres etílicos de 90% em apenas 6 h de reação.

A lipase LipBC também já foi produzida por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais e aplicada na síntese de oleato de etila e na etanólise do óleo de milho (FERNANDES et al., 2007). Mais recentemente, Salum et

al. (2010) utilizaram o sólido fermentado contendo a lipase LipBC em reações de transesterificação em reator de leito fixo e obtiveram altas conversões (95% em 46 h) em meio livre de solvente orgânico. Ótimos resultados também foram obtidos com o sólido fermentando em reações de esterificação em reator de leito fixo, utilizando como substrato uma mistura de ácidos graxos livres provenientes da hidrólise de óleo residual (borra ácida) em água supercrítica (SOARES et al., 2013; DIAS et al., 2017).

Em relação à enantiosseletividade, LipBC imobilizada em Accurel EP100 foi aplicada na resolução de álcoois alílicos secundários. Os resultados mostraram que LipBC catalisou reações de transesterificação enantiosseletivas com elevados valores de coeficiente de enantiosseletividade ( $E$ ) com os substratos *rac*-1(1-fenilprop-2-en-1-ol)  $ee = 93,8\%$   $E = 54,2$ ; *rac*-2 (p-clorofenilprop-2-en-1-ol)  $ee = 92,6\%$ ,  $E = 54,6$ ; *rac*-3 (m-metoxifenil prop-2-en-1-ol)  $E=38,1$   $ee = 92\%$ ,  $E = 38,1$  (MOURE et al., 2014).

Os resultados apresentados pela lipase LipBC em diferentes trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa demonstram o grande potencial dessa lipase em biocatálise. Esses estudos motivaram um objetivo desse trabalho que foi a clonagem e a purificação desta lipase, uma vez que nos trabalhos anteriores do grupo LipBC sempre foi imobilizada a partir de um extrato bruto obtido da fermentação. Outro fator que motivou esta proposta é o fato da bactéria *B. cepacia* ser classificada como patógena oportunista, o que dificulta seu cultivo para a produção da lipase em larga escala (VANLAERE et al., 2009). Assim, foi desenhada uma estratégia de clonagem e expressão para a LipBC, a fim de se obter a enzima purificada.

O gene que codifica a lipase de *B. cepacia*, denominado como *lipA*, é composto por 1096 pares de base e a proteína expressa contém 320 aminoácidos (JORGENSEN et al., 1991). A lipase é secretada para o meio extracelular através de um mecanismo similar ao do gênero *Pseudomonas*, denominado SEC ou tipo II. Por esse mecanismo, a expressão funcional da lipase é dependente de uma proteína auxiliar, uma foldase específica para lipase, denominada Lif (ROSENAU et al., 2004).

O gene auxiliar que codifica a Lif, denominado *lipB*, está localizado na região à montante do gene da lipase no mesmo operon. Sem a foldase, a lipase é produzida em uma forma inativa, como relatado para algumas espécies de

*Pseudomonas* e *Burkholderia* gram-negativas (ROSENAU et al., 2004). Assim, a necessidade da Lif tem sido um fator limitante para a superexpressão da lipase funcional em hospedeiros heterólogos. Para contornar esse problema, diferentes abordagens vêm sendo utilizadas, tais como o uso de aditivos químicos (KOJIMA et al., 2003), a expressão em hospedeiros homólogos (TRAUB et al., 2001; PAUWELS et al., 2006), e o reenovelamento *in vitro*. Nessa estratégia, lipase (*lipA*) e foldase (*lipB*) são expressas e purificadas separadamente, e em uma segunda etapa, resuspendidas em uma solução tampão (HOBSON et al., 1993; OGINO et al., 2007; AKBARI et al., 2010).

Uma outra estratégia utilizada para obtenção da lipase ativa é a co-expressão dos genes *lipA* e *lipB* (MADAN e MISHRA, 2010; WU et al., 2012; MARTINI et al., 2014). Primeiramente, pode-se chamar de co-expressão quando em um mesmo plasmídeo são inseridos os genes da lipase e foldase em forma de operon. Entretanto, esse tipo de estratégia pode resultar numa baixa expressão e baixo rendimento da lipase (HOBSON et al., 1993; WU et al., 2012). Outra estratégia de co-expressão foi proposta por Madan e Mishra (2010), onde os genes da lipase e foldase são clonados em plasmídeos diferentes, mas inseridos no mesmo hospedeiro heterólogo. Uma vantagem a ser destacada nessa estratégia é a obtenção da lipase ativa uma única etapa, logo após a sua expressão (MADAN e MISHRA, 2010; MARTINI et al., 2014).

Essa estratégia, chamada co-expressão *in vivo* foi utilizada nesse trabalho para a obtenção da lipase LipBC. Em adição, este trabalho também teve por objetivo o sequenciamento genômico e a identificação da cepa *B. cepacia* LTEB11, pois recentemente uma análise parcial do gene ribossomal 16S realizada pelo CPQBA reclassificou a cepa *B. cepacia* LTEB11 como *B. lata*. Entretanto, essa análise realizada se mostrou inconclusiva, pois a sequência do gene 16S apresentou 100% de similaridade com os das estirpes de *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. sp 32*, *B. arboris* e *B. lata*.

## 2.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas pode ser definida como uma técnica de promover a ligação de uma enzima a uma matriz inerte através de meios físicos ou químicos. A matriz torna a enzima insolúvel no meio reacional, mas permite que a enzima entre em contato com o substrato, catalisando as reações (MATEO et al., 2007c; VILLENEUVE et al., 2000). Esse processo tem um importante papel na biocatálise, pois há diversos problemas na utilização de enzimas em sua forma livre. Dentre eles, citam-se a baixa estabilidade nas condições utilizadas (temperatura e solventes orgânicos) nos diferentes processos e as dificuldades de se reciclar uma enzima livre em um meio reacional (VILLENEUVE et al., 2000).

Assim, a utilização de enzimas imobilizadas garante várias vantagens em processos industriais, dentre as quais, destaca-se dois pontos: 1) permite a reutilização da enzima, pois a imobilização facilita a recuperação do biocatalisador do meio reacional, seja por filtração ou centrifugação, o que também facilita a separação dos produtos; 2) a imobilização pode ser direcionada para alterar favoravelmente propriedades enzimáticas, como estabilidade, atividade e especificidade (VILLENEUVE et al., 2000; GUIBAN et al., 2001; MATEO et al., 2007b).

Vários são os protocolos que podem ser utilizados para imobilização de uma enzima. Deve-se levar em consideração as características da enzima e do substrato para a escolha do suporte ideal, podendo este ser sólido, poroso, membranoso, fibroso, entre outros. Nesse sentido, as principais características a serem observadas na seleção de um suporte para imobilização são área superficial, insolubilidade, morfologia e composição, resistência mecânica, toxicidade, biodegradabilidade e custo (SOARES et al., 1999). Além disso, o suporte deve conter grupos reativos para promover a interação com enzima de maneira aleatória ou direcionada, promovendo interações secundárias com determinados resíduos da enzima (FIGURA 7) (MATEO et al., 2007b). Em adição, parâmetros como eficiência imobilização (E), retenção de atividade (R) e a perda de atividade enzimática durante o processo também são fatores que devem ser considerados (VILLENEUVE et al., 2000).

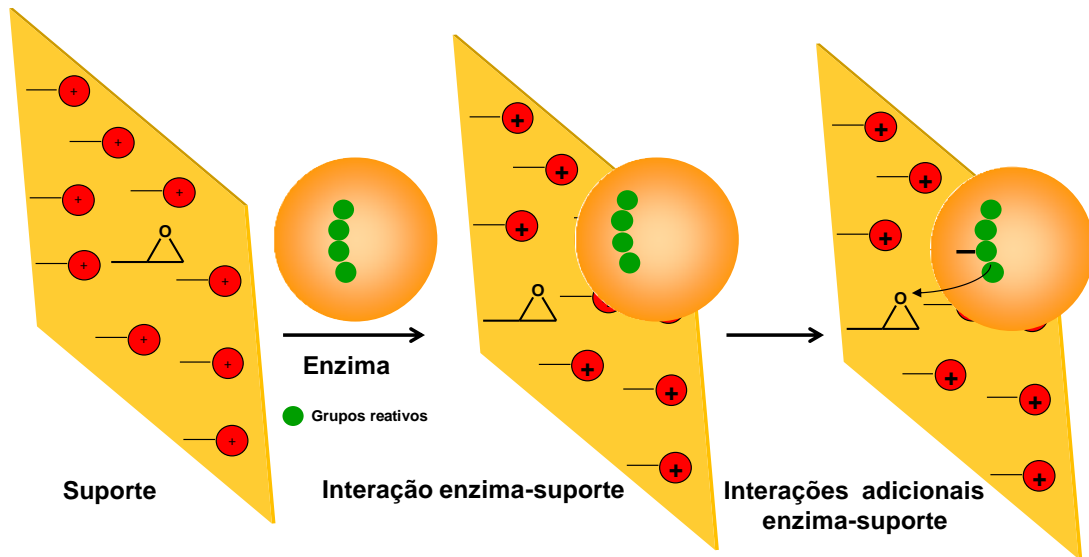


FIGURA 7 - EXEMPLO DE IMOBILIZAÇÃO COM UMA INTERAÇÃO ENZIMA-SUPORTE

Nesse exemplo, a enzima é imobilizada via adsorção através de cargas positivas presentes no suporte. Em uma segunda etapa, ligações covalentes pontuais ou multipontuais podem ser formadas entre grupos epóxi do suporte com diferentes grupos reativos da enzima, como por exemplo, grupos amino primários.

Fonte: O AUTOR (2017).

Os principais métodos de imobilização são apresentados na FIGURA 8 e podem ser classificados como: a) métodos químicos que envolvem a ligação da enzima em uma matriz por ligações covalentes ou ligações cruzadas entre a enzima e outros polímeros, como por exemplo, glutaraldeído; b) métodos físicos, que incluem a adsorção da enzima em uma matriz sólida por interações fracas (interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas ou iônicas), e a encapsulação da enzima em géis formados por matrizes poliméricas ou em micelas inversas (VILLENEUVE et al., 2000; MATEO et al., 2007c).

### 2.2.1 Imobilização de lipases

Dentre as estratégias de imobilização de lipases descritas na literatura, o método de adsorção é o mais utilizado, uma vez que não promove grandes modificações na conformação nativa da enzima e nem a perda da atividade catalítica quando comparado a outros métodos de imobilização (VILLENEUVE et al., 2000; MATEO et al., 2007c). Este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, por meio de interações hidrofóbicas. Essa interação é favorecida pela presença da *lid* e de resíduos hidrofóbicos em torno do sítio ativo da enzima. Assim,

lipases sofrem ativação interfacial na presença da interface hidrofóbica do suporte, sendo adsorvidas em sua superfície, mantendo a *lid* em sua conformação aberta (FIGURA 9) (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; PALOMO et al., 2002).

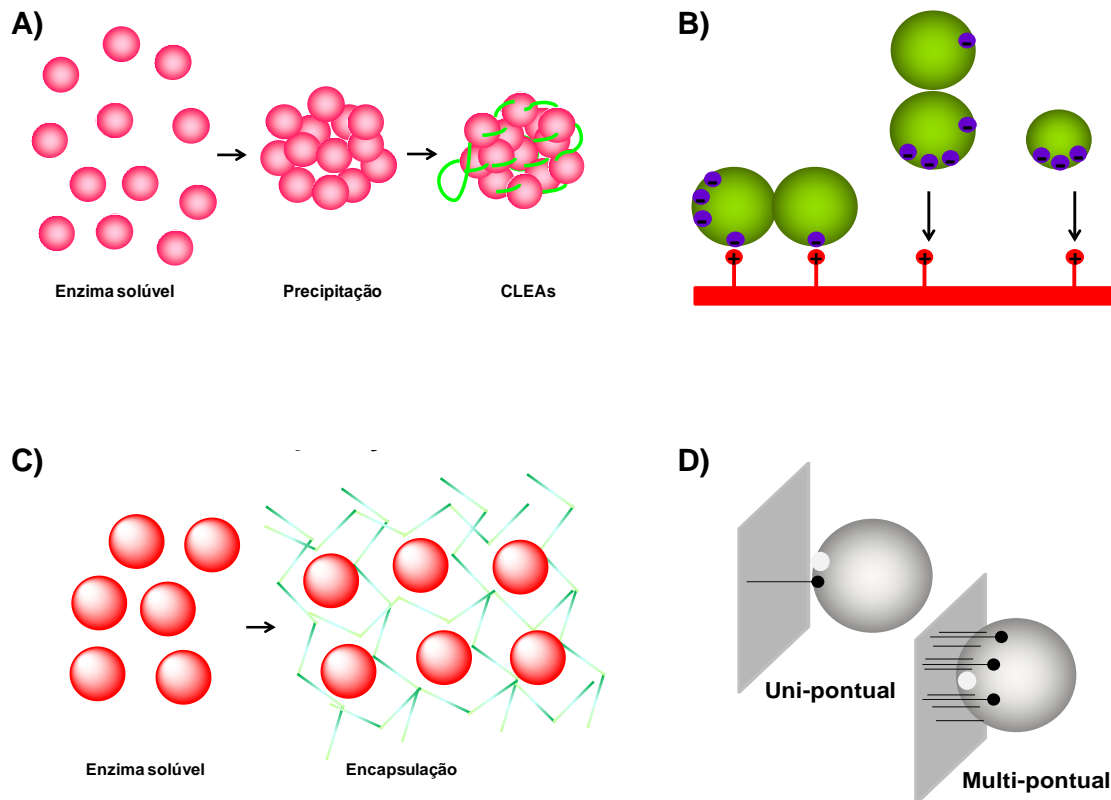


FIGURA 8 - PRINCIPAIS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

A) CLEAs: cross-linked enzyme aggregates; B) Adsorção física; C) Encapsulação e D) Ligação covalente.

Fonte: O AUTOR (2017).

A ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos, como por exemplo, em octadecil-sepabeads (PALOMO et al., 2002) ou octil-agarose (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998), é uma das estratégias mais utilizadas na literatura e permite a purificação, imobilização, hiperativação e estabilização da enzima em apenas uma etapa (BASTIDA et al., 1998; MATEO et al., 2007c; MANOEL et al., 2015; SUESCUN et al., 2015; RUEDA et al., 2016). Além disso, esse método apresenta vantagens significativas em relação à imobilização de lipases através de outras regiões, produzindo preparações imobilizadas mais ativas e seletivas (PALOMO, 2008; MARCIELLO et al., 2012), especialmente quando aplicadas em

reações complexas, como por exemplo, na resolução de misturas racêmicas (CABRERA; PALOMO, 2011), e na hidrólise regioseletiva de carboidratos (FILICE et al., 2012).

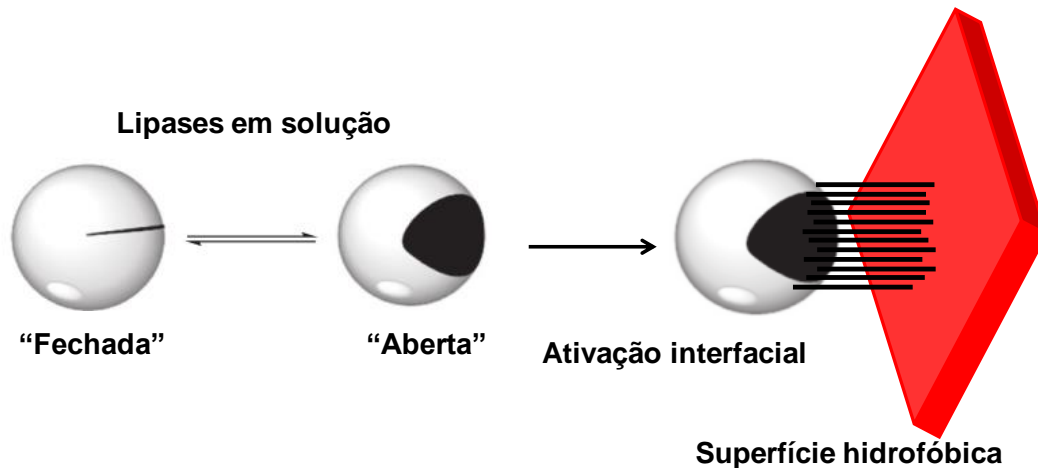


FIGURA 9 - IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES POR ADSORÇÃO FÍSICA EM SUPORTES HIDROFÓBICOS

Fonte: O AUTOR (2017).

Entretanto, apesar de ser uma estratégia muito utilizada, a adsorção de lipases em suportes hidrofóbicos pode ser reversível, uma vez que pode ocorrer a dessorção da enzima do suporte em meio aquoso, na presença de detergentes ou alguns aditivos no meio reacional (PALOMO, et al., 2002; MATEO et al., 2007c). Para contornar esse problema, algumas estratégias têm sido propostas, como por exemplo, o tratamento com polímeros (dextran, glutaraldeído) após a imobilização visando a formação de intercrossamentos entre a enzima e o suporte, prevenindo assim a dessorção (SHELDON et al., 2007; GARCIA-GALAN et al., 2011).

No que se refere às lipases utilizadas neste trabalho, LipBC foi imobilizada em diferentes suportes com características distintas no trabalho desenvolvido por Baron (2008). Dentre os suportes avaliados, o melhor suporte selecionado, considerando a eficiência de imobilização ( $E=100\%$ ) e a retenção de atividade em meio orgânico ( $R=193\%$ ) foi o polipropileno altamente poroso Accurel EP 100. Este suporte foi utilizado para o desenvolvimento de uma nova estratégia de imobilização chamada de SPIL (Simultânea Produção e Imobilização de Lipases), onde a lipase é produzida por fermentação submersa na qual é adicionado o suporte, sendo assim produzida e imobilizada no meio de fermentação, sem a necessidade de nenhuma

etapa de purificação da enzima e posterior imobilização (BARON et al., 2011). Excelentes resultados foram obtidos com a lipase LipBC imobilizada nesse suporte em reações de síntese, como já mencionado anteriormente (sessão 2.1.4).

Suportes do tipo Accurel não são comercializados para fins de imobilização de enzimas. A escolha desse suporte para imobilização de lipases se deve à sua alta porosidade e capacidade de ativação de lipases (ALMEIDA et al., 2008; KAEWTHONG et al., 2005). Apesar de ser poroso, sua capacidade de adsorção de proteínas é baixa quando comparada com outros suportes comerciais. Por exemplo, em relação aos trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa, a maior capacidade de adsorção foi obtida por Salum et al. (2008), imobilizando a lipase LipBC na razão de 30 mg de proteína por grama de suporte. Madalozzo et al. (2015) comparam a imobilização da lipase LipC12 nos suportes Accurel MP 1000 e Immobead 150. A carga máxima para o suporte Accurel foi de 25 mg g<sup>-1</sup> de suporte, enquanto que para o Immobead foi de 200 mg g<sup>-1</sup>. Suportes do tipo Immobead são polímeros acrílicos vendidos comercialmente pela empresa ChiralVision para a imobilização de enzimas, com capacidade de adsorver em média 500 mg de proteína. Este suporte apresenta uma alta densidade de grupos epóxi em sua superfície, capazes de promover a interação com a enzima via adsorção seguida de uma ligação covalente dependendo do protocolo de imobilização (MATEO et al., 2007a). Ótimos resultados foram obtidos com a lipase LipC12 imobilizada nesse suporte em diferentes reações (sessão 2.1.3).

Apesar resultados promissores apresentados na imobilização das lipases LipC12 e LipBC nos trabalhos anteriores, este trabalho teve como objetivo a síntese de novos suportes para a imobilização das lipases, visando obter diferentes preparações imobilizadas com propriedades diferenciadas, para aplicações em biocatálise.



## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral a produção, imobilização e caracterização das lipases LipC12 e LipBC visando futuras aplicações em biocatálise. Além disso, visou a síntese de novos e diferentes suportes para imobilização de lipases, assim como o desenvolvimento de novos protocolos imobilização.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 1ª Parte: Produção e purificação das enzimas

- Produzir e purificar a lipase LipC12 de acordo com protocolos já estabelecidos;
- Sequenciar o genoma da bactéria *Burkholderia contaminans* LTEB11 e identificar os genes *lipA* (lipase) e *lipB* (foldase);
- Amplificar, clonar e otimizar a expressão da lipase LipBC na forma ativa em um hospedeiro heterólogo;
- Purificar e realizar a caracterização bioquímica da lipase LipBC recombinante;

#### 2ª Parte: Estudos de imobilização

- Sintetizar e desenvolver novos suportes com diferentes grupos funcionais utilizando a matriz de agarose como modelo;
- Estabelecer e otimizar novos protocolos para a imobilização das lipases;
- Imobilizar as lipases LipC12 e LipBC nos novos suportes e selecionar os melhores derivados imobilizados;
- Caracterizar as lipases LipC12 e LipBC imobilizadas nos novos suportes;

#### 3ª Parte: Aplicação em biocatálise

- Aplicar a lipase LipC12 imobilizada na hidrólise regioseletiva de ésteres de açúcares;
- Aplicar a lipase LipBC imobilizada na síntese do éster oleato de etila.

### 3.3 ESTRATÉGIA DE AÇÃO

O presente trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto Sustentável (NPDEAS), no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos na Universidade Federal do Paraná, e no Instituto de Catálisis y Petroleoquímica em Madrid-Espanha, durante um estágio sanduíche de 12 meses, sob orientação do Dr. Cesar Mateo. O fluxograma da estratégia do trabalho está mostrado na Figura 10.

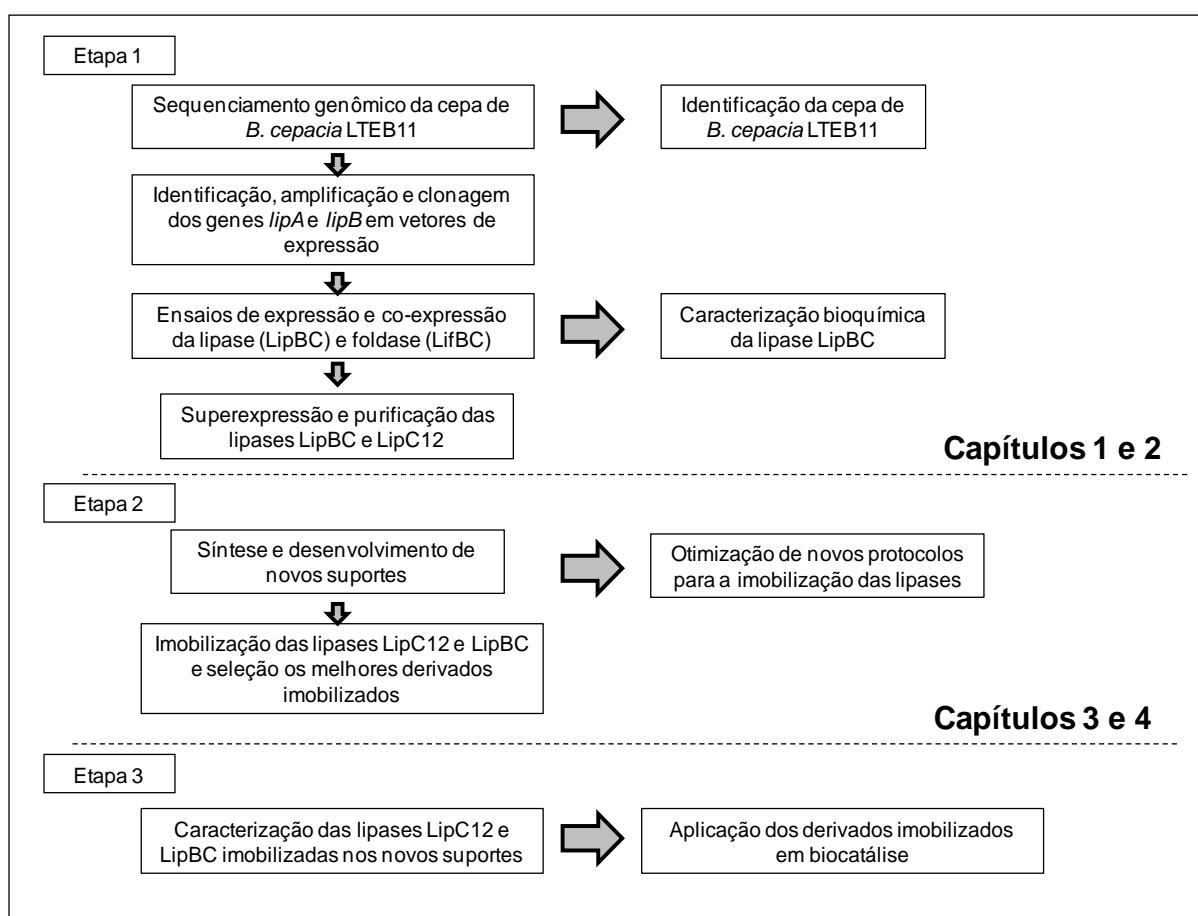


FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO

## 4. CAPÍTULO 1

### MANUSCRITO 1

#### **Genome sequencing of *Burkholderia contaminans* LTEB11 reveals the presence of a lipolytic arsenal with biotechnological potential**

Manuscrito a ser submetido para a revista *Journal of Biotechnology*. O manuscrito está formatado de acordo com as normas da revista para a seção *Short Genome Communications*.

## Genome sequencing of *Burkholderia contaminans* LTEB11 reveals the presence of a lipolytic arsenal with biotechnological potential

Robson Carlos Alnoch<sup>1</sup>, Rodrigo Luis Alves Cardoso<sup>1</sup>, Dieval Guizelini<sup>1</sup>, Eduardo Balsanelli<sup>1</sup>, Michelle Z Tadra-Sfeir<sup>1</sup>, Fábio de Oliveira Pedrosa<sup>1</sup>, David Alexander Mitchell<sup>1</sup>, Leonardo Magalhães Cruz<sup>1</sup>, Emanuel Maltempi de Souza<sup>1</sup>, Marcelo Muller-Santos<sup>1</sup> and Nadia Krieger<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19046 Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19081 Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil.

CORRESPONDING AUTHOR: Dr. Nadia Krieger. Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19081 Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil. Email: nkrieger@ufpr.br ; Telephone: +55-41-33613470

### *Abstract*

*Burkholderia contaminans* LTEB11 is a Gram-negative betaproteobacteria isolated in our laboratory as a spurious contamination from a fungi culture in mineral medium supplemented with vegetable oil. In order to get more information on the lipolytic machinery of *B. contaminans* LTEB11 and to understand general lines of its metabolism, the genome of this isolate was completely sequenced and analyzed.

**Keywords:** Lipase, rhamnolipid, *Burkholderia contaminans*, genome.

## ***Announcement***

The *Burkholderia* genus is widely distributed in the environment and many ecological niches (Coenye and Vandamme, 2003). The genus is divided in two well-established clusters: the non-pathogenic, which comprises beneficial plant symbionts, and the pathogenic, which comprises human opportunistic and plant pathogens (Coenye and Vandamme, 2003). The species *B. contaminans* was described in 2009 (Vanlaere et al., 2009) and received this name in reference to the contamination of a Sargasso Sea DNA sample (Mahenthiralingam et al., 2006). Currently, the species is classified inside of *Burkholderia cepacia* complex (BCC), a group of at least 18 different species that infect immunocompromised individuals, in particular those with cystic fibrosis (Deng et al., 2016; Vanlaere et al., 2009). These group include *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. lata*, *B. stabilis* and *B. ambifaria* (Vandamme and Dawyndt, 2011). In fact, besides their role in causing disease, *B. contaminans* and other BCC species have biotechnological applications, such as biocontrol or bioremediation agents (Parke and Gurian-Sherman, 2001), production of biosurfactants (Wattanaphon et al., 2008) and extracellular lipase (Oliveira et al., 2014; Yang et al., 2007).

*B. contaminans* LTEB11, early classified as *B. cepacia* LTEB11, produces an extracellular lipase (LipBC) with high stability and activity in organic media (Fernandes et al., 2007; Salum et al., 2008). Furthermore, LipBC was produced by submerged and solid-state fermentation, and was used in esterification and transesterification reactions, with application in biodiesel synthesis (Baron et al., 2014; Salum et al., 2010; Soares et al., 2013) and in the resolution of racemates (Moure et al., 2014). As the production and application of lipase LipBC have been extensively studied and showed promise, here we reported the genome sequence of *B. contaminans* LTEB11, identifying and analyzing the genes involved on its

lipolytic machinery.

Genomic DNA was isolated using phenol-chloroform extraction (Sambrook et al., 1989). The whole-genome sequencing was performed on two different platforms: MiSeq Illumina (2.698.078 reads/paired-end, 250 bp long) and Ion Proton System (5.661.193 reads, 125 bp long). The sequence data were *de novo* assembled using CLC Genomics Workbench 6.5.1 (Gnerre et al., 2011); Velvet 1.2.07 (Zerbino and Birney, 2008); Masurca 2.3.2 (Zimin et al., 2013) and the final assemble was optimized and finish using GFinisher (Guizelini et al., 2016). Coding sequences (CDS) and open reading frames (ORFs) were predicted using RAST server (Aziz et al., 2008) and our in-house SILA platform. Phylogenetic analysis was carried out with the neighbor-joining method and bootstrapping (1000 replicates) was used to estimate the confidence levels of phylogenetic reconstructions (Tamura et al., 2013).

The *B. contaminans* LTEB11 genome was assembled in 7 contigs that comprise three replicons of 3,548,326 bp (chromosome 1), 3,254,142 bp (chromosome 2) and 1,196,160 bp (chromosome 3) (Table 1). The estimated genome size is 7.9 Mb with a 66.3% GC content. The size of genome is in agreement with that described to the *Burkholderia* genus, which may vary from 7.4 to 9.7 Mb (Ussery et al., 2009).

In total 7553 protein coding genes were predicted (Table 1), including *lipAB* operon coding for the lipase (*lipA*) and the lipase-specific foldase (*lipB*) in the chromosome 2 and genes of the protein secretion system type II (T2SS), which are required for the secretion of lipases (Rosenau et al., 2004). In addition, we predicted other operon in the chromosome 1 coding for lipase (*lipE*) and foldase (*lipF*) with 65% and 53% of identity with *lipAB* operon, respectively,

and more two genes (*lipC* and *lipD*) coding for putative lipases with 23% and 25% of identity with *lipA*.

Table 1. Genome features of *Burkholderia contaminans* LTEB11

Features	Chromosome 1	Chromosome 2	Chromosome 3	Total
Size	3,548,326 bp	3,254,142 bp	1,196,160 bp	7,998,628 bp
Contigs	4	2	1	7
Protein-coding genes	3366	3074	1113	7553
tRNAs	56	6	3	65
G + C content	66.7%	66.6%	65.8%	66.3%

Preliminary comparative analysis showed that genes *lipC* and *lipD* are also present in genome sequences of other *B. contaminans* isolates (FFH2055; LMG 23361 and SAR-1 environmental) and *B. lata* 383. However, in these genome sequences the operon *lipEF* described here was not identified. Phylogenetic analysis classified *lipA* and *lipE* in the family I.2 of bacterial lipases, besides *B. glumae* (GB: X70354), *B. lata* (GB: WP011355767) and *P. luteola* (GB: AAC05510). Intriguingly, *lipC* and *lipD* were classified in the family II, besides *P. aeruginosa* (GB: AF005091), *S. typhimurium* (GB: AF047014) and *A. hydrophila* (GB:ABK35918).

The *B. contaminans* genome also contains the *pha* gene cluster (*phaZ*, *phaC*, *phaA*, *phaB* and *phaR*) for the biosynthesis of biodegradable polymers (polyhydroxyalkanoates) (Urtuvia et al., 2014) and the genes for the synthesis of rhamnolipids (*rhlA*, *rhlB* and *rhlC*), an important class of biosurfactants of special interest for cosmetic, pharmaceutical and detergent

manufacturers (Rahim et al., 2001; Camilios Neto et al., 2008)). Therefore, the genome sequence reported here can be the basis for further studies involving different lipases and their regulatory mechanisms and the production of different products with biotechnological relevance.

### **Nucleotide sequence accession numbers**

The bacterial strain *B. contaminans* LTEB11 is deposited as strain CPQBA 515-12 at the Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA/UNICAMP, SP - Brazil. This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession MLFG00000000. The version described in this paper is version MLFG01000000.

### **Acknowledgments**

This genome sequencing project was supported by the Brazilian Program of National Institutes of Science and Technology-INCT/Brazilian Research Council-CNPq/MCT, a grant to the INCT of Biological Nitrogen Fixation.

### **References**

- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O., 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9, 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75
- Baron, A.M., Barouh, N., Barea, B., Villeneuve, P., Mitchell, D.A., Krieger, N., 2014. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. *Fuel* 117, Part,



- 458–462. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.065>
- Camilios Neto, D., Meira, J.A., De Araujo, J.M., Mitchell, D.A., Krieger, N., 2008. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 441–448. doi:10.1007/s00253-008-1663-3
- Coenye, T., Vandamme, P., 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* 5, 719–729. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x
- Deng, P., Wang, X., Baird, S.M., Showmaker, K.C., Smith, L., Peterson, D.G., Lu, S., 2016. Comparative genome-wide analysis reveals that *Burkholderia contaminans* MS14 possesses multiple antimicrobial biosynthesis genes but not major genetic loci required for pathogenesis. *Microbiologyopen* n/a-n/a. doi:10.1002/mbo3.333
- Fernandes, M.L.M., Saad, E.B., Meira, J.A., Ramos, L.P., Mitchell, D.A., Krieger, N., 2007. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 44, 8–13. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.08.004>
- Gnerre, S., Maccallum, I., Przybylski, D., Ribeiro, F.J., Burton, J.N., Walker, B.J., Sharpe, T., Hall, G., Shea, T.P., Sykes, S., Berlin, A.M., Aird, D., Costello, M., Daza, R., Williams, L., Nicol, R., Gnirke, A., Nusbaum, C., Lander, E.S., Jaffe, D.B., 2011. High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data. *Proc Nat Acad Sci USA* 108. doi:10.1073/pnas.1017351108
- Guizelini, D., Raittz, R.T., Cruz, L.M., Souza, E.M., Steffens, M.B.R., Pedrosa, F.O., 2016. GFinisher: a new strategy to refine and finish bacterial genome assemblies. *Sci. Rep.* 6, 34963. doi:10.1038/srep34963
- Mahenthalingam, E., Baldwin, A., Drevinek, P., Vanlaere, E., Vandamme, P., LiPuma, J.J., Dowson, C.G., 2006. Multilocus Sequence Typing Breathes Life into a Microbial Metagenome. *PLoS One* 1, e17. doi:10.1371/journal.pone.0000017
- Moure, V.R., Fabrício, C., Frensch, G., Marques, F.A., Mitchell, D.A., Krieger, N., 2013. Enhancing the enantioselectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 towards the resolution of secondary allylic alcohols. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbab.2013.09.011>
- Oliveira, B.H., Santos, R., Loiola, L.E.A., Nascimento, V.M.G., 2014. Overproduction and properties of lipase by a wild strain of *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 using chicken fat. *Ann. Microbiol.* 65, 865–877. doi:10.1007/s13213-014-0928-6
- Parke, J.L., Gurian-Sherman, D., 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 225–258. doi:10.1146/annurev.phyto.39.1.225
- Rahim, R., Ochsner, U.A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J.S., Soberón-Chávez, G., 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40, 708–718. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02420.x
- Rosenau, F., Tommassen, J., Jaeger, K.-E., 2004. Lipase-Specific Foldases. *ChemBiochem* 5, 152–161. doi:10.1002/cbic.200300761
- Salum, T.F.C., Baron, a. M., Zago, E., Turra, V., Baratti, J., Mitchell, D. a., Krieger, N.,

2008. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. *Biocatal. Biotransformation* 26, 197–203. doi:10.1080/10242420701568674
- Salum, T.F.C., Villeneuve, P., Barea, B., Yamamoto, C.I., Cocco, L.C., Mitchell, D.A., Krieger, N., 2010. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochem.* 45, 1348–1354. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.004
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F., Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ed. ed.
- Soares, D., Pinto, A.F., Gonçalves, A.G., Mitchell, D.A., Krieger, N., 2013. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochem. Eng. J.* 81, 15–23. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.09.017
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Urtuvia, V., Villegas, P., Gonzalez, M., Seeger, M., 2014. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *Int. J. Biol. Macromol.* 70, 208–213. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001
- Ussery, D.W., Kiil, K., Lagesen, K., Sicheritz-Pontan, T., Bohlin, J., Wassenaar, T.M., 2009. The genus *Burkholderia*: Analysis of 56 genomic sequences. *Genome Dyn.* 6, 140–157. doi:10.1159/000235768
- Vandamme, P., Dawyndt, P., 2011. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol* 34, 87–95. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.002
- Vanlaere, E., Baldwin, A., Gevers, D., Henry, D., De Brandt, E., LiPuma, J.J., Mahenthalingam, E., Speert, D.P., Dowson, C., Vandamme, P., 2009. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 102–111. doi:doi:10.1099/ijs.0.001123-0
- Wattanaphon, H.T., Kerdsin, A., Thammacharoen, C., Sangvanich, P., Vangnai, A.S., 2008. A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. *J. Appl. Microbiol.* 105, 416–423. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03755.x
- Yang, J., Guo, D., Yan, Y., 2007. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 45, 91–96. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.12.007
- Zerbino, D.R., Birney, E., 2008. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821–829. doi:10.1101/gr.074492.107
- Zimin, A. V., Marçais, G., Puiu, D., Roberts, M., Salzberg, S.L., Yorke, J.A., 2013. The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics* 29, 2669–2677. doi:10.1093/bioinformatics/btt476

## 5. CAPÍTULO 2

### MANUSCRITO 2

#### **Co-expression, purification and characterization of the lipase and foldase of *Burkholderia contaminans* LTEB11**

Manuscrito a ser submetido para a revista *Applied Microbiology and Biotechnology*. O manuscrito está formatado de acordo com as normas da revista para a seção *Full papers*.

## Co-expression, purification and characterization of the lipase and foldase of *Burkholderia contaminans* LTEB11

Robson Carlos Alnoch<sup>1,2</sup>, Jeferson Luiz Richter<sup>1</sup>, Adriano Alvez Stefanello<sup>1</sup>; Viviane de Paula Martini<sup>3</sup>, Cesar Mateo<sup>2</sup>, David Alexander Mitchell<sup>1</sup>, Marcelo Muller-Santos<sup>1</sup> and Nadia Krieger<sup>4\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19046 Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC), Marie Curie 2. Cantoblanco, Campus UAM, 28049 Madri, Espanha.

<sup>3</sup> Instituto Federal do Paraná, Campus Irati, 84500-000, Irati, Paraná, Brazil.

<sup>4</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19081 Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil.

CORRESPONDING AUTHOR: Dr. Nadia Krieger. Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19081 Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil. Email: nkrieger@ufpr.br ; Telephone: +55-41-33613470

### Abstract

Genes encoding lipase LipBC (*lipA*) and foldase LifBC (*lipB*) were identified in genome of *Burkholderia contaminans* LTEB11, a bacterium isolated from a mineral medium supplemented with vegetable oil. Analysis of amino acid sequence of *lipA* showed high identity with lipases from *Pseudomonas luteola* (91%), *Burkholderia cepacia* (96%) and *Burkholderia lata* (97%), and classified LipBC lipase in the lipase subfamily I.2. The genes *lipA* and *lipB* were amplified and cloned into expression vectors pET28a(+) and pT7-7, respectively. LipBC and LifBC proteins were co-expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), and purified by affinity chromatography. LipBC and LifBC have molecular weights corresponding to 33 kDa and 37 kDa, respectively, and remain complexed after purification.

The biochemical and kinetic characteristics of the purified lipase-foldase preparation were investigated. This preparation was active and stable over a wide range of pH values (6.5 - 10) and temperatures (25 - 45°C), with the highest specific activity, of 1426 U mg<sup>-1</sup>, being obtained against tributyrin. It also had high specific activities (> 700 U mg<sup>-1</sup>) against natural triacylglycerols (triolein and commercial oils from olive, corn, canola and sunflower). The complex Lip-LifBC was immobilized on Sepabeads and 90% of efficiency of immobilization was obtained in 1 h. The immobilized preparation was able to catalyze the synthesis of ethyl-oleate in *n*-hexane with an activity of 4 U g<sup>-1</sup>, maintaining high conversions (> 80%) over 5 reaction cycles of 6 h at 45 °C. The results obtained in this work provide the basis for the development of applications of recombinant LipBC in biocatalysis.

**Keywords:** Lipase, foldase, *Burkholderia contaminans*, co-expression *in vivo*, biocatalysis.

### ***Introduction***

Bacterial lipases, especially from species of *Burkholderia* and *Pseudomonas*, have been extensively studied and used commercially, due to high activity and stability in organic solvents (Gupta et al. 2004; Liu et al. 2010). For the last 15 years, we have been working with LipBC. This lipase is produced by a strain of *Burkholderia* that was isolated in our laboratory and originally classified as *B. cepacia* LTEB11, but was recently reclassified as *B. contaminans* LTEB11 based on genomic analysis (Alnoch et al., unpublished data). We produced LipBC in submerged fermentation and used it to catalyze the synthesis of ethyl-oleate in *n*-heptene (Salum et al. 2008; Baron et al. 2011; Soares et al. 2013), the transesterification of castor oil in a solvent-free medium (Baron et al. 2014), and the kinetic resolution of racemates of secondary allylic alcohols (Moure et al. 2014). We have also

produced LipBC in solid-state fermentation and the dried -fermented solid containing LipBC naturally immobilized was used it in the esterification of free fatty acids, in the transesterification of vegetable oils (Salum et al. 2010; Soares et al. 2013) and in the synthesis of sugar esters (Villalobos, 2016).

The good stability and activity of LipBC in organic solvents motivated us to overexpress it in a heterologous host, given that many *Burkholderia* strains are opportunistic pathogens and therefore require special safety regulations for their cultivation at large scale. Nevertheless, the overexpression of a functional lipase can be difficult, particularly when a lipase-specific foldase (chaperone) is required (Rosenau et al. 2004), which is the case of the lipases of the subfamilies I.1 and I.2 (Rosenau and Jaeger 2000; Rosenau et al. 2004), such as *Burkholderia* species. The foldase gene (*lipB*) is encoded in the same operon as the structural gene of lipase (*lipA*) and has been described as a limiting factor for functional expression in heterologous hosts (Hobson et al. 1993; Aamand et al. 1994).

Strategies involving *in vitro* and *in vivo* folding can be used for the functional expression in heterologous hosts of lipases that require foldases. In the case of *in vitro* folding, the lipase and the foldase are produced and purified separately; folding occurs *in vitro*, yielding a fully active lipase (Hobson et al. 1993; Quyen et al. 1999; Traub et al. 2001). In the case of *in vivo* folding, the lipase and the foldase are co-expressed in the same heterologous host using a two-plasmid system and folding also occurs *in vivo* (Madan and Mishra 2010; Martini et al. 2014). The *in vivo* refolding strategy is simpler, with active enzyme obtained simultaneously with its expression.

In this work, we obtained a functional lipase of *Burkholderia contaminans* LTEB11 using the *in vivo* refolding strategy. The co-expression of both LipBC and its specific foldase (LifBC) in *E. coli* resulted in *in vivo* expression of the active lipase. The recombinant lipase (rLipBC) was purified and characterized.

## ***Materials and Methods***

### *Strains, plasmids and materials*

*Burkholderia contaminans* LTEB11 was identified previously (Alnoch et al., unpublished data) and it is deposited as strain CPQBA 515-12 at the Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA/UNICAMP, São Paulo State, Brasil. The expression system involved the strains *E. coli* TOP10 (Invitrogen, CA, USA) and BL21(DE3) (Novagen, MI, USA) and the vectors pTZ-18R (Amersham Pharmacia, NJ, USA) pET-28a(+) (Novagen, MI, USA) and pT7-7 (Addgene, MA, USA). Restriction enzymes, T4 DNA ligase, shrimp alkaline phosphatase (SAP) and the protein molecular mass marker were purchased from Thermo Fisher Scientific (MA, USA).

The HiTrap Chelating HP column was purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Triolein (65%) and tributyrin (99%) were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA). The natural oils (olive, corn, canola, rice, sunflower, linseed, castor and soybean) for lipase activity determination were purchased from a local supermarket. Sepabeads FP-BU (Milan, Italy) was used in the immobilization assays. All other chemicals used for lipase analysis were of analytical grade.

### *Extraction of genomic DNA*

Chromosomal DNA of *B. contaminans* LTEB11 was obtained from cells grown in Luria Bertani (LB) medium at 120 rpm at 30 °C for 24 h and DNA was purified using phenol-chloroform extraction (Sambrook et al. 1989).

### *Amplification and cloning of lipA and lipB genes*

PCR primers for the amplification of *lipA* and *lipB* were designed on the basis of the genome sequence, using the TMHMM v.2.0 (Krogh et al. 2001) and SignalP 3.0 (Dyrlov Bendtsen et al. 2004) servers, and synthesized by Molecular Biotechnologies (Belo Horizonte, MG, Brazil). PCR reactions for the amplification of *lipA* were performed with an initial denaturation at 98 °C 90 s, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 20 s, 72 °C for 40 s, and a final extension at 72 °C for 5 min, using the mix Phusion high-fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, UK). The entire and the N-truncated fragments of *lipA*, with 1117 and 997 bp, respectively, were digested for 4 h at 37 °C with NheI and HindIII. The fragments were purified with an Axygen Gel Extraction Kit (Biosciences) and cloned into the pET28a(+) vector.

To obtain the foldase gene (*lipB*), the sequence was optimized and synthesized by GenScript (NJ, USA), since the native gene contains tandem rare codons that could reduce the efficiency of translation or cause the translational machinery to disengage. Furthermore, the GC content was optimized in order to prolong the half-life of the mRNA and prevent the formation of stem-loop structures. The N-truncated fragment (834 bp) was obtained from the optimized



entire *lipB* (1044 pb) and both were digested with NdeI and BamHI and cloned into the pT7-7 vector.

Insertions in the resulting plasmids (pET28a(+)/*lipA-entire*, pET28a(+)/*lipA-N-truncated* pT7-7/*lipB-entire* and pT7-7/*lipB-N-truncated*) were verified by sequencing in both directions using the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit and 3500XL DNA sequencing system (Applied Biosystems), in accordance with the instructions of the manufacturer. The vectors were then introduced, through thermal shock, into competent *E. coli* BL21(DE3) cells to express the recombinant LipBC.

#### *Expression and co-expression assays*

Tests for expression of the constructs in *E. coli* BL21(DE3) were carried out (Table 1). The cells were collected and then transferred to 50 mL of Luria Bertani (LB) medium, with either 100 mg mL<sup>-1</sup> kanamycin or 50 mg mL<sup>-1</sup> ampicillin. After the culture reached an OD<sub>600</sub> of 0.5, isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) was added to give a concentration of 0.2 mmol L<sup>-1</sup> and the culture was continued for another 16 h at 20 °C before harvesting of the cells by centrifugation (4.700 × g for 30 min) at 4 °C. The supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended in 7 mL of a buffer containing 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 2 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Triton X-100 and 150 mmol L<sup>-1</sup> NaCl. The cells were sonicated in an ice bath ten times for 20 s with intervals of 20 s. The expression of the enzyme was confirmed both by 12% (w/v) SDS-PAGE (Laemmli 1970) and by activity assays, done using the titrimetric method with triolein as the substrate in a pH-Stat (Stuer et al. 1986).

### *Overexpression and purification of recombinant rLipBC*

*E. coli* BL21(DE3) cells carrying the pET28a(+)/*lipA-N-truncated* and pT7-7/*lipB-entire* plasmids were grown in 500 mL of LB medium at 37 °C until an OD<sub>600</sub> of 0.5 and induced by the addition of (IPTG) to a final concentration of 0.5 mM. The induced culture was incubated for a further 16 h at 20 °C before harvesting of the cells by centrifugation (10.000 rpm for 30 min) at 4 °C. The cell pellet was resuspended in 30 mL of lysis buffer (50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 7.5, 500 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, 20 mmol L<sup>-1</sup> imidazole, 10 mmol L<sup>-1</sup> β-mercaptoethanol, 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) glycerol) and disrupted by ultrasonication in an ice bath (15 cycles of 20-s pulses, 90 W, with 30-s intervals), using a SONICATOR® XL 2020 (Heat systems-Ultrasonics Inc.,NY, USA). The crude extract was then centrifuged at 15.000 rpm for 30 min at 4 °C to pellet the cell debris. The supernatant containing the His-tagged protein was loaded onto a HiTrap Chelating HP column previously loaded with Ni<sup>2+</sup> and equilibrated with lysis buffer, using an ÄKTAbasic chromatography system (GE Healthcare, USA). Protein fractions were analyzed by SDS-PAGE, pooled, dialyzed (50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 20% (v/v) glycerol) and stored at 4 °C until use.

### *Protein content determination, electrophoresis and zymogram analyses*

Protein content was determined by method of Smith et al. (1985) using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) with bovine serum albumin as the standard. Electrophoresis of protein samples was done with 12% (w/v) SDS-PAGE (Laemmli 1970) and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained with methanol/acetic-acid/water (5/1/4 v/v/v). Tricine-SDS-PAGE was performed according

to Schagger et al. (2006). For zymogram, lipolytic activity of bands on the SDS-PAGE gel was detected using tributyrin as the substrate (Oh et al. 1999).

#### *Sequence analysis and phylogenetic tree construction*

Multiple sequence alignment was performed with the ClustalW algorithm (Thompson et al. 1994) and phylogenetic analysis was carried out with the neighbor-joining method using MEGA version 6.0. Bootstrapping (1000 replicates) was used to estimate the confidence levels of phylogenetic reconstructions (Tamura et al. 2013). T-Coffee software (Notredame et al. 2000) was used to align the lipase sequence against the ones from the Protein Data Bank (PDB) templates (Berman et al. 2000). Software DSSP (Kabsch and Sander 1983) and Aline (Bond and Schuttelkopf 2009) were used to estimate and to show the predicted secondary structure.

#### *Structural homology modeling*

The model building was carried out using MODELLER software (Eswar et al. 2006). Suitable experimental structural homologues to use as templates were chosen using the MHOLline algorithm (Capriles et al. 2010) and acquired from PDB. The templates were structurally superposed with the MULTIPROT (Shatsky et al. 2002) and then used to perform sequential alignments with T-Coffee (Notredame et al. 2000). Five hundred models were generated and further optimized by means of the variable target function method (VTFM) available within MODELLER. The quality of the models was assessed by the programs PROCHECK (Laskowski et al. 1993) and MODELLER with the embedded normalized DOPE (Shen and Sali 2006) and GA3415 scores (Melo et al. 2002).

### *Lipase activity assay*

The hydrolysis activity of rLipBC was determined by titration using an automatic titrator pHStat (Metrohm 718 Stat Titrino) (Stuer et al. 1986). The substrate emulsions consisted of 67 mmol L<sup>-1</sup> triacylglycerol, 3% (w/v) gum arabic, 2 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0 and 150 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, dispersed in distilled water (Tiss et al. 2001). The enzyme was added to 20 mL of the emulsion under magnetic stirring (300 rpm) at 37 °C and the reaction was followed for 5 min. One unit of hydrolytic activity in aqueous medium corresponds to the release of 1 μmol of fatty acid per minute, under the assay conditions.

In the immobilization assays (section 2.11), the hydrolysis activity was determined using *p*-nitrophenyl propionate as the substrate. Soluble or immobilized rLipBC was added to 2.5 mL of a solution containing 0.4 mmol L<sup>-1</sup> substrate and 25 mmol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.0), under continuous magnetic stirring. The release of *p*-nitrophenol was monitored at 348 nm and the coefficient of extinction of (*p*NP) utilized was  $\epsilon = 5.15 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . One unit of activity (U) was defined as the production of 1 μmol of *p*-nitrophenol per minute, under the conditions of the assay.

### *Characterization of lipase activity and stability*

The activity of rLipBC was determined against natural triacylglycerols (triolein, tributyrin and commercial oils from olive, corn, canola, sunflower, castor, rice, linseed and soybean). The emulsions were prepared with the corresponding triacylglycerols and the assays were performed as described above.

The effect of temperature on the activity of rLipBC was determined over the temperature range of 25 to 65 °C. To determine the thermostability, rLipBC was incubated at different temperatures from 25 –65 °C for 1:5 h in 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris–HCl buffer, pH 8.0.

The effect of pH on the activity of rLipBC was determined over the pH range of 5.0 to 11.0, at 37 °C. To determine the pH stability, rLipBC was incubated for 1.5 h at 30 °C in the buffers citrate (pH 4.0 to 6.0), phosphate (pH 6.0 to 8.0) and glycine-NaOH (pH 8.0 to 11.0) at 50 mmol L<sup>-1</sup>. The residual activities were calculated in relation to controls that were treated identically, but without incubation.

#### *Immobilization of rLipBC*

Recombinant LipBC was immobilized by physical adsorption onto hydrophobic support Sepabeads FP-BU. The support was wetted with acetone solution (50% (v/v) in water) for 30 min, then washed with distilled water and filtered. To the assay, 1 g of the support suspended in 4 mL of enzyme solution (protein loading of 5 mg g<sup>-1</sup> of support) were added in 10-mL flask. The flask was incubated in an orbital shaker at 80 rpm and 25°C. Aliquots of the supernatant were removed over time and assayed for lipase activity by using the *pNPP* method. Finally, the immobilized enzyme was removed from the mixture by filtration, dried in a vacuum desiccator for 16 h and stored at 4°C.

The immobilization efficiency (IE, %) was calculated as:

$$EI = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100\%$$

where  $A_i$  is the hydrolytic activity (U) of the enzyme solution before immobilization and  $A_f$  is the hydrolytic activity (U) remaining in the supernatant at the end of the immobilization procedure.

The recovered activity (R, %) was calculated as:

$$R = \frac{A_o}{A_T} \times 100\%$$

where  $A_o$  is the observed hydrolytic activity the immobilized preparation (U g<sup>-1</sup> of support) and  $A_T$  is the theoretical activity of the immobilized preparation (U g<sup>-1</sup> of support), calculated based on the amount of activity removed from the supernatant during the immobilization procedure.

#### *Application of rLipBC immobilized in ethyl-oleate synthesis*

Ethyl-oleate synthesis was done in 7-mL flasks, using 3 mL of reaction medium containing *n*-hexane, ethanol (210 mmol L<sup>-1</sup>) and oleic acid (70 mmol L<sup>-1</sup>). The flasks were placed in an orbital shaker at 45 °C and 180 rpm. The reaction was started with the addition of 150 mg of the immobilized preparation. At each sampling time, a 100 μL sample of the mixture was collected and analyzed for free fatty acids by the Lowry–Tinsley method (Lowry and Tinsley 1976). The reutilization of immobilized rLipBC was studied using the same reaction conditions as described above. After each reaction, the contents of flasks were filtered through Whatman no. 1 filter paper. The filtrate was kept for analysis of the conversion, while the immobilized preparation retained was washed thrice with *n*-hexane and dried in a desiccator at 4 °C for 16 h. Percentage conversions of fatty acids were determined for each cycle.

## **Results**

### *Cloning, co-expression and purification of recombinant lipase (rLipBC)*

In previous work, the genome sequence of *B. contaminans* LTEB11 was determined and the *lipAB* operon coding for the lipase (*lipA*) and the lipase-specific foldase (*lipB*) was identified (Alnoch et al., unpublished data). Analysis of *lipA* with SignalP identified a putative signal sequence with a cleavage site between the 40th and 41st amino acid residues of the amino-terminal region of LipA. Analysis of *lipB* with SignalP identified a putative transmembrane helix (residues 7 to 30) and a hydrophobic stretch (residues 41 to 70) in the amino-terminal region of LipB. This region (residues 1 to 70) is a flexible spacer allowing the protrusion of the foldase from the inner membrane (Pauwels et al., 2006). Primers were designed for *lipA* and *lipB*, both for the entire gene and the gene truncated in N-terminal region of coded protein, corresponding to 40 and 70 amino acids, respectively. The genes were amplified and cloned, resulting in different constructs in *E. coli* BL21(DE3) (Table 1).

Lipolytic activity was detected in the crude extract only when LipBc and LifBc were co-expressed. All co-expressed combinations of entire and N-truncated proteins were active, with activities against olive oil from 7 to 127 U mL<sup>-1</sup> (Table 1). Construct VII (lipase N-truncated and foldase entire) was selected for the overexpression and purification. The complexed lipase and foldase were co-eluted from the HiTrap affinity column and protein bands corresponding to the molecular masses of LipBC (33 kDa) and its foldase LifBC (37 kDa) were observed after SDS-PAGE (Figure 1A-C). The zymogram showed a clear band in the 66 kDa region (Figure 1D), showing that the purified enzyme was active and that the foldase must have been

complexed to the lipase that bound to column, since that only the lipase had a His-tag (Figure 1C). The eluted fractions were pooled and dialyzed in buffer containing 20% (v/v) glycerol.

**Table 1. Expression and co-expression assays and lipase activity of the different constructs.**

Construct	Vectors	Lipase (rLipBc)	Foldase (LifBC)	Activity U mL <sup>-1</sup>
I	pET28a(+)	Entire	-	-
II	pET28a(+)	N-truncated	-	-
III	pT7-7	-	Entire	-
IV	pT7-7	-	N-truncated	-
V	pET28a(+) and pT7-7	Entire	Entire	12 ± 2
VI	pET28a(+) and pT7-7	Entire	N-truncated	7 ± 1
VII	pET28a(+) and pT7-7	N-truncated	Entire	127 ± 11
VIII	pET28a(+) and pT7-7	N-truncated	N-truncated	73 ± 9

The activity was determined with olive oil as the substrate, by the titrimetric method using a pHStat, at pH 8.0 and 37 °C. Results are expressed as the average of triplicates assays ± the standard error of the mean

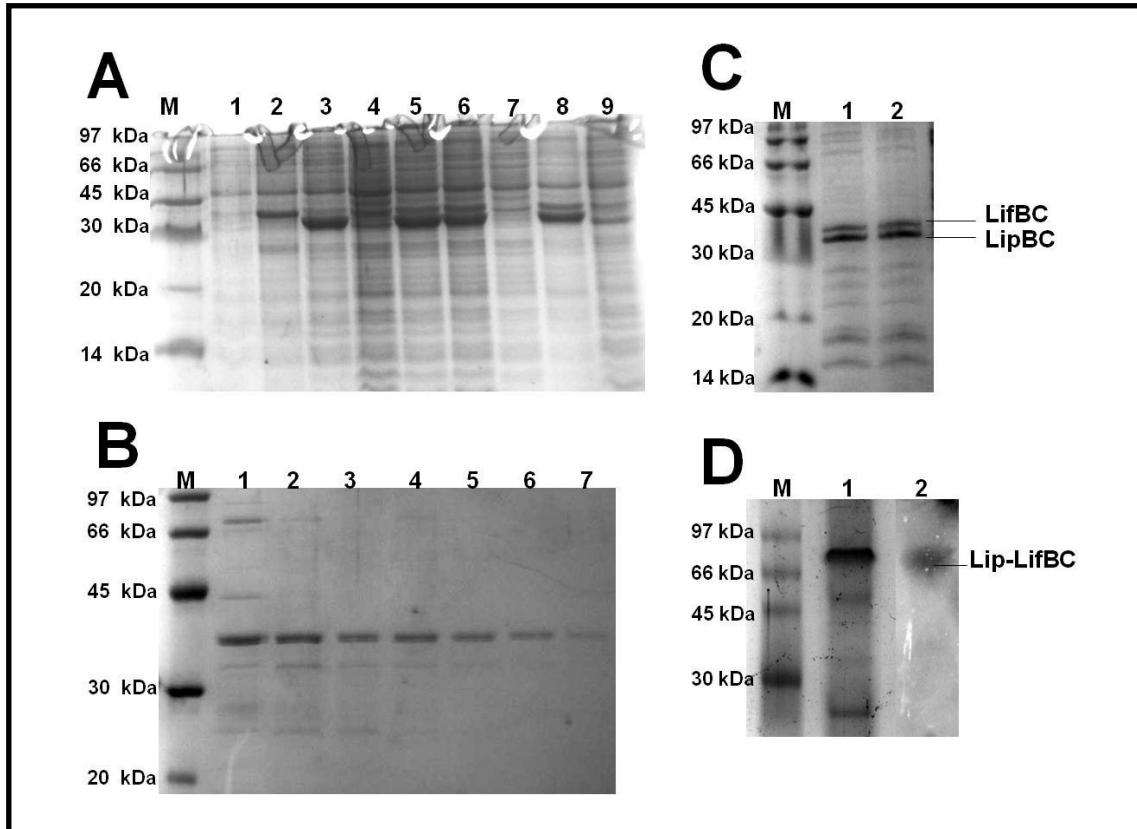
The purified complex Lip-LifBC was used for the characterization of the enzyme and is hereafter denominated simply as rLipBC.

#### *Protein sequence analysis and structural homology modeling*

Phylogenetic analysis classified LipBC lipase in the lipase subfamily I.2 (Figure 2), beside the lipases from *Pseudomonas luteola* [GenBank:AAC05510], *Burkholderia cepacia* [GenBank:M58494] and *Burkholderia lata* [GenBank:WP011355767]. Analysis of sequences showed high identities (91%, 96% and 97%, respectively) with these lipases. Among the lipases that have known 3D structure, LipBC possesses 95%, 84% and 41% identity with the



lipases of *B. cepacia* [PDB:1YS1], *B. glumae* [PDB:1QGE] and *P. aeruginosa* [PDB:1EX9], respectively.



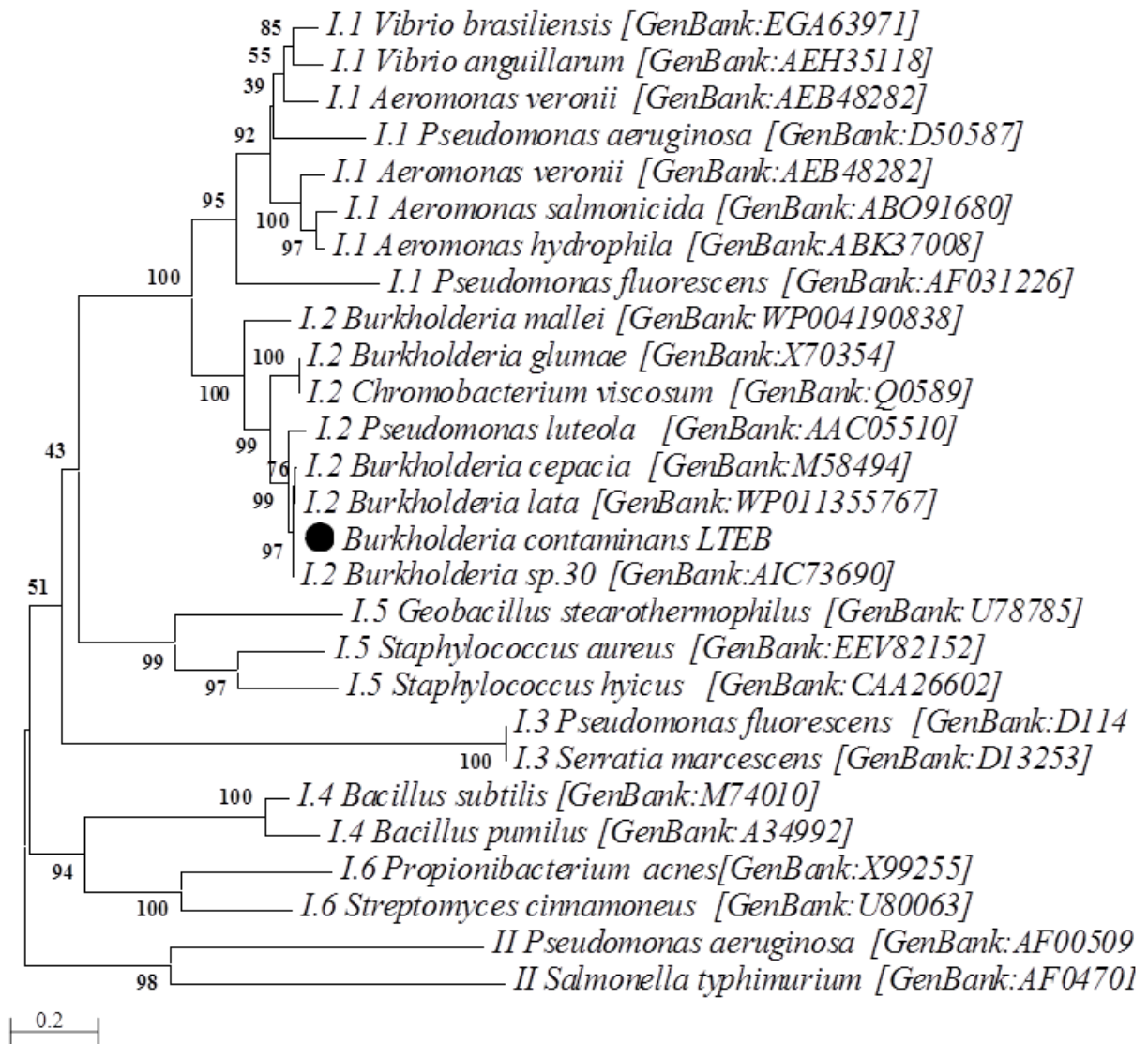
**Figure 1. Expression and purification of lipase and foldase of *Burkholderia contaminans* LTEB11.**

**A)** Tricine SDS-PAGE of expression and co-expression assays of lipase and foldase. Lane M: protein molecular weight standards; lane 1: crude cell extract control (*E. coli* BL21(DE3)); lane 2: expression foldase LifBC entire (construct III); lane 3: expression lipase rLipBc N-truncated (construct II); lanes 5, 6 and 8: co-expression of rLipBC N-truncated and f LifBC entire (construct VII).

**B)** SDS-PAGE fractions eluted from the nickel column. Lane M: protein molecular weight standards; lanes 1-7 : eluted fractions of the Lip-LifBc complex.

**C)** Tricine SDS-PAGE of eluted fractions from the nickel column. Lane M: protein molecular weight standards; lanes 1 and 2: eluted fractions containing rLipBc lipase (33 kDa) and rLifBC foldase (37 kDa).

**D)** Native SDS-PAGE and zymogram of the Lip-LifBC complex. Lane M: protein molecular weight standards; lane 1: Lip-LifBc complex (70 kDa); lane 2: lipolytic activity of Lip-LifBC complex on the SDS-PAGE gel, using tributyrin as the substrate. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250.



**Figure 2. Phylogenetic analysis of lipase LipBC and closely related proteins.**

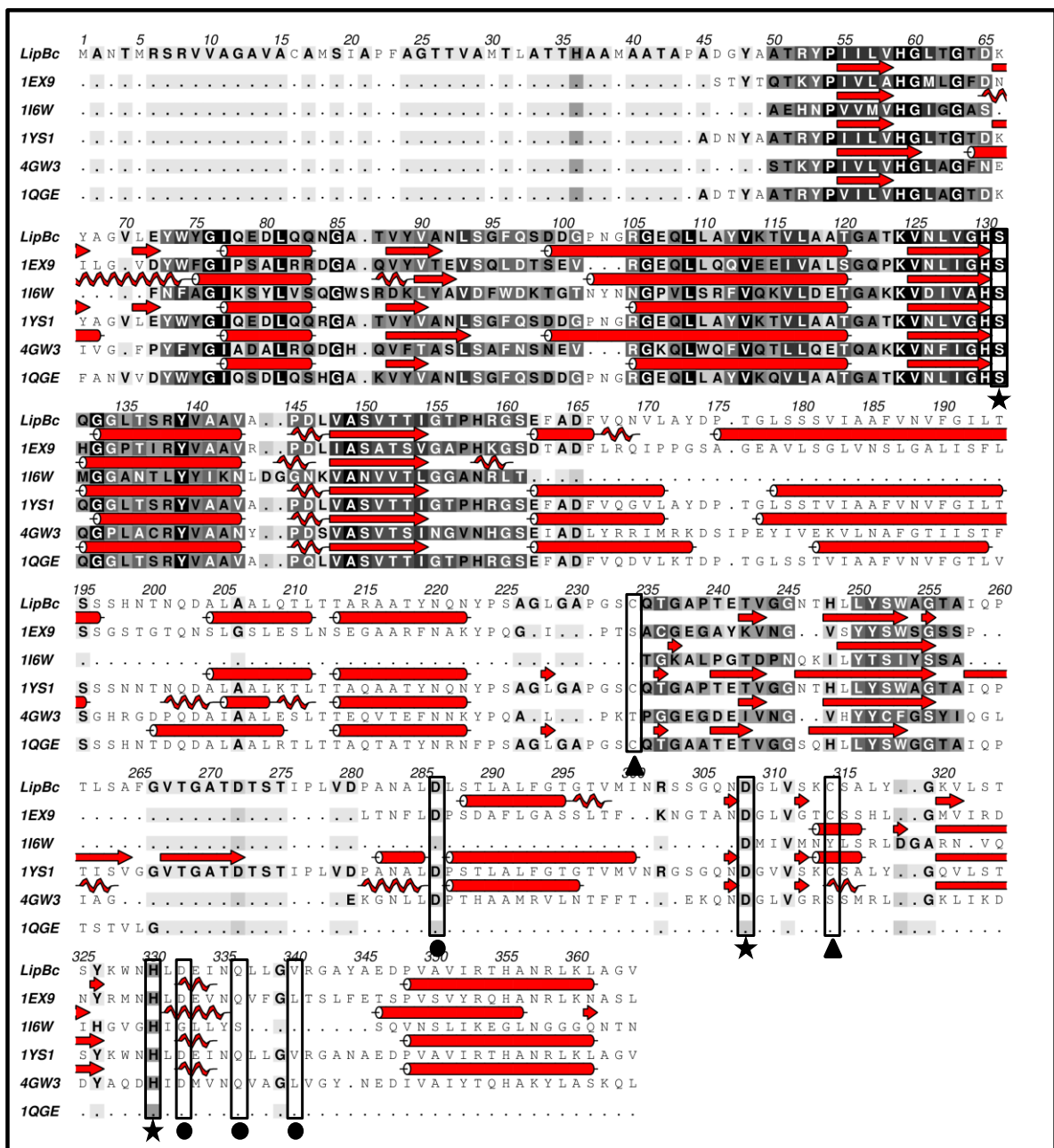
The protein sequences were retrieved from GenBank (NCBI). The phylogenetic tree was generated with the neighbor-joining method using MEGA version 6.0. The scale represents the number of amino acid substitutions per site.

LipBC has 364 amino acids and the domain analysis carried out using Pfam suggests that it has a canonical  $\alpha/\beta$  hydrolase folding type I, between residues 54 and 266 (Ollis et al. 1992).

LipBC has the conserved sequential pentapeptide Gly-X1-Ser-X2-Gly, where X1 and X2 correspond to His and Gln residues (Figure 3). The residues of catalytic triad were identified as Ser<sup>131</sup>, Asp<sup>308</sup> and His<sup>330</sup>. The alignment suggests that Asp<sup>286</sup>, Asp<sup>332</sup>, Gln<sup>336</sup> and Val<sup>340</sup> form a calcium binding pocket, and cysteine residues Cys<sup>234</sup>-Cys<sup>314</sup> are predicted to form a

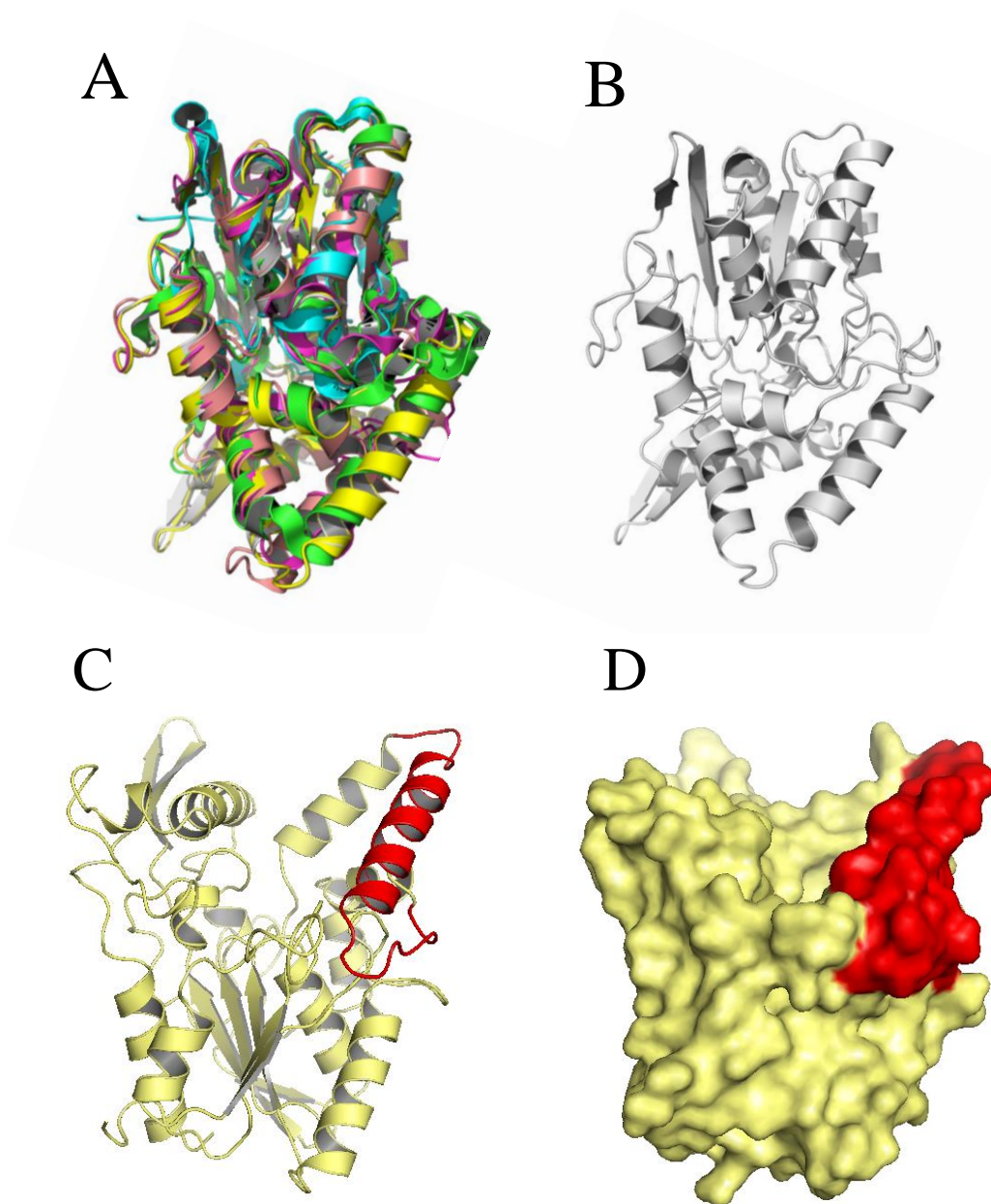
disulfide bridge, similar to what happens in the lipases of *B. cepacia* and *B. glumae* (Figure 3). In the sequence analysis, the first 44 amino acids at the N-terminal did not align with the structures from the PDB (Figure 3). Given that the crystal structures of the lipases from the PDB are not ordered in their N-terminal regions, it is therefore not appropriate to model the corresponding region of LipBC. The final model of LipBC was built with 320 amino acids without these first 44 amino acids. The consistency of the proposed model was extensively checked. The model with the lowest normalized DOPE score (-1.066) and a GA341 score of 1.000 (which indicates a correct fold) was chosen for later analyses. The program PROCHECK identified three Ramachandran outliers: two of them were in loops and the last one was the catalytic Ser<sup>131</sup>, modelled as in the templates, which presents the same conformation.

We superposed the final model of LipBC with templates from *Bacillus subtilis* (PDB:1I6W), *B. glumae* (PDB:1QGE), *B. cepacia* (PDB:1YS1), *Proteus mirabilis* (PDB:4GW3) and *P. aeruginosa* (PDB:1EX9) (Figure 4). Besides the canonical  $\alpha/\beta$  hydrolase fold (Figure 4A), the model of LipBC has a calcium binding pocket, with the calcium cation being properly coordinated by the carboxylate groups of Asp<sup>286</sup> and Asp<sup>332</sup>, both of which absolutely conserved in lipases from subfamilies I.1 and I.2 (Arpigny and Jaeger, 1999). Since the lids of the lipases of *B. glumae* (PDB:1QGE), *B. cepacia* (PDB:1YS1) and *P. aeruginosa* (PDB:1EX9) are in the open conformation, the modeled LipBC structure also shows the lid (Figure 4C-D).



**Figure 3. Secondary structure estimation and sequence alignment of lipase LipBC and templates.**

The rLipBC sequence was aligned with the most similar proteins found in the PDB (Protein Data Bank). Stars indicate the catalytic triad, circles indicate the residues in the possible binding site for  $\text{Ca}^{2+}$  and triangles indicate cyst residues that form a putative disulfide bond. Above the sequences are the representations of secondary structures: arrows indicate  $\beta$ -strands and cylinders indicate  $\alpha$ -helices.



**Figure 4.** A) Homology modeled LipBC structure superposed of the template structures. B) The modeled structure, in the same orientation as in 4A, but with its secondary structure highlighted according to Figure 4A. C) The modeled structure with the lid highlighted in red. D) A space filling model of 4C

#### *Characterization of rLipBC*

The highest specific activity of rLipBC was against tributyrin ( $1426 \text{ U mg}^{-1}$ ) (Table 2). The specific activity decreased with increasing length of the carbon chain, with specific activities

between 888 and 626 U mg<sup>-1</sup> for all triacylglycerols tested, except for castor oil, with a specific activity only of 225 U mg<sup>-1</sup>.

The effect of temperature on rLipBC activity was determined by the hydrolysis of olive oil at various temperatures, ranging from 25 °C to 80 °C. Recombinant LipBC showed activity in all evaluated temperatures and has maximum activity (1839 mg<sup>-1</sup>) at 70 °C (Figure 5). In the stability studies, rLipBC had residual activities around 90% after 1.5 h of incubation at 25-45 °C, decreasing to 44% at 50 °C and 5% at 55 °C (Figure 5).

**Table 2. Enzymatic activity of recombinant LipBC against natural triacylglycerols.**

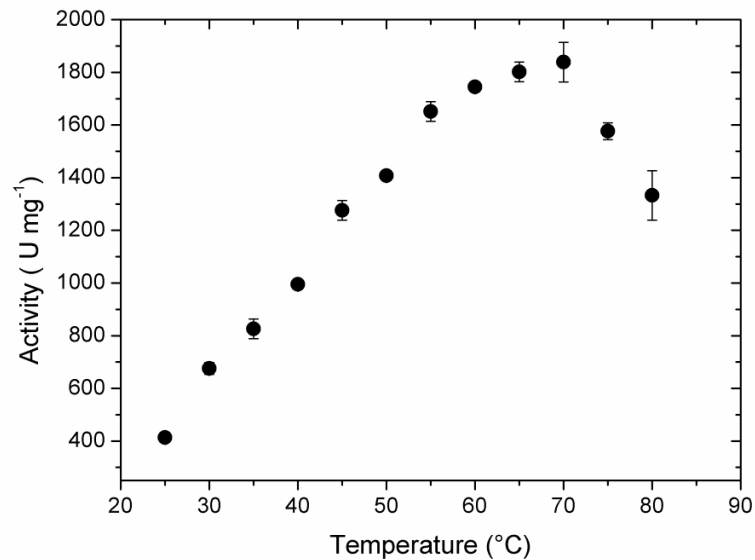
Substrate	Activity (U mg <sup>-1</sup> )
Tributylin	1426 ± 98
Sunflower oil	888 ± 17
Soybean oil	863 ± 23
Used Soybean oil	851 ± 25
Olive oil	845 ± 48
linseed oil	801 ± 33
Canola oil	776 ± 35
Corn oil	712 ± 71
Triolein	701 ± 35
Rice oil	626 ± 39
Castor oil	225 ± 14

The activity was determined by the titrimetric method using a pHStat, at pH 8.0 and 37 °C. Results are expressed as the average of triplicate assays ± the standard error of the mean.

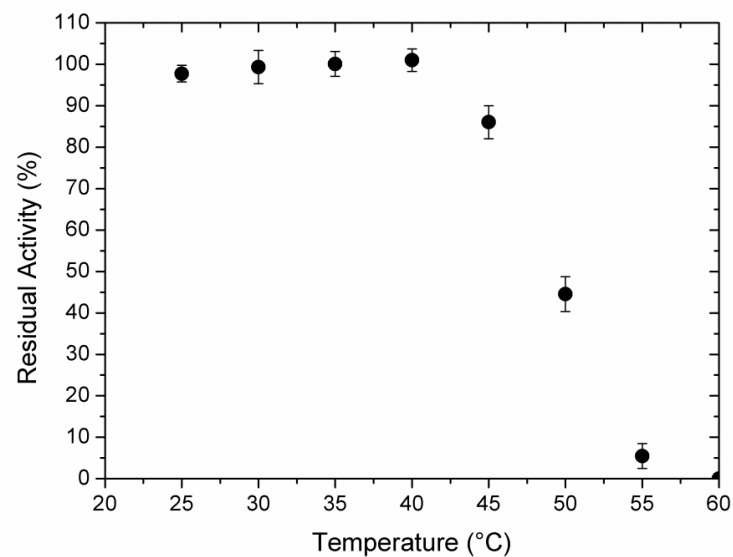
The maximum activity of rLipBC (938 U mg<sup>-1</sup>) was at pH 8.5, but it decreased sharply in pH 7 (150 U mg<sup>-1</sup>), and there was no activity below pH 7.0 (Figure 6). In the stability study,

rLipBC had more than 80% residual activity after being incubated for 1.5 h from pH 4 to pH 11 in different buffers, at 25 °C (Figure 6).

A



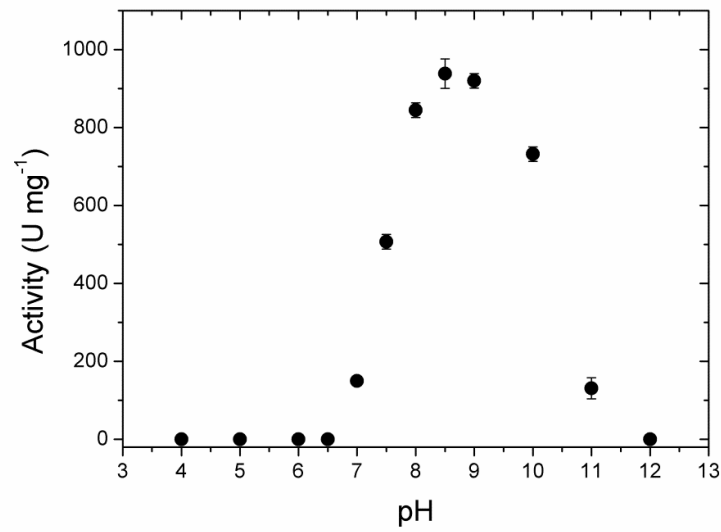
B



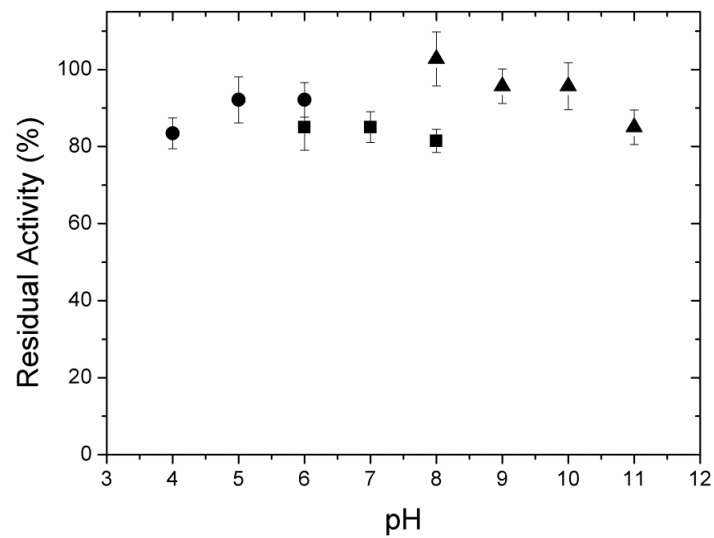
**Figure 5. Effect of temperature on recombinant LipBC activity and stability.**

(A) The activity was determined with olive oil as the substrate, by the titrimetric method using a pHStat, at pH 8.0. (B) For the stability study, rLipBC was incubated for 1.5 h before determination of the residual activity and 100% corresponds to the activity after incubation at 40 °C. Results are expressed as the average of triplicate assays  $\pm$  the standard error of the mean.

A



B



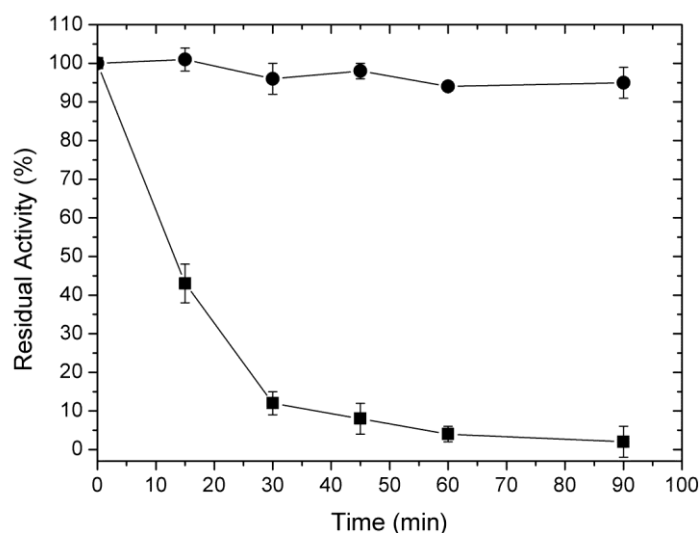
**Figure 6. Effect of pH on recombinant LipBC activity and stability.**

(A) The activity was determined with olive oil as the substrate, by the titrimetric method using a pHStat, 37 °C. (B) In the stability assay, rLipBC was incubated for 1.5 h at 30 °C in different buffers: (●) citrate; (■) phosphate and (▲) glycine-NaOH. Residual activity was determined with olive oil as the substrate, by the titrimetric method using a pHStat, at pH 8.0, 37 °C. Results are expressed as the average of triplicate assays  $\pm$  the standard error of the mean.



*Immobilization and application of immobilized rLipBC in ethyl-oleate synthesis*

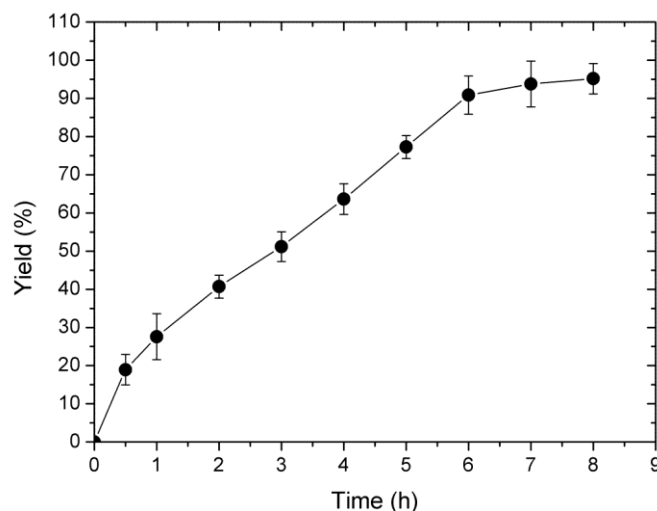
Recombinant LipBC was immobilized by physical adsorption on Sepabeads. Ninety percent of the enzyme in the supernatant was immobilized in the first hour (Figure 7). There was no loss of activity in a control in which the enzyme solution was incubated under the same conditions but without the support. The retention of activity of rLipBC on Sepabeads was 84% and the final activity of the immobilized rLipBC was 13 U g<sup>-1</sup> of support.



**Figure 7. Kinetics of adsorption of recombinant LipBC on Sepabeads.**

Key: (■) Residual activity in the supernatant; (●) Soluble enzyme without support (control). Adsorption was performed with an initial protein loading (mg protein per g support) of 5 mg g<sup>-1</sup>, at 25 °C, 80 rpm. Residual activity was determined using *p*-nitrophenyl propionate (*p*NPP) as the substrate. Results are expressed as the average of triplicate assays ± the standard error of the mean.

Immobilized rLipBC catalyzed the synthesis of ethyl-oleate in *n*-hexane medium with an activity of 4 U g<sup>-1</sup>. A yield of 90% was obtained in 6 h (Figure 8). When used in five successive esterification reactions, immobilized rLipBC maintained its activity, giving an 83% conversion of oleic acid in the fifth reaction cycle (Figure 9). These results show that immobilized rLipBC is active and stable in organic medium.



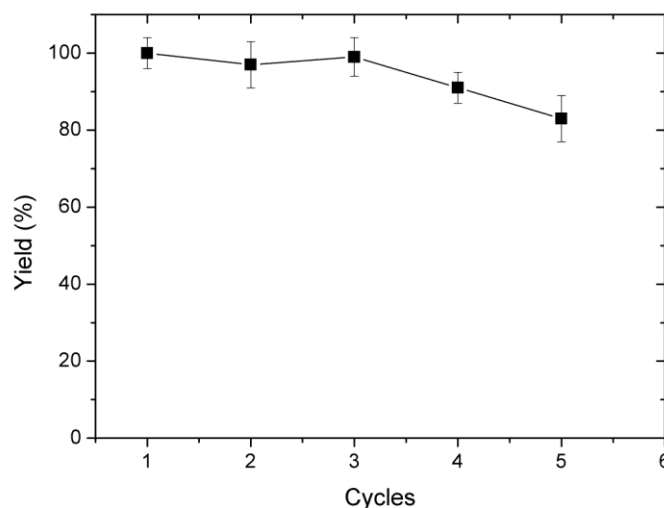
**Figure 8. Kinetics of synthesis of ethyl-oleate in *n*-hexane catalyzed by immobilized recombinant LipBC.**

Conditions: 3 mL *n*-hexane, 70 mmol L<sup>-1</sup> oleic acid, 210 mmol L<sup>-1</sup> ethanol, 150 mg of immobilized rLipBc, incubated at 45 °C and 180 rpm. Results are expressed as the average of triplicate assays ± the standard error of the mean.

### ***Discussion***

In the current work, we used a simple and effective *in vivo* folding strategy, in which the genes of a lipase and a foldase from *Burkholderia contaminans* LTEB11 were cloned in different plasmids and inserted into a single heterologous host, *E. coli* BL21(DE3). We chose this strategy for two significant reasons. First, the amount of active enzyme achieved by co-expression lipase and its cognate foldase in a single expression vector is low because of the complexity of the gene regulatory and secretion mechanisms (El Khattabi et al. 1999; El Khattabi et al. 2000); second, comparing to *in vitro* strategies, the co-expression strategy that we used has the advantage of obtaining active lipase in a single step. Through this approach, we obtained high specific activities against triacylglycerols (845 U mg<sup>-1</sup> against olive oil), similar to the result reported by Martini et al. (2014) and Madan and Mishra (2010), who used a similar approach to overexpress a metagenomic lipase LipG9 and a lipase from *P.*

*aeruginosa* B2264, respectively. They reported an activity of 817 U mg<sup>-1</sup> against triolein and 225 U mg<sup>-1</sup>, using *p*-nitrophenylpalmitate as the substrate, respectively.



**Figure 9. Ethyl-oleate yields in *n*-hexane during successive reaction cycles.**

The same immobilized rLipBc preparation was used to catalyze five successive esterification reactions. Conditions: 3 mL *n*-hexane, 70 mmol L<sup>-1</sup> oleic acid, 210 mmol L<sup>-1</sup> ethanol, 150 mg of immobilized rLipBc, incubated at 45 °C and 180 rpm. Results are expressed as the average of triplicate assays ± the standard error of the mean.

When compared with another *in vivo* approach to obtain active lipases, our results also show promise. Peng et al. (2011) reported an activity of 203 U mg<sup>-1</sup> using *p*-nitrophenylpalmitate after the co-expression of lipase and its foldase from *P. aeruginosa* CS-2 in *E. coli* BL21 (DE3) using a single expression vector pET28a-*lipAB*. Wu et al. (2012) used the expression vectors pACYCDuet-1 and pETDuet-1 containing two multiple cloning sites (MCS) to co-express the lipase and foldase from *P. aeruginosa* in *E. coli* BL21(DE3). The plasmid pACYCDuet-*lipA-lipB* was selected to the optimal expression of lipase and foldase and an activity of 8500 U L<sup>-1</sup> against olive oil was obtained (Wu et al. 2012). In the current work, we obtained an activity of 127 000 U L<sup>-1</sup> against olive oil in the crude extract.

The phylogenetic analysis classified LipBC into the bacterial lipase subfamily I.2, which follows the type II mechanism of secretion. LipBC contains N-terminal signal sequence of 40 amino acids with a cleavage position between Ala<sup>40</sup> and Ala<sup>41</sup>, as described for other lipases from subfamily I.2. (Rosenau and Jaeger 2000; Park et al. 2007; Yang et al. 2016). Therefore, analysis of the signal sequence also showed a possible cleavage site on carboxyl terminal of Pro<sup>44</sup>, similar to that described for the lipases from *Burkholderia ubonensis* SL-4 (Yang et al. 2016) and *Burkholderia sp.*HY-10 (Park et al. 2007). This second cleavage site has been described like a second proteolysis on inactive lipase while it folded into its active conformation with the assistance of Lif (Rosenau et al. 2004). LipBC presents two Cys residues that form a disulphide bridge conserved in the majority of the lipase sequences from the subfamily I.2, as is the case of *B. cepacia*, *B. glumae* and *P. aeruginosa*, but differs from the subfamily I.1 lipases from *Pseudomonas fragi* and *Proteus vulgaris*, which contain only one Cys residue.

The high specific activity of rLipBC against commercial oils, above 1839 U mg<sup>-1</sup> at 70 °C, is 100-fold higher than that of LipBC produced by the wild strain in submerged fermentation (16 U mg<sup>-1</sup>) (Salum et al. 2008; Baron et al. 2011). This is a significant result, since it would not be feasible to use this strain at large scale because *B. contaminans* is described as opportunistic bacteria that cause human infections (Vanlaere et al. 2009) and this hinders its use in large-scale process in biotechnological applications.

Recombinant LipBC showed activity from 25 to 80 °C, with optimum temperature at 70 °C, similar to the lipases from *B. cepacia* S31 (Lu et al. 2009) and *B. cepacia* G63 (Yang et al. 2007) and higher than lipases from *Burkholderia sp.* HY-10 (60 °C) (Park et al. 2007), *B. cepacia* ST-200 (45 °C) (Takeda et al. 2006) and *Burkholderia sp.* GXU56 (40 °C) (Wei et

al. 2008). Recombinant LipBC also showed stability at 45 °C, as well as stability in a broad range of pH values (from pH 4.0 to 11.0), interesting characteristics that provide the basis for the development of applications of rLipBC in biocatalysis.

Recombinant LipBC was successfully immobilized by physical adsorption on hydrophobic support Sepabeads , with 95% of immobilization yield in 1 h (Figure 7). At pH 7.0 and low ionic strength, the physical adsorption is favored due to the high hydrophobicity of the lid of the lipase promoting the phenomenon known as interfacial activation (Fernandez-Lafuente et al. 1998; Palomo et al. 2002). However, no increase in activity was observed throughout the immobilization process (hyperactivation), a common characteristic already described for other lipases immobilized on hydrophobic supports (Bastida et al. 1998; Palomo et al. 2002; Alnoch et al. 2015; Rueda et al. 2015; Albuquerque et al. 2016) and just 84% of recovery of activity was obtained. One hypothesis to explain it is that rLipBC lipase is complexed with its foldase and immobilization may be occurring largely through the rich hydrophobic regions in *n*-terminal region of the foldase, the transmembrane helix (residues 7 to 30) and hydrophobic stretch (residues 41 to 70). Thus, the lipase remains in its closed form and the immobilization via interfacial adsorption does not occur. Nevertheless, immobilized rLipBC was able to catalyze the synthesis of ethyl-oleate, maintaining high conversions over 5 reaction cycles of 6 h at 45 °C (Figure 9). Although the reaction conditions are not optimized, our results (90% of yield in 6 h) are promising when compared with other lipases complexed with foldase in the literature (Peng et al. 2011; Alnoch et al. 2015), which drives new studies on immobilization strategy to lipase rLipBC and its application in biocatalysis.

## Conclusion

In this paper, we reported the successful co-expression of *Burkholderia contaminans* LTEB11 lipase and its foldase. Phylogenetic analysis suggests that LipBC belongs to the bacterial lipase subfamily I.2 and the structural model presents both an overall folding and an active site structure that are quite similar to those of the homologue lipases used as templates. The combined characteristics of rLipBC, namely its high activity against triglycerides and commercial oils, its broad range of pH and temperature stability and its potential to catalyze reactions in organic solvents showed that it has a good potential for use in biocatalysis.

## Bibliography

- Aamand JL, Hobson a H, Buckley CM, Jørgensen ST, Diderichsen B, McConnell DJ (1994) Chaperone-mediated activation in vivo of a *Pseudomonas cepacia* lipase. *Mol Gen Genet* 245:556–64.
- Albuquerque TL de, Rueda N, dos Santos JCS, Barbosa O, Ortiz C, Binay B, Ozdemir E, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R (2016) Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. *Process Biochem* 51:865–874. doi: 10.1016/j.procbio.2016.04.002
- Alnoch RC, Martini VP, Glogauer A, Costa ACDS, Piovan L, Muller-Santos M, De Souza EM, Pedrosa FDO, Mitchell DA, Krieger N (2015) Immobilization and characterization of a new regioselective and enantioselective lipase obtained from a metagenomic library. *PLoS One* 10:1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0114945
- Arpigny JL, Jaeger KE (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343 Pt 1:177–183.
- Baron AM, Barouh N, Barea B, Villeneuve P, Mitchell DA, Krieger N (2014) Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. *Fuel* 117, Part:458–462. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.065>
- Baron AM, Zago EC, Mitchell DA, Krieger N (2011) SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Biocatal Biotransformation* 29:19–24. doi: Doi 10.3109/10242422.2010.548556
- Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernández-Lafuente R, Huguet J, Guisán JM (1998) A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial

- adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 58:486–493. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980605)58:5<486::AID-BIT4>3.0.CO;2-9
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242.
- Bond CS, Schuttelkopf AW (2009) ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. *Acta Crystallogr Sect D* 65:510–512. doi: doi:10.1107/S0907444909007835
- Capriles P V, Guimaraes AC, Otto TD, Miranda AB, Dardenne LE, Degraeve WM (2010) Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: putative drug targets for chagas' disease treatment. *BMC Genomics* 11:610. doi: 10.1186/1471-2164-11-610
- Dyrløv Bendtsen J, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783–795. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.028>
- El Khattabi M, Ockhuijsen C, Bitter W, Jaeger KE, Tommassen J (1999) Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. *Mol Gen Genet* 261:770–776. doi: 10.1007/s004380050020
- El Khattabi M, Van Gelder P, Bitter W, Tommassen J (2000) Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. *J Biol Chem* 275:26885–26891. doi: 10.1074/jbc.M003258200
- Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A (2006) Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinforma Chapter 5:Unit 5 6*. doi: 10.1002/0471250953.bi0506s15
- Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernandez-Lorente G, Guisan JM (1998) Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids* 93:185–197. doi: 10.1016/S0009-3084(98)00042-5
- Hobson AH, Buckley CM, Aamand JL, Jorgensen ST, Diderichsen B, McConnell DJ (1993) Activation of a bacterial lipase by its chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5682–5686.
- Kabsch W, Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22:2577–2637. doi: 10.1002/bip.360221211
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567–580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26:283–291. doi: doi:10.1107/S0021889892009944
- Liu Y, Zhang X, Tan H, Yan Y, Hameed BH (2010) Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. *Process Biochem* 45:1176–1180. doi: 10.1016/j.procbio.2010.03.023

- Lowry RR, Tinsley IJ (1976) Rapid colorimetric determination of free fatty-acids. *J Am Oil Chem Soc* 53:470–472. doi: 10.1007/bf02636814
- Lu Y, Lu F, Wang X, Bie X, Sun H, Wuyundalai, Lu Z (2009) Identification of bacteria producing a thermophilic lipase with positional non-specificity and characterization of the lipase. *Ann Microbiol* 59:565–571. doi: 10.1007/BF03175147
- Madan B, Mishra P (2010) Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas aeruginosa* to a functional lipase in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:597–604. doi: 10.1007/s00253-009-2131-4
- Martini VP, Glogauer A, Müller-Santos M, Iulek J, de Souza EM, Mitchell DA, Pedrosa FO, Krieger N (2014) First co-expression of a lipase and its specific foldase obtained by metagenomics. *Microb Cell Fact* 13:171. doi: 10.1186/s12934-014-0171-7
- Melo F, Sanchez R, Sali A (2002) Statistical potentials for fold assessment. *Protein Sci* 11:430–448. doi: 10.1002/pro.110430
- Moure VR, Fabrício C, Frensch G, Marques FA, Mitchell DA, Krieger N (2014) Enhancing the enantioselectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 towards the resolution of secondary allylic alcohols. *Biocatal Agric Biotechnol* 3:146–153. doi: 10.1016/j.bcab.2013.09.011
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205–217. doi: 10.1006/jmbi.2000.4042
- Oh B-C, Kim H-K, Lee J-K, Kang S-C, Oh T-K (1999) *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiol Lett* 179:385–392. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00439-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00439-5)
- Pauwels K, Lustig A, Wyns L, Tommassen J, Savvides SN, Van Gelder P (2006) Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. *Nat Struct Mol Biol* 13:374–375. doi: 10.1038/nsmb1065
- Palomo JM, Muoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Guisán JM (2002) Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B Enzym* 19–20:279–286. doi: 10.1016/S1381-1177(02)00178-9
- Park D-S, Oh H-W, Heo S-Y, Jeong W-J, Shin DH, Bae KS, Park H-Y (2007) Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle. *J Microbiol* 45:409–17. doi: 2596 [pii]
- Peng R, Lin J, Wei D (2011) Co-expression of an organic solvent-tolerant lipase and its cognate foldase of *Pseudomonas aeruginosa* CS-2 and the application of the immobilized recombinant lipase. *Appl Biochem Biotechnol* 165:926–937. doi: 10.1007/s12010-011-9309-9
- Quyen DT, Schmidt-Dannert C, Schmid RD (1999) High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding. *Appl Env Microbiol* 65:787–794.
- Rosenau F, Jaeger KE (2000) Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* 82:1023–1032. doi: 10.1016/S0300-9084(00)01182-2



- Rosenau F, Tommassen J, Jaeger K-E (2004) Lipase-Specific Foldases. *Chembiochem* 5:152–161. doi: 10.1002/cbic.200300761
- Rueda N, dos Santos JCS, Torres R, Ortiz C, Barbosa O, Fernandez-Lafuente R (2015) Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. *RSC Adv* 5:11212–11222. doi: 10.1039/C4RA13338B
- Salum TFC, Baron AM, Zago E, Turra V, Baratti J, Mitchell DA, Krieger N (2008) An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. *Biocatal Biotransformation* 26:197–203. doi: 10.1080/10242420701568674
- Salum TFC, Villeneuve P, Barea B, Yamamoto CI, Cocco LC, Mitchell DA, Krieger N (2010) Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochem* 45:1348–1354. doi: 10.1016/j.procbio.2010.05.004
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF, Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press NY (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ed.
- Shatsky M, Nussinov R, Wolfson H (2002) MultiProt — A Multiple Protein Structural Alignment Algorithm. In: Guigó R, Gusfield D (eds) *Algorithms in Bioinformatics*. Springer Berlin Heidelberg, pp 235–250
- Shen M, Sali A (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci* 15:2507–2524. doi: 10.1110/ps.062416606
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Soares D, Pinto AF, Gonçalves AG, Mitchell DA, Krieger N (2013) Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochem Eng J* 81:15–23. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.09.017>
- Stuer W, Jaeger KE, Winkler UK (1986) Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas-aeruginosa*. *J Bacteriol* 168:1070–1074.
- Schägger H (2006) Tricine–SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1:16–22. doi: 10.1038/nprot.2006.4
- Takeda Y, Aono R, Doukyu N (2006) Purification, characterization, and molecular cloning of organic-solvent-tolerant cholesterol esterase from cyclohexane-tolerant *Burkholderia cepacia* strain ST-200. *Extremophiles* 10:269–277. doi: 10.1007/s00792-005-0494-8
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680.
- Tiss A, Carriere F, Verger R (2001) Effects of gum Arabic on lipase interfacial binding and activity. *Anal Biochem* 294:36–43. doi: 10.1006/abio.2001.5095
- Traub PC, Schmidt-Dannert C, Schmitt J, Schmid RD (2001) Gene synthesis, expression in *E. coli*, and in vitro refolding of *Pseudomonas* sp. KWI 56 and *Chromobacterium*

- viscosum* lipases and their chaperones. Appl Microbiol Biotechnol 55:198–204. doi: 10.1007/s002530000492
- Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Mahenthiralingam E, Speert DP, Dowson C, Vandamme P (2009) Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 59:102–111. doi: doi:10.1099/ijs.0.001123-0
- Villalobos MC (2016)  $\alpha$ -D -glucose utilizando sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia contaminans* LTEB11. Dissertação -Pós-graduação em Química. Universidade Federal do Paraná.
- Wei HN, Shi LL, Wu B (2008) Production and characteristics of an Enantioselective Lipase from *Burkholderia* sp. GXU56. Chem Eng Technol 31:258–264. doi: 10.1002/ceat.200700348
- Wu X, You P, Su E, Xu J, Gao B, Wei D (2012) In vivo functional expression of a screened *P. aeruginosa* chaperone-dependent lipase in *E. coli*. BMC Biotechnol 12:58. doi: 10.1186/1472-6750-12-58
- Yang J, Guo D, Yan Y (2007) Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. J Mol Catal B Enzym 45:91–96. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.12.007>
- Yang W, He Y, Xu L, Zhang H, Yan Y (2016) A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. J Mol Catal B Enzym 126:76–89. doi: 10.1016/j.molcatb.2016.02.005

## 6. CAPÍTULO 3

### MANUSCRITO 3

#### **New Tailor-Made Alkyl-Aldehyde Bifunctional Supports for Lipase Immobilization**

Este Capítulo é a reprodução integral do artigo publicado na revista *Catalysts* (volume 6, 30 de novembro de 2016, página 191), [doi:10.3390/catal6120191](https://doi.org/10.3390/catal6120191).

# New Tailor-Made Alkyl-Aldehyde Bifunctional Supports for Lipase Immobilization

Robson Carlos Alnoch <sup>1,2</sup>, Ricardo Rodrigues de Melo <sup>1,3</sup>, Jose M. Palomo <sup>1</sup>, Emanuel Maltempi de Souza <sup>2</sup>, Nadia Krieger <sup>4</sup>, and Cesar Mateo <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC), Marie Curie 2. Cantoblanco, Campus UAM, 28049 Madrid, Spain; robsonalnoch@hotmail.com (R.C.A.); ricardorodriguesmelo@gmail.com (R.R.d.M.); josempalomo@icp.csic.es (J.M.P)

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19081 Centro Politécnico, 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil; souzaem@ufpr.br (E.M.S)

<sup>3</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas, 13083-862 Campinas, São Paulo, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19081 Centro Politécnico, 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil; nkrieger@ufpr.br (N.K.)

\* Correspondence: ce.mateo@icp.csic.es (C.M.); Tel.: +34-915854768; Fax: +34-915854860

Academic Editor: David D. Boehr

Received: 28 October 2016; Accepted: 27 November 2016; Published: 30 November

*Catalysts* 2016, 6(12), 191; doi:10.3390/catal6120191

**Abstract:** Immobilized and stabilized lipases are important biocatalytic tools. In this paper, different tailor-made bifunctional supports were prepared for the immobilization of a new metagenomic lipase (LipC12). The new supports contained hydrophobic groups (different alkyl groups) to promote interfacial adsorption of the lipase and aldehyde groups to react covalently with the amino groups of side chains of the adsorbed lipase. The best catalyst was 3.5-fold more active and 5000-fold more stable than the soluble enzyme. It was successfully used in the regioselective deacetylation of peracetylated D-glucal. The PEGylated immobilized lipase showed high regioselectivity, producing high yields of the C-3 monodeacetylated product at pH 5.0 and 4 °C.

**Keywords:** regioselective hydrolysis; biocatalysis; lipase; interfacial activation; covalent immobilization; tailor-made supports; enzyme stabilization

---

## 1. Introduction

Lipases (EC 3.1.1.3) normally catalyze the hydrolysis of carboxylic esters in aqueous media, but they can also be used to synthesize carboxylic esters in water-restricted media, exhibiting high regio-, chemo-, and enantioselectivity. Due to these properties, lipases have been used in different reactions, standing out among the most widely used enzymes in biotechnology [1,2].

Recently, a new lipase, LipC12, was identified in a metagenomic library constructed from soil samples contaminated with fat [3]. LipC12 had a specific activity against long-chain triglycerides (e.g., olive oil 1722 U·mg<sup>-1</sup>) that is comparable to the specific activities of several well-known commercial lipases [3,4]. Furthermore, LipC12 was stable at moderate temperatures and in the presence of co-solvents such as methanol, propanol, or acetone [3]. These features suggest that LipC12 might be suitable for use in biocatalysis.

Typically, industrial biocatalytic processes require that the lipases be immobilized since that immobilization facilitates reutilization of the enzyme, reducing process costs [5]. The immobilization of different lipases has been performed using different immobilization methods such as covalent linkage with different reactive groups, electrostatic or hydrophobic adsorptions, entrapment, encapsulation, or cross-linked enzyme aggregates (CLEAs); and using different materials such as nanomagnetic particles, microspheres, organic or inorganic materials, porous and/or macroporous gel

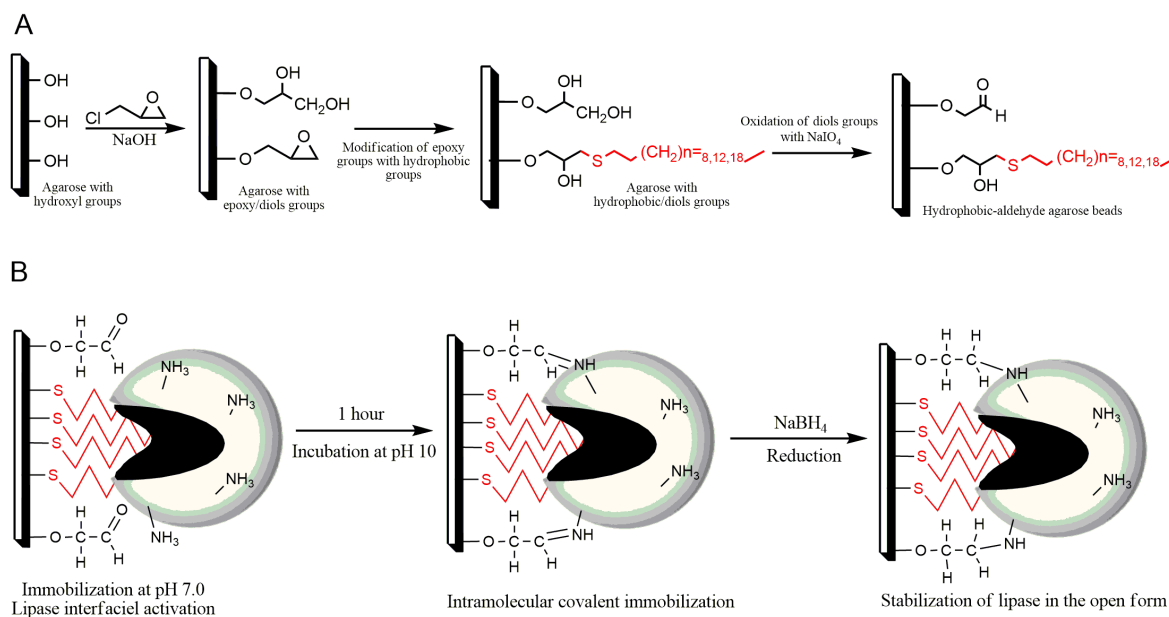
beads, graphene oxides, exfoliated bentonite, and many others [6–19]. The different immobilization methods have enabled the procurement of lipase catalysts with different properties in terms of activity, stability, and selectivity [5].

The most successful strategy used for lipase immobilization is adsorption on hydrophobic supports [5,20]. This strategy has permitted the purification and immobilization of various lipases in a single step [9,11,21,22]. These protocols are based on the special characteristics and mechanisms of lipases. In aqueous media, lipases are in equilibrium between closed and open forms. In the closed form, the lid, which is formed by a short alpha helix, secludes the catalytic site from the medium, making it inaccessible to the substrate, such that the lipase is in an inactive state. In the open and active form, the internal side of the lid and the surroundings of the active site form a hydrophobic pocket that is exposed to the medium. The open form is stabilized upon contact of the lipase with a hydrophobic surface, as occurs at the oil-water interface when lipases are used to hydrolyze triacylglycerides in oil-in-water emulsions [9,11]. The adsorption of lipases in the open form at this interface leads to high activity in a phenomenon that is called interfacial activation. Immobilization by adsorption on hydrophobic surfaces takes advantage of this phenomenon by fixing the lipase predominantly in its open conformation. This gives this method a significant advantage over other methods that immobilize the lipase by other regions and which therefore allow the immobilized lipase to equilibrate between the open and closed conformations. This method is specific and yields more active and selective catalysts [23,24], this being especially important for the catalysis of complex reactions, such as regioselective deprotection reactions with carbohydrates [25]. However, physical adsorption also has a significant disadvantage: the association between the protein and the support is reversible, meaning that the lipase can leach from the solid support, especially in the presence of low concentrations of detergents or solvents [9].

One strategy for preventing the leaching of lipases from hydrophobic supports would be to create covalent bonds between the adsorbed enzyme and the support. In fact, covalent immobilization of enzymes using aldehyde-activated supports is a widely used technique [26]. However, a heterofunctional support that combines hydrophobic and aldehyde groups in the same matrix has not previously been described.

In the present work, novel tailor-made alkyl-aldehyde supports were prepared (Scheme 1). The novel supports contain: (i) a very dense layer of different hydrophobic moieties (different alkyl groups) that are able to adsorb lipases at neutral pH; and (ii) a high concentration of aldehyde groups that are able to react covalently with the enzyme, especially at alkaline pH. The presence of different groups with different functions on the surface of the support should permit better control of the immobilization, which occurs through a two-step mechanism: first the enzyme adsorbs onto the hydrophobic groups and then the aldehyde groups react with it, immobilizing it covalently.

These novel functionalized supports were used to immobilize the novel lipase LipC12, and the stability, activity, and regioselectivity of the new heterogeneous biocatalyst were tested. The best heterogeneous biocatalyst that was obtained was used in the regioselective hydrolysis of per-*O*-acetylated D-glucal, an interesting building block for the synthesis of various tailor-made di- and trisaccharides.



**Scheme 1.** (A) Preparation of new tailor-made alkyl-aldehyde supports; (B) Mechanism of immobilization-stabilization of lipases in the open form on new alkyl-aldehyde supports.  $n = \text{C8}$  (1-octanethiol); C12 (1-dodecanethiol) and C18 (1-octadecanethiol).

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Preparation of New Alkyl-Aldehyde Supports

Agarose beads were utilized as the base matrix for the construction of different bifunctional supports. The surface of the support, which is rich in primary hydroxyl groups, was activated in alkaline conditions, with epichlorohydrin, forming epoxy groups and diol groups (Scheme 1A). The total amount of activated primary hydroxyl groups was around  $65 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ , with epoxy groups accounting for  $23 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  and diol groups accounting for  $42 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (Table 1). The epoxy groups were functionalized with different bifunctional hydrophobic agents (octane-, dodecane-, and octadecane-thiol) in order to have supports containing groups with different degrees of hydrophobicity for interfacial adsorption of the lipase (Scheme 1A). The diol groups were then oxidized with sodium periodate, producing aldehyde groups. These aldehyde groups are capable of reacting covalently with different amine groups of the protein. Immobilization of the lipase on this support occurs in two steps: first, the enzyme adsorbs hydrophobically in an orientation that favors the open form; second, the aldehyde groups react covalently with the side chains of lysine that are exposed at the surface of the enzyme, fixing it covalently to the support (Scheme 1B).

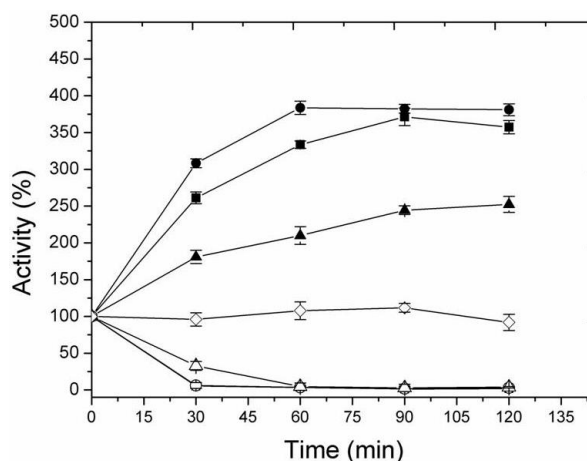
**Table 1.** Quantification of groups on the new alkyl-aldehyde supports.

Support	Ligands ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Diol Groups ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Agarose-Epoxy	$23 \pm 0.4$	$42 \pm 0.4$
C8-aldehyde	$23 \pm 1$	$43 \pm 1$
C12-aldehyde	$21 \pm 1.6$	$41 \pm 1.6$
C18-aldehyde	$19 \pm 1.1$	$38 \pm 1.1$

The number of epoxy/ligands groups was calculated from the difference in periodate consumption between the hydrolyzed support and the initial epoxy support as described in the methods section. Results are expressed as the average of triplicate assays  $\pm$  the standard error of the mean.

## 2.2. Immobilization of LipC12 on New Alkyl-Aldehyde Supports

Figure 1 shows the immobilization of LipC12 by adsorption onto the new alkyl-aldehyde supports. LipC12 was quite rapidly immobilized at pH 7.0 on all bifunctionalized supports, with complete immobilization (i.e., >95% removal of activity from the supernatant) occurring in less than 2 h.



**Figure 1.** Immobilization courses of LipC12 on new alkyl-aldehyde supports. (□) C8-aldehyde; (○) C12-aldehyde; (△) C18-aldehyde. (◇) Control. Symbols: Black (suspension); Hollow (supernatant). Results are expressed as the average of triplicate assays  $\pm$  the standard error of the mean.

LipC12 was activated by adsorption onto the support, with the activities measured for the suspension being significantly higher than that of the original supernatant (Figure 1). The highest value of recovered activity, 380%, was obtained with the preparation C12-aldehyde/LipC12. The preparations C8-aldehyde/LipC12 and C18-aldehyde/LipC12 also showed high values of recovered activity (>200%), showing the hyperactivation of lipase LipC12 immobilized these supports (Table 2). The results show that these new tailor-made supports allowed the immobilization of this lipase in its open conformation via interfacial activation [9,11].

In order to fix LipC12 covalently to the support, the immobilized preparations were incubated at different pH values (7.0, 8.5, and 10) for 1 h. After the incubation, the imine bonds formed between the enzyme and the support were then reduced by adding sodium borohydride. This reduction did not affect the activity of the immobilized enzyme (Table 2). No leaching of lipase was found after incubation in surfactants.

**Table 2.** Principal parameters for immobilization of the lipase LipC12 on new alkyl-aldehyde supports.

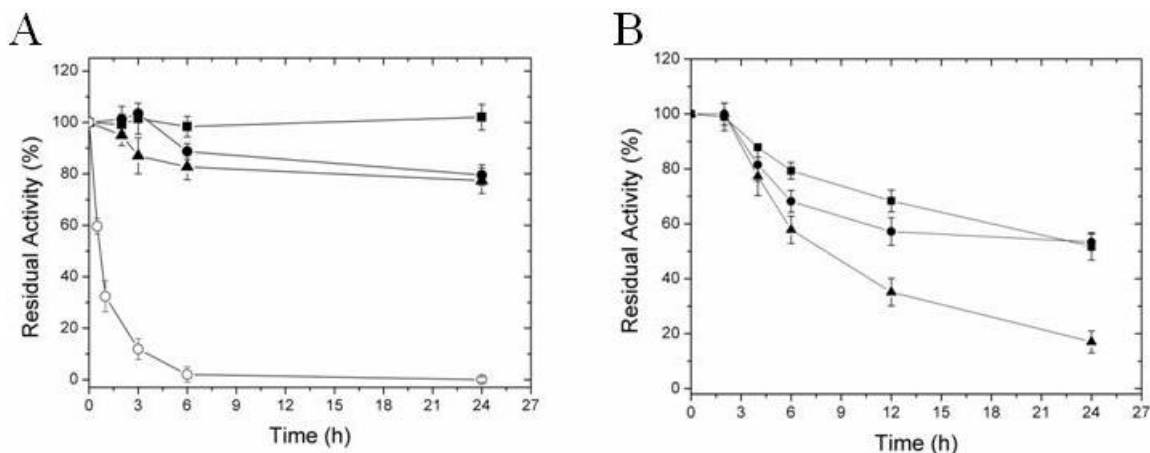
Support	Immobilization Efficiency (%) <sup>a</sup>	Recovered Activity (%) <sup>b</sup>	Recovered Activity after Reduction (%) <sup>c</sup>
C8-aldehyde	>95	357	346
C12-aldehyde	>95	380	370
C18-aldehyde	>95	252	256

<sup>a</sup> Calculated as the difference between the initial and final activities in the supernatant after 2 h of immobilization; <sup>b</sup> Recovered activity (%), measured as the ratio between the real activity ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$  support) of immobilized LipC12 and theoretical activity of the immobilized LipC12 ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$  support); <sup>c</sup> Recovered activity (%) after incubation at pH 10 for 1 h and reduction with  $\text{NaBH}_4$ .

## 2.3. Thermal Inactivation of Different Immobilized LipC12 Preparations

The various immobilized LipC12 preparations previously incubated at different pH values were incubated in phosphate buffer 25 mM at 55 °C. In all cases, the thermal stability of the derivatives

incubated at pH 10 was higher than that incubated at pH 8.5 and 7.0 or the only adsorbed preparations (Figure S1). At pH 7.0, the reactivity of the amino groups of the enzymes was not high enough to produce a covalent attachment with the aldehyde groups; at pH 10, the increase in the reactivity of the amine groups of side chains close to the lid that promote the rigidification on this region resulting in a high stabilization. At 55 °C, C8-aldehyde/LipC12, C12-aldehyde/LipC12, C18-aldehyde/LipC12 conserved more than 80% of their activity after 24 h (Figure 2A) while the half-life of the soluble enzyme was 37 min.



**Figure 2.** Thermal inactivation of LipC12 immobilized on different alkyl-aldehyde supports. (A) Inactivation was performed at pH 7.0, 55 °C after incubation at pH 10 for 1 h; (B) Inactivation was performed at pH 7.0, 80 °C after incubation at pH 10 for 1 h. (■) C12-aldehyde/LipC12; (●) C8-aldehyde/LipC12; (▲) C18-aldehyde/LipC12 and (○) Soluble enzyme. Results are expressed as the average of triplicate assays  $\pm$  the standard error of the mean.

After 24 h incubation at 80 °C, C8-aldehyde/LipC12 and C12-aldehyde/LipC12 still had residual activities above 50%, while the residual activity of C18-aldehyde/LipC12 was only 20% (Figure 2B). Intermediary spacer arms (C8 and C12) supports produced a slight increment in the stability effect achieved when compared with C18. The half-lives were 22 h for C8-aldehyde/LipC12 and 21 h for C12-aldehyde/LipC12, while the soluble lipase lost 50% of the activity after only 15 seconds. This means that the alkyl-aldehyde-lipase preparations were from 2000- to 5000-fold more stable than the soluble enzyme (Table 3). Considering the retention of activity (Table 2) and stability, the C12-aldehyde/LipC12 preparation was chosen for the remaining studies.

**Table 3.** Half-lives (in hours) of the different immobilized preparations at 80 °C.

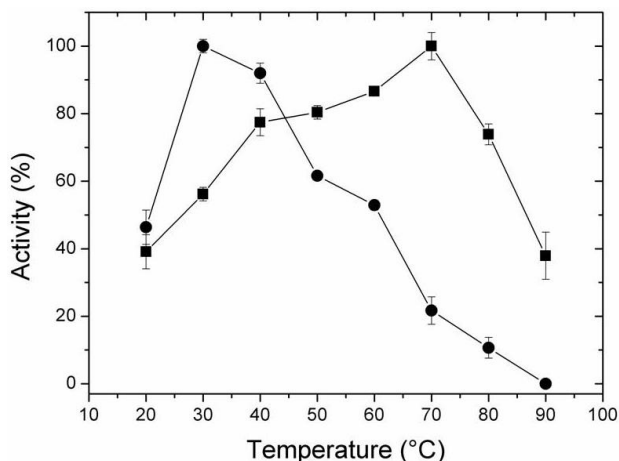
Preparations <sup>a</sup>	Half-Life ( $t_{1/2}$ ) at 80 °C	Stability Factor
Soluble enzyme	0.004	-
C8-aldehyde/LipC12	22	5500
C12-aldehyde/LipC12	21	5250
C18-aldehyde/LipC12	8	2000

<sup>a</sup> Preparations were incubated at 80 °C. Aliquots were withdrawn periodically for quantification of residual enzymatic activity to estimate the half-life according to Henley and Sadana [27].

#### 2.4. Effect of Temperature and pH on Activity of Free and Immobilized LipC12

The optimum temperatures for the activity of free and immobilized LipC12 were determined over the temperature range of 20–90 °C. The maximum activity of the free enzyme was obtained at 30 °C while the optimal temperature for C12-aldehyde/LipC12 was 70 °C (Figure 3).

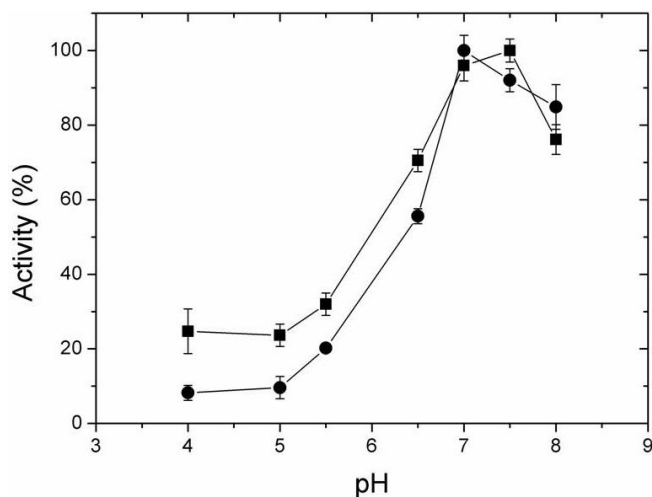




**Figure 3.** Effect of temperature on free and C12-aldehyde/LipC12 activity. (●) Soluble LipC12; (■) C12-aldehyde/LipC12. The activity was determined using p-nitrophenyl proprionate (pNPP) as the substrate, at pH 7.0. Results are expressed as the average of triplicate assays  $\pm$  the standard error of the mean.

This shift in the optimal temperature was related to the improvement of the stability of the obtained preparation. The high improvement after adsorption and covalent linkage is important because it permits the transformation of a mesophilic enzyme into an enzyme with properties that are similar to, or even better than, those of enzymes from thermophile organisms, such as *Bacillus thermocatenolatus* lipase (BTL) and *Thermus thermophilus* lipase (TTL) [28,29].

In relation to the effects of pH on activity, the maximum activity was obtained at around pH 7.0 for both free LipC12 and C12-aldehyde/LipC12 (Figure 4).



**Figure 4.** Effect of pH on free and C12-aldehyde/LipC12 activity. (●) Soluble LipC12; (■) C12-aldehyde/LipC12. The activity was determined using p-nitrophenyl proprionate (pNPP) as the substrate. Results are expressed as the average of triplicate assays  $\pm$  the standard error of the mean.

### 2.5. Regioselective Hydrolysis of 3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucal by Immobilized LipC12

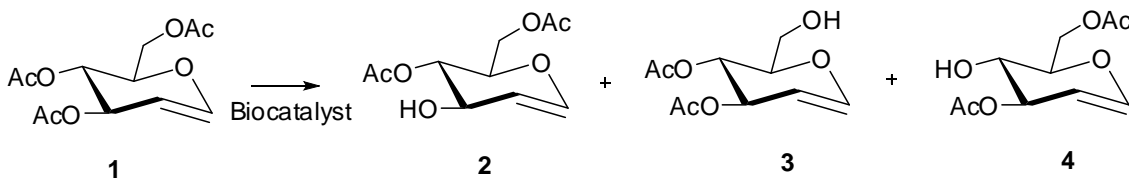
C12-aldehyde/LipC12 was used to catalyze the hydrolytic deacetylation of per-O-acetylated-D-glucal (**1**). The yield of this reaction depends strongly on the reaction conditions. The principal variables assayed were the pH and temperature. Additionally, the recovering of the optimal catalyst with PEG was performed. This treatment has demonstrated that it is able to improve the activity and stability [30]. The activity of the soluble enzyme was also assayed. However, at 25 °C, its activity was extremely low, so no attempt was made to assay it at 4 °C (data not shown).

At 25 °C, low regioselectivity was C12-aldehyde/LipC12 at both pH 7.0 and pH 5.0, producing only around 10% yield of monodeacetylated products at 100% conversion (Table 4). The PEGylated preparation, C12-aldehyde/LipC12-PEG, had a slightly improved regioselectivity at pH 5.0 and 25 °C, although the yield of 3-OH product (**2**) was only 22%.

The regioselectivity was higher at 4 °C than at 25 °C (Table 4). At pH 7.0, 52% of C-3-OH product (**2**) was obtained at 77% conversion, with slight conversion into 4-OH product (**4**) (7%) and 6-OH product (**3**) (1%), reducing the undesired product in 17% (Table 4). The PGEylation of this catalyst (C12-aldehyde/LipC12-PEG) allowed an improvement of the regioselectivity. This catalyst produced 69% of 3-OH product (**2**) at 81% conversion, and only 3% of 4-OH product (**4**) (Table 4).

The PEGylated catalyst was reused in three reaction cycles at 4 °C and similar reaction yields were obtained, demonstrating its reusability (Figure S2). However, the recycle of the catalysts in this reaction are not reported, these data are similar to others obtained by different authors for the hydrolysis of esters as reported by Macario et al. [31], where the catalyst (lipase of *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites) was used in the hydrolysis of methyl myristate for four cycles or Cao et al. [12] that recycled the catalyst (nanohybrids of *Yarrowia lipolytica* lipase) for 12 reaction cycles using *p*NPP as substrate.

**Table 4.** Regioselective hydrolysis of 3,4,6-tri-*O*-acetyl-D-glucal (**1**) using C12-aldehyde/LipC12.



Preparation	pH	T °C	Specific Activity (U·mg <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup>	Time (h)	Total Conversion <sup>a</sup> (%)	Yield <b>2</b> (%)	Yield <b>3</b> (%)	Yield <b>4</b> (%)	Other Products <sup>b</sup> (%)
C12-aldehyde/LipC12	7.0	4	18	96	77	52	1	7	17
C12-aldehyde/LipC12	5.0	4	4	96	34	26	1	1	6
C12-aldehyde/LipC12-PEG	5.0	4	15	96	81	69	0	3	9
C12-aldehyde/LipC12	7.0	25	140	24	100	5	4	0	91
C12-aldehyde/LipC12	5.0	25	140	24	100	11	0	0	89
C12-aldehyde/LipC12-PEG	5.0	25	110	24	100	22	2	2	74

(**1**)- 3,4,6-tri-*O*-acetyl-D-glucal; (**2**)- 4,6-di-*O*-acetyl-D-glucal; (**3**)- 3,4-di-*O*-acetyl-D-glucal; and (**4**)- 3,6-di-*O*-acetyl-D-glucal; <sup>\*</sup> ×10<sup>-3</sup>; <sup>a</sup> Total conversion of substrate (**1**) with different products; <sup>b</sup> D-glucal and dideacetylated products.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Materials

The strains *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and BL21(DE3) (Novagen, Madison, MI, USA) and the vector pET-28a(+) (Novagen, Madison, MI, USA) were used as the recombinant protein expression system. Agarose 4 BCL was purchased from Agarose Bead Technologies (Madrid, Spain). Epichlorhydrine, iminodiacetic acid, triethylamine, sodium borohydride, sodium periodate, 1-octanethiol, 1-dodecanethiol, 1-octadecanethiol, tri-*O*-acetyl-D-glucal, polyethylene glycol (1.500), nickel(II) chloride hexahydrate, and high molecular weight protein (Sigma Marker™) were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich). The substrate *p*-nitrophenyl proprionate (*p*NPP) was synthesized according to Ghosh et al. [32]. All other chemicals used were of analytical grade.

#### 3.2. Overexpression of Recombinant LipC12

*E. coli* BL21(DE3) cells carrying the pET28a(+)/*lipC12* plasmid were grown in 500 mL of LB medium at 37 °C until an OD<sub>600</sub> of 0.5 and induced by the addition of Iso-propyl β-D thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 0.5 mM. The induced culture was incubated for a further 16 h at 20 °C before harvesting the cells by centrifugation (10,000 rpm for 5 min) at 4 °C. The cell pellet was re-suspended in 30 mL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, 1% (*v/v*) Triton X-100 and 10% (*v/v*) glycerol) and disrupted by ultrasonication in an ice bath (15 cycles of 20-s pulses, 90 W, with 30-s intervals), using a SONICATOR® XL 2020 (Heat Systems-Ultrasonics Inc., New Highway, Farmingdale, NY, USA). The crude extract was then centrifuged at 15,000 rpm 30 min at 4 °C to pellet the cell debris.

#### 3.3. Protein Content Determination and Electrophoresis Analysis

Protein content was determined by the Bradford method [33] using a Coomassie Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) with bovine serum albumin as the standard. Electrophoresis of protein samples was done with 12% (*w/v*) SDS-PAGE [34] and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained with methanol/acetic-acid/water (5/1/4 *v/v/v*). A mixture of high molecular weight proteins (Sigma Marker™, Sigma-Aldrich®) was used as the molecular weight standard.

#### 3.4. Lipase Activity Assay

Lipase activity was determined using *p*-nitrophenyl proprionate (*p*-NPP) as the substrate. Free or immobilized enzyme was added to the reaction mixture (0.4 mM *p*NPP, mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0) and the increase of absorbance was monitored at 348 nm (at pH 7,  $\epsilon_{348 \text{ nm}} = 5150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [35]. One unit of activity (U) was defined as the production of 1 μmol of *p*-nitrophenol per minute, under the assay conditions.

#### 3.5. Preparation of Supports

##### 3.5.1. Epoxy-Agarose

The epoxy-agarose support was prepared according to Mateo et al. [26]. Briefly, 10 g of agarose BLC (cross-linked 4% agarose beads) was mixed with 44 mL of distilled water, 3.2 g of NaOH, 200 mg of NaBH<sub>4</sub>, 16 mL of acetone, and 11 mL of epichlorohydrin. The suspension was stirred for 16 h at 25 °C. The epoxy-agarose was washed with an excess of water, filtered through a glass filter, and stored at 4 °C.

##### 3.5.2. Epoxy-Agarose-IDA-Ni<sup>2+</sup>

The epoxy-agarose support was treated with 0.5 M iminodiacetic acid in solution at pH 11 for different durations (1, 3, 5, and 24 h), 25 °C. The support was then chelated with a NiCl<sub>2</sub> solution (30 mg·mL<sup>-1</sup>) for 1 h. Finally, the support was washed, filtered under using a glass filter, and stored at 4 °C.

### 3.5.3. Alkyl-Agarose-Aldehyde

The epoxy-agarose support was treated with 100 mM of different alkyl thiols (1-octanethiol; 1-dodecanethiol and 1-octadecanethiol) in a 25 mM NaHCO<sub>3</sub> solution at pH 10 for 24 h, 25 °C. For the treatment with 1-octadecanethiol, 50% (*v/v*) acetone was used as a co-solvent. The reagent was solubilized using a 50:50 (*v/v*) mixture of acetone and NaHCO<sub>3</sub> solution. After that, the supports were oxidized with NaIO<sub>4</sub> (100 mM), washed, filtered through a glass filter, and stored at 4 °C.

The number of epoxy/ligand groups was calculated from the difference in periodate consumption between the hydrolyzed support and the initial epoxy support. Periodate consumption was quantified using potassium iodide, as previously described [36].

### 3.6. Purification of Recombinant LipC12

The purification was performed using the IDA-Ni<sup>2+</sup> supports prepared from agarose gel beads and activated with different amounts of metal chelate groups [37]. The optimal support was that obtained after 3 h of activation with IDA (data not shown). For the purification, 4 mL of crude extract (3.2 mg·mL<sup>-1</sup>) was offered for 1 g of support and the residual activity of the supernatant was monitored over time. After that, the support was washed three times with 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0 and resuspended in the same buffer at increasing concentrations of imidazole. Figure S3 shows the protein band corresponding to the molecular mass of LipC12 (32 kDa) after SDS-PAGE of the eluate from IDA-Ni<sup>2+</sup> support at 50 mM of imidazole. Table S1 summarizes the results of the purification step, showing an activity yield of 58%. The specific hydrolytic activity against *p*NPP was 6.2 U·mg<sup>-1</sup>. This preparation was used in further experiments of immobilization.

### 3.7. Enzyme Immobilization

A standard protocol was established for the immobilization of LipC12 on all supports. One gram of support was suspended in 4 mL of enzyme solution (containing 0.6 mg of protein) in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at pH 7, 25 °C and left under mild stirring. The time course of immobilization was evaluated by determining the activity (Section 3.4) in aliquots of the supernatant and suspension removed over time. After the immobilization, the preparations were washed with 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0 and incubated in 4 mL of 25 mM NaHCO<sub>3</sub> at different pH values (7.0, 8.5, 10) at 25 °C for 1 h. Finally, the preparations were reduced by adding NaBH<sub>4</sub> (1 mg·mL<sup>-1</sup>) at pH 10 and leaving the mixture under stirring for 30 min.

The immobilization efficiency (IE, %) was calculated as:

$$EI = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100\% \quad (1)$$

where  $A_i$  is the hydrolytic activity (U) of the enzyme solution before immobilization and  $A_f$  is the hydrolytic activity (U) remaining in the supernatant at the end of the immobilization procedure.

The recovered activity (R, %) was calculated as:

$$R = \frac{A_o}{A_T} \times 100\% \quad (2)$$

where  $A_o$  is the observed hydrolytic activity the immobilized preparation (U·g<sup>-1</sup> of support) and  $A_T$  is the theoretical activity of the immobilized preparation (U·g<sup>-1</sup> of support), calculated based on the amount of activity removed from the supernatant during the immobilization procedure.

In some assays, immobilized preparations were treated after reduction with PEG (polyethylene glycol). PEG was used as an additive due to its protective effect on the enzymes described in the literature [30,38]. To assay, 1 g of immobilized preparation was added to 10 mL phosphate buffer pH 7.0 25 mM containing 40% PEG1500 (*w/v*). The suspension was stirred for 2 h at 25 °C. After that, the preparation was washed, filtered under using a glass filter, and stored at 4 °C.

### 3.8. Thermal Stability

The thermal stabilities of free and immobilized LipC12 were assessed by incubation in sodium phosphate buffer (25 mM, pH 7.0) in a water bath at 55 and 80 °C. Inactivation was modeled based on the deactivation theory proposed by Henley and Sadana [19]. Inactivation parameters were determined from the best-fit model of the experimental data which was the one based on a two-stage series inactivation mechanism with residual activity. Half-life was used to compare the stability of the different preparations, being determined by interpolation from the respective models described in [39].

### 3.9. Effect of pH and Temperature on the Activity of Free and Immobilized LipC12

The optimum temperature for the activity of free and immobilized LipC12 was determined over the temperature range of 20–90 °C. The effect of pH on the activity was determined over a range of pH 4.0–8.0, at 25 °C, using citrate (pH 4.0–6.0) and phosphate (pH 6.0–8.0) buffers at 25 mM. The activity was determined using *p*-nitrophenyl proprionate (*p*NPP) as substrate (Section 3.4). The activities were calculated in relation to controls that were treated identically, but without enzyme to control of spontaneous hydrolysis of the substrate.

### 3.10. Hydrolysis of 3,4,6-tri-*O*-acetyl-*D*-glucal

For the hydrolysis of peracetylated 3,4,6-tri-*O*-acetyl-*D*-glucal, 200 mg of immobilized Lipc12 was added to a solution (1.5 mL) of substrate-1 (1 mM) in 25 mM of phosphate (pH 7.0) or acetate (pH 5.0) buffer. The reaction was carried out at 25 or 4°C, 50 rpm. Samples were removed and analyzed by reverse phase HPLC (Spectra Physic SP 100,) using a Kromasil C18 column (25 cm × 0.4 cm, 5 μm-Ø) and a UV detector (Spectra Physic SP 8450,) set at 220 nm. The mobile phase utilized was acetonitrile (20%) in milli-Q water. The products were characterized and identified as previously described in [24]. Retention times were: 3,4,6-tri-*O*-acetyl-*D*-glucal 1-24.6 min, C-3 monodeacetylated 2-6.3 min, C-6 monodeacetylated 3- 6.6 min and C-4 monodeacetylated 4-8.1 min. One unit of activity (U) was defined as the hydrolysis of 1 μmol of substrate per hour. Activities were expressed as specific activities (U per mg of immobilized protein). The reutilization of immobilized preparations was studied using the same reaction conditions as described above.

## 4. Conclusions

Bifunctional supports with aldehyde and different hydrophobic groups have been synthesized. The main advantage of the immobilization protocol developed in the current work is the ease with which the amounts of aldehyde and hydrophobic groups on the surface of the support can be controlled. This enables modulation of immobilization conditions which may be adapted to the immobilization/stabilization of proteins which may be limited in commercial supports. This versatile strategy could also be applied to synthesize supports with other hydrophobic groups to immobilize different lipases, producing catalysts with different properties. These modulated lipase biocatalysts could be used to produce products that are difficult synthesize by traditional methods.

The use of different supports allowed us to obtain immobilized preparations of LipC12 with different activities and stabilities. The best catalyst was 3.5-fold more active and 5000-fold more stable than the soluble enzyme. Thus, the immobilization procedure converted a mesophilic enzyme into an enzyme that can operate at high temperature, with a maximal activity obtained at 70 °C.

The optimal catalyst was used for the regioselective hydrolysis of peracetylated-D-Glucal. The highest yield of the C-3 monodeacetylated product was 69% with a conversion of 81%, at pH 5 and 4 °C using the PEGylated preparation.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/link](http://www.mdpi.com/link), Figure S1: SDS-PAGE analyses of the LipC12 purification; Figure S2: Thermal stability of different preparations of LipC12; Figure S3: Hydrolysis of 3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucal during successive reaction cycles; Table S1: Summary of the purification of LipC12.

**Acknowledgments:** The authors gratefully acknowledge the Ramón Areces Foundation for financial support. Research scholarships were granted to Robson Carlos Alnoch and Ricardo Rodrigues de Melo (Grant No: 201757/2015-0 and 201688/2015-8) for the development of personnel in higher education, and to Nadia Krieger and Emanuel Maltempi de Souza by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), a Brazilian government agency for the advancement of science. The authors thank David A. Mitchell for critical review of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Jaeger, K.-E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; van Heuvel, M.; Misset, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *15*, 29–63.
2. Kapoor, M.; Gupta, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555–569.
3. Glogauer, A.; Martini, V.P.; Faoro, H.; Couto, G.H.; Müller-Santos, M.; Monteiro, R.A.; Mitchell, D.A.; de Souza, E.M.; Pedrosa, F.O.; Krieger, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microb. Cell Fact.* **2011**, *10*, doi:10.1186/1475-2859-10-54.
4. Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235–251.
5. Santos, J.C.S.; Dos; Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2413–2432.
6. Alnoch, R.C.; Martini, V.P.; Glogauer, A.; Costa, A.C.D.S.; Piován, L.; Müller-Santos, M.; De Souza, E.M.; Pedrosa, F.D.O.; Mitchell, D.A.; Krieger, N. Immobilization and characterization of a new regioselective and enantioselective lipase obtained from a metagenomic library. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0114945.
7. Rueda, N.; Dos Santos, C.S.; Rodriguez, M.D.; Albuquerque, T.L.; Barbosa, O.; Torres, R.; Ortiz, C.; Fernandez-Lafuente, R. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *128*, 10–18.
8. Guisan, J.M.; Sabuquillo, P.; Fernandez-Lafuente, R.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Halling, P.J.; Kennedy, D.; Miyata, E.; Re, D. Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: Adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *11*, 817–824.
9. Palomo, J.M.; Munoz, G.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19*, 279–286.
10. Carrasco-Lopez, C.; Godoy, C.; de las Rivas, B.; Fernandez-Lorente, G.; Palomo, J.M.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R.; Martinez-Ripoll, M.; Hermoso, J.A. Activation of bacterial thermo alkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4365–4372.
11. Fernandez-Lafuente, R.; Armisen, P.; Sabuquillo, P.; Fernández-Lorente, G.; Guisán, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 185–197.
12. Cao, J.; Li, Y.; Tu, N.; Lv, Y.; Chen, Q.; Dong, H. Novel enzyme/exfoliated bentonite nanohybrids as highly efficient and recyclable biocatalysts in hydrolytic reaction. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *132*, 41–46.
13. Chen, C.; Zhu, X.; Gao, Q.; Fang, F.; Wang, L.; Huang, X. Immobilization of lipase onto functional cyclomatrix polyphosphazene microspheres. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *132*, 67–74.

14. Sato, R.; Tokuyama, H. Fabrication of enzyme-entrapped composite and macroporous gel beads by suspension gelation combined with sedimentation polymerization. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *113*, 152–157.
15. Isobe, N.; Lee, D.S.; Kwon, Y.J.; Kimura, S.; Kuga, S.; Wada, M.; Kim, U.J. Immobilization of protein on cellulose hydrogel. *Cellulose* **2011**, *18*, 1251–1256.
16. Verri, F.; Diaz, U.; MacArio, A.; Corma, A.; Giordano, G. Optimized hybrid nanospheres immobilizing *Rhizomucor miehei* lipase for chiral biotransformation. *Process Biochem.* **2016**, *51*, 240–248.
17. Mathesh, M.; Luan, B.; Akanbi, T.O.; Weber, J.K.; Liu, J.; Barrow, C.J.; Zhou, R.; Yang, W. Opening Lids: Modulation of Lipase Immobilization by Graphene Oxides. **2016**, *6*, 4760–4768.
18. Yagar, H.; Balkan, U. Entrapment of laurel lipase in chitosan hydrogel beads. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2016**, 1–7.
19. Sheldon, R.A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 467–477.
20. Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463.
21. Suescun, A.; Rueda, N.; Dos Santos, J.C.S.; Castillo, J.J.; Ortiz, C.; Torres, R.; Barbosa, O.; Fernandez-Lafuente, R. Immobilization of lipases on glyoxyl-octyl supports: Improved stability and reactivation strategies. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 1211–1217.
22. Peirce, S.; Virgen-Ortíz, J.J.; Tacias-Pascacio, V.G.; Rueda, N.; Barto Lome-Cabrero, R.; Fernandez-Lopez, L.; Russo, M.E.; Marzocchella, A.; Fernandez-Lafuente, R. Development of simple protocols to solve the problems of enzyme coimmobilization. Application to coimmobilize a lipase and a  $\beta$ -galactosidase. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 61707–61715.
23. Marciello, M.; Filice, M.; Palomo, J.M. Different strategies to enhance the activity of lipase catalysts. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1531–1543.
24. Palomo, J.M. Lipases enantioselectivity alteration by immobilization techniques. *Curr. Bioact. Compd.* **2008**, *4*, 126–138.
25. Filice, M.; Guisan, J.M.; Terreni, M.; Palomo, J.M. Regioselective monodeprotection of peracetylated carbohydrates. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1783–96.
26. Mateo, C.; Bolivar, J.M.; Godoy, C.A.; Rocha-Martin, J.; Pessela, B.C.; Curiel, J.A.; Munoz, R.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lorente, G. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3112–3117.
27. Henley, J.P.; Sadana, A. Deactivation theory. *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, *28*, 1277–85.
28. Palomo, J.M.; Segura, R.L.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Improving the activity of lipases from thermophilic organisms at mesophilic temperatures for biotechnology applications. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 249–254.
29. Palomo, J.M.; Fuentes, M.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Guisan, J.M.; Fernández-Lafuente, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1–6.
30. Ishimoto, T.; Jigawa, K.; Henares, T.G.; Sueyoshi, K.; Endo, T.; Hisamoto, H. Efficient immobilization of the enzyme and substrate for a single-step caspase-3 inhibitor assay using a combinable PDMS capillary sensor array. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 7682–7687.
31. MacArio, A.; Giordano, G.; Frontera, P.; Crea, F.; Setti, L. Hydrolysis of alkyl ester on lipase/silicalite-1 catalyst. *Catal. Lett.* **2008**, *122*, 43–52.
32. Ghosh, U.; Ganessunker, D.; Sattigeri, V.J.; Carlson, K.E.; Mortensen, D.J.; Katzenellenbogen, B.S.; Katzenellenbogen, J.A. Estrogenic diazenes: Heterocyclic non-steroidal estrogens of unusual structure with selectivity for estrogen receptor subtypes. *Bioorgan. Med. Chem.* **2002**, *11*, 629–657.
33. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
34. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
35. Fernandez-Lorente, G.; Palomo, J.M.; Mateo, C.; Munilla, R.; Ortiz, C.; Cabrera, Z.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2610–2615.

36. Whistler, R.L.; Wolfrom, M.L.; BeMiller, J.N. *Methods in Carbohydrate Chemistry*; Academic Press: New York, NY, USA; London, UK, 1963; Volume 2.
37. Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Pessela, B.C.C.; Vian, A.; Carrascosa, A.V.; Garcia, J.L.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes: New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions. *J. Chromatogr. A* **2001**, *915*, 97–106.
38. Combes, D.; Yoovidhya, T.; Girbal, E.; Willemot, R.M.; Monsan, P. Mechanism of enzyme stabilization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1987**, *501*, 59–62.
39. Addorisio, V.; Sannino, F.; Mateo, C.; Guisan, J.M. Oxidation of phenyl compounds using strongly stable immobilized-stabilized laccase from *Trametes versicolor*. *Process Biochem.* **2013**, *48*, 1174–1180.

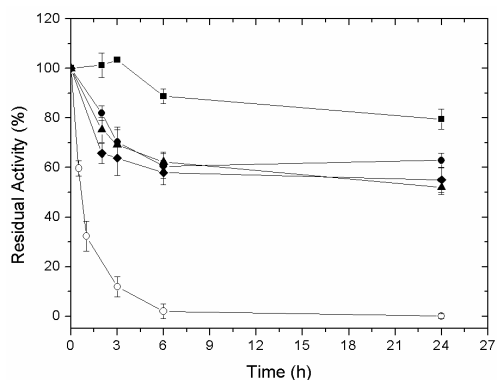


© 2016 by the authors. licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

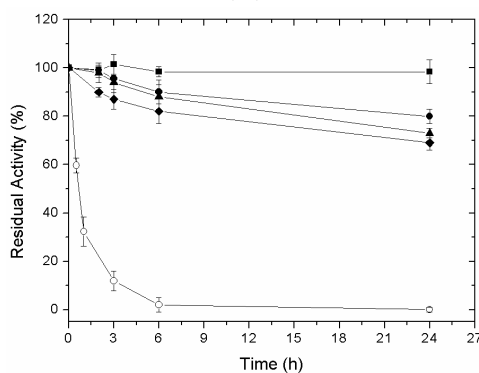


## Supplementary Materials: New Tailor-Made Alkyl-Aldehyde Bifunctional Supports for Lipase Immobilization

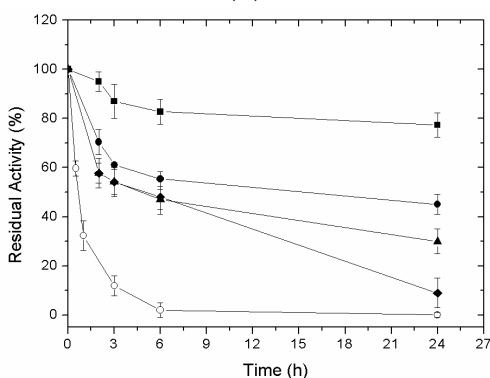
Robson Carlos Alnoch, Ricardo Rodrigues de Melo, Jose M. Palomo, Emanuel Maltempi de Souza, Nadia Krieger, and Cesar Mateo



(A)

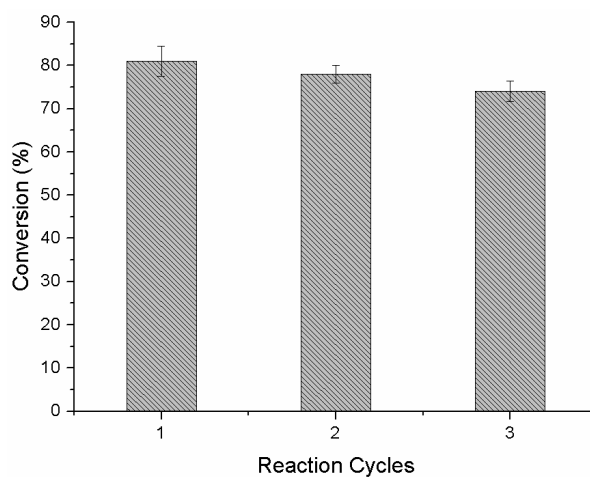


(B)

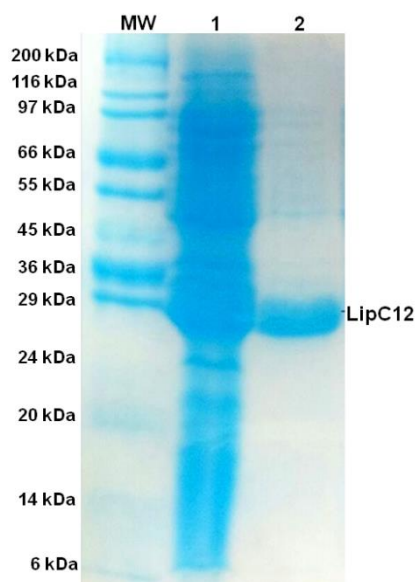


(C)

**Figure 5.** Thermal stability of different preparations of LipC12. Inactivation was performed at pH 7.0, 55 °C after incubation at different pHs for 1 h. (•) pH 10; (●) pH 8.5; (▲) pH 7.0; (◆) pH 7.0 without aldehyde groups and (○) Soluble enzyme. (A) C8-aldehyde/LipC12; (B) C12-aldehyde/LipC12; (C) C18-aldehyde/LipC12. Results are expressed as the average of triplicate assays  $\pm$  the standard error of the mean.



**Figure 6.** Hydrolysis of 3,4,6-tri-*O*-acetyl-D-glucal during successive reaction cycles. C12-aldehyde/LipC12-PEG preparation was repeatedly used to catalyze the hydrolysis of 3,4,6-tri-*O*-acetyl-D-glucal at pH 5.0, 25 and 4 °C. Results are expressed as the average of duplicate assays  $\pm$  the standard error of the mean.



**Figure 7.** SDS-PAGE analysis of the lipase LipC12 purification. The lanes were loaded as follows: lane MW, protein molecular weight standards; lane 1, supernatant of the bacterial cell lysate; lane 2, eluted fractions of LipC12. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

## **7. CAPÍTULO 4**

**Imobilização da lipase recombinante LipBC em diferentes suportes heterofuncionais**

## 7. INTRODUÇÃO

As lipases (E.C. 3.1.1.3 - triacilglicerol hidrolases) se destacam dentro do grupo de enzimas mais utilizadas em biocatálise devido à sua habilidade de catalisar uma grande variedade de reações, como por exemplo, reações de esterificação, transesterificação e interesterificação. Devido a essa versatilidade, as lipases são utilizadas para a síntese de diferentes produtos que têm aplicação na indústria farmacêutica, agroquímica e em síntese orgânica (KAPOOR e GUPTA 2012).

Entretanto, apesar do grande potencial de aplicação de lipases e dos inúmeros trabalhos sobre isolamento e seleção de lipases reportados na literatura, poucas lipases apresentam as propriedades requeridas para utilização em processos industriais. Desta forma, existe uma demanda por lipases que tenham atividade e estabilidade em diferentes meios reacionais, como aquo-restritos, bifásicos ou orgânicos. Assim, uma das estratégias de melhoramento de desempenho de lipases encontram-se as técnicas de imobilização, que podem promover aumento de estabilidade, atividade e seletividade da enzima (MATEO et al., 2007c). Em processos industriais, a utilização de enzimas imobilizadas garante a recuperação do biocatalisador, permitindo o seu reuso em vários ciclos de reação e facilitando a purificação dos produtos. Essas características garantem uma redução de custo nos processos enzimáticos, um dos principais desafios para a sua implantação industrial.

No presente Capítulo são apresentados os resultados parciais e complementares relacionados a imobilização da lipase LipBC recombinante descrita no Capítulo 2. O objetivo desta etapa do trabalho foi verificar qual o tipo de ligação/interação seria ideal para imobilizar a lipase LipBC, e assim, selecionar o melhor suporte em termos de eficiência de imobilização, retenção da atividade enzimática e estabilidade frente à temperatura. A lipase foi imobilizada em diferentes suportes heterofuncionais (IDA-aldeído, IDA-Ni<sup>2+</sup>-aldeído e amino-aldeído) propostos por Mateo et al. (2010) e nos novos suportes hidrofóbicos (C8-aldeído, C12-aldeído e C18-aldeído) descritos no Capítulo 3.

## 7.1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1.1 Preparação dos suportes

#### 7.1.1.1 Ativação da agarose com grupos epóxi

O suporte epóxi-agarose foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Mateo et al. (2010). Em resumo, 10 g de agarose BLC (Cross-linked 4% agarose beads) foram adicionadas em 44 mL de uma solução NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> contendo 200 mg de NaBH<sub>4</sub>, 16 mL de acetona e 11 mL de epicloridrina. A suspensão foi agitada durante 16 h a 25 °C. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada, filtrado a vácuo utilizando um filtro de vidro e armazenado a 4 °C. Este suporte foi utilizado como base para a preparação dos suportes heterofuncionais como descrito abaixo.

#### 7.1.1.2 Suporte IDA-aldeído

O suporte epóxi-agarose (10 g) foi tratado com uma solução de ácido iminodiacético (IDA) 500 mmol L<sup>-1</sup> (100 mL, pH 11,0) por 24 h a 25 °C. Após o tratamento, o suporte foi oxidado utilizando uma solução de NaIO<sub>4</sub> (10 mmol L<sup>-1</sup>) por 2 h. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada, filtrado a vácuo utilizando um filtro de vidro e armazenado a 4 °C.

#### 7.1.1.3 Suporte IDA-Ni<sup>2+</sup>-aldeído

O suporte epóxi-agarose-IDA (5 g) foi tratado com uma solução de NiCl<sub>2</sub> (30 mg mL<sup>-1</sup>) por 1 h a 25 °C. Após o tratamento, o suporte foi oxidado utilizando uma solução de NaIO<sub>4</sub> (10 mmol L<sup>-1</sup>) por 2 h. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada, filtrado a vácuo utilizando um filtro de vidro e armazenado a 4 °C.

#### 7.1.1.4 Suporte amino-aldeído

O suporte epóxi-agarose (10 g) foi tratado com uma solução de trietilamina  $1 \text{ mol L}^{-1}$  (100 mL, 50% de acetona v/v), pH 12 por 24 h a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o tratamento, o suporte foi oxidado utilizando uma solução de  $\text{NaIO}_4$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) por 2 h. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada, filtrado a vácuo utilizando um filtro de vidro e armazenado a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 7.1.1.5 Suporte alquil-aldeído

O suporte epóxi-agarose (10 g) foi tratado com uma solução contendo  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de diferentes alquil-tióis (1-octanotiol; 1-dodecanotiol e 1-octadecanotiol),  $25 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  (100 mL, pH 10), por 24 h a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para o tratamento com 1-octadecanotiol, foi utilizado acetona 50% (v/v) na solução para a solubilizar o substrato. Após o tratamento, o suporte foi oxidado utilizando uma solução de  $\text{NaIO}_4$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) por 2 h. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada, filtrado a vácuo utilizando um filtro de vidro e armazenado a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 7.1.2 Determinação da atividade lipolítica

A determinação da atividade lipolítica foi realizada utilizando propionato de *p*-nitrofenila como substrato. Para o ensaio, a enzima livre ou imobilizada foi adicionada em uma cubeta contendo 2,5 mL do mix de reação ( $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  do substrato, tampão fosfato  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,0). O incremento da absorbância foi monitorado a 348 nm (pH 7,0  $\epsilon = 5150 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2006). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a produção de  $1 \text{ } \mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por min nas condições do ensaio.

#### 7.1.3 Imobilização da lipase LipBC em suportes heterofuncionais

Para a imobilização da lipase LipBC foi estabelecido um protocolo padrão para todos os suportes. Inicialmente, 1 g de suporte foi colocado em frascos Erlenmeyer de 25 mL com 4 mL de solução enzimática diluída em tampão fosfato  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,0, a 80 rpm e  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . A carga de proteína utilizada foi  $5 \text{ mg g}^{-1}$  de suporte. O

processo de imobilização foi seguido removendo-se alíquotas do sobrenadante ao longo do tempo e a atividade residual no sobrenadante e na suspensão (enzima imobilizada) foi determinada pela hidrólise do propionato de *p*-nitrofenila (item 7.1.2). A partir dos resultados experimentais, os valores de eficiência da imobilização (E) e retenção da atividade (R), foram calculados a partir das Equações 1 e 2, respectivamente (YADAV et al., 2005).

$$EI = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100\% \quad 1)$$

$$R = \frac{A_o}{A_T} \times 100\% \quad 2)$$

Onde:  $A_i$ : atividade inicial total de hidrólise antes da imobilização;  $A_f$ : atividade final total de hidrólise no sobrenadante após a imobilização;  $A_o$ : atividade observada do imobilizado ( $\text{U g}^{-1}$  do suporte);  $A_T$ : atividade teórica do imobilizado ( $\text{U g}^{-1}$  do suporte).

#### 7.1.4 Estabilidade de LipBC livre e imobilizada frente à temperatura

A termoestabilidade da enzima livre e imobilizada foi avaliada pela incubação em banho termostático a 55 °C por 48 h. Para o ensaio com a enzima livre, 200  $\mu\text{L}$  (0,045 mg) foram incubados em 600  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 25  $\text{mmol L}^{-1}$ , e a atividade residual foi avaliada pela hidrólise do propionato de *p*-nitrofenila (item 7.1.2). Em relação a enzima imobilizada, 1 g das diferentes preparações imobilizadas foram incubados previamente em 10 mL de tampão bicarbonato de sódio 25  $\text{mmol L}^{-1}$  a pH 8,5 e 10 por 1 h, visando a formação ligações covalentes multipontuais entre a enzima e o suporte. A essa solução foi adicionado o agente redutor  $\text{NaBH}_4$  (1  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e a suspensão mantida em agitação branda (50 rpm) durante 30 min a 25 °C. Em seguida, as preparações foram lavadas com água

destilada e filtradas. Finalmente, foram incubados 500 mg das diferentes preparações imobilizadas em 1 mL de tampão fosfato 25 mmol L<sup>-1</sup> em banho termostaticado a 55 °C por 48 h. A atividade residual foi avaliada pela hidrólise do propionato de *p*-nitrofenila (item 7.1.2).

## 7.2 RESULTADOS

### 7.2.1 Imobilização da lipase LipBC em suportes heterofuncionais

A lipase LipBC foi superexpressa e purificada de acordo com protocolos já estabelecidos e descritos no Capítulo 2. Para os ensaios de imobilização, a estratégia adotada foi a de *imobilização-estabilização* em suportes heterofuncionais (MATEO et al., 2010), descrita na FIGURA 1.

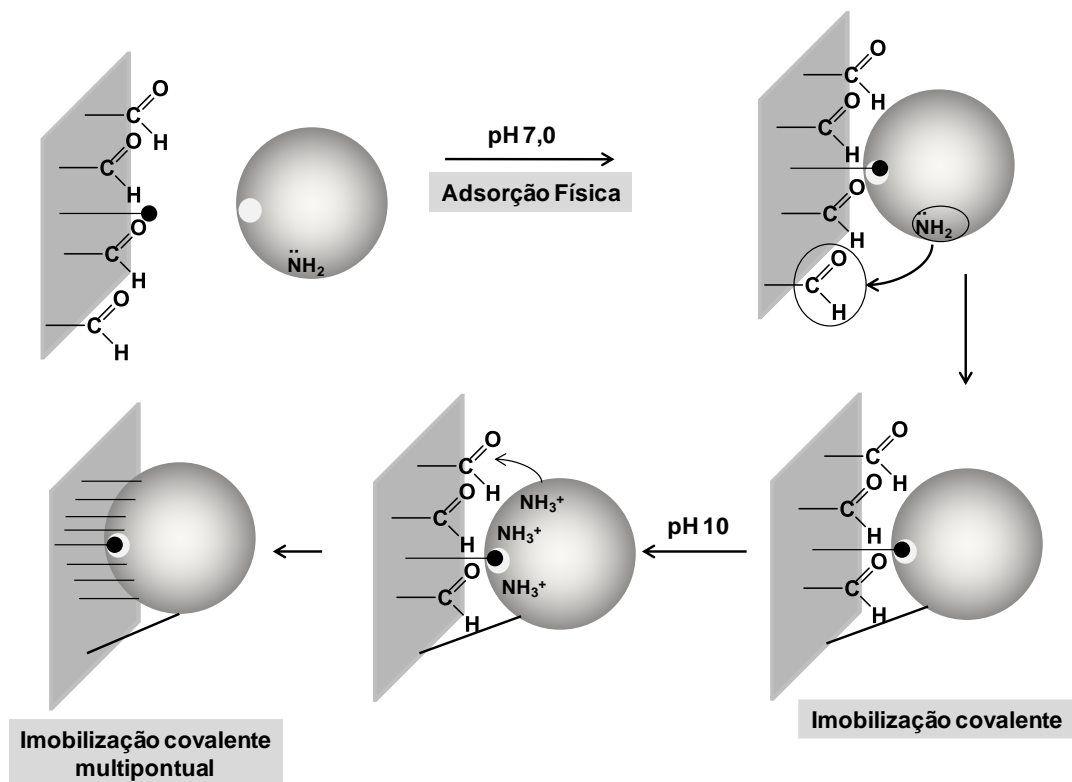


FIGURA 1 - IMOBILIZAÇÃO-ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM SUPORTES HETEROFUNCIONAIS

Em uma primeira etapa, as enzimas são adsorvidas em pH neutro sobre o suporte. Na segunda etapa, condições alcalinas promovem ligações covalentes pontuais ou multipontuais entre grupos aldeídos do suporte com diferentes grupos reativos da enzima, como por exemplo, grupos amino primários.



Fonte: Adaptado de MATEO et al. (2010).

Foram escolhidos diferentes suportes com características distintas que possibilitam a imobilização da lipase em uma primeira etapa de adsorção através de diferentes regiões da superfície da proteína (regiões ricas em cargas negativas ou positivas, histidinas ou regiões hidrofóbicas). O processo de imobilização foi acompanhado ao longo do tempo retirando-se alíquotas do sobrenadante e dosando-se a atividade residual pela hidrólise do propionato de *p*-nitrofenila (item 7.1.2). A partir dos resultados experimentais, o valor de E (Eficiência da imobilização) e R (Retenção da atividade) foram calculados e são apresentados na TABELA 1.

Considerando-se que a eficiência de imobilização (E) é calculada a partir do desaparecimento da atividade presente no sobrenadante, valores acima de 95% (TABELA 1) foram obtidos para todos os suportes avaliados após 1 h de incubação. Apesar dessa eficiência de imobilização, os suportes aniônicos IDA-aldeído e IDA-Ni<sup>2+</sup>-aldeído apresentaram valores de retenção de atividade menores de 50% (TABELA 1), indicando que esse tipo de interação leva à uma perda significativa da atividade de LipBC.

TABELA 1. PRINCIPAIS PARÂMETROS DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE LIPBC EM SUPORTES HETEROFUNCIONAIS

Suporte	Eficiência de Imobilização <sup>a</sup> (%)	Retenção de Atividade (%)
IDA-aldeído	100	33
IDA- Ni <sup>2+</sup> -aldeído	100	45
Amino-aldeído	100	78
C8-aldeído	100	115
C12-aldeído	100	165
C18-aldeído	100	122

IDA: Ácido iminodiacético; C8: 1-octanotiol; C12: 1-dodecanotiol; C18: 1-octadecanotiol.  
Eficiência (%) – calculada pela diferença entre a atividade inicial e a atividade final da lipase LipBC no sobrenadante da imobilização.

Os suportes C8, C12 e C18-aldeído apresentaram valores de retenção de atividade (R) acima de 100% (TABELA 1). Entretanto, a atividade de LipBC imobilizada não aumentou proporcionalmente com o comprimento da cadeia hidrofóbica dos suportes (TABELA 1), assim como observado na imobilização da lipase LipC12 nos mesmos suportes (Capítulo 3).

Os valores de retenção acima de 100% para os suportes C8, C12 e C18-aldeído podem ser justificados pela adsorção e estabilização da lipase em sua conformação estrutural aberta, uma vez que a *lid* contém resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, ou seja, a lipase estaria simultaneamente se ligando ao suporte e sofrendo ativação interfacial (PALOMO, 2002; MATEO et al., 2007c). Entretanto, era esperado valores de retenção de atividade (hiperativação) mais elevados, como já descrito na literatura para lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos que apresentam *lid* em sua estrutura (MATEO et al., 2007; PALOMO, 2008), como por exemplo para a lipase LipC12 (Capítulo 3), para a lipase (selvagem) de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP-100 (BARON, 2008), para as lipases de *Mucor miehei* e *Candida rugosa* imobilizadas em octadecil-sepabeads (PALOMO et al., 2002) e lipase de *Humicola lanuginosa* imobilizada em octil-agarose (BASTIDA et al., 1998).

Como descrito no Capítulo 2, a lipase LipBC permanece complexada com sua foldase (LifBC) após a purificação. LifBC apresenta uma região N-terminal rica em aminoácidos hidrofóbicos (resíduos 1 - 70) e provavelmente essa região pode estar interagindo com o suporte. Essa interação pode resultar em uma orientação diferente da LipBC durante a imobilização, levando à formação de "populações" diferentes da lipase imobilizada, seja pela região da "*lid*", o que levaria à conformação da lipase "aberta", ou pela região *n*-terminal da foldase, mantendo a lipase em sua conformação "fechada". Essa hipótese justifica os baixos valores de retenção de atividade de LipBC quando imobilizada nos diferentes suportes hidrofóbicos (TABELA 1).

Na literatura, há poucos estudos de imobilização envolvendo lipases complexadas com sua foldase específica, sendo os trabalhos de Peng et al. (2011) e Alnoch et al. (2015) os únicos reportados na literatura. Peng et al. (2011) imobilizaram a lipase de *P. aeruginosa* CS2 co-expressa com sua foldase em Celite-545 e aplicaram na síntese de acetato de isoamila em *n*-hexano. Entretanto, os

autores não reportaram valores de retenção de atividade após a imobilização. Alnoch et al. (2015) imobilizaram uma nova lipase (LipG9), obtida por prospecção metagenômica, complexada com sua foldase, em Accurel MP 1000. Valores de retenção de atividade acima de 100% (246%) foram obtidos em comparação com a atividade da enzima livre em meio orgânico. Não foram reportados resultados de retenção de atividade da enzima em meio aquoso.

A partir dos resultados obtidos na imobilização da lipase LipBC, as preparações C8, C12 e C18-aldeído-LipBC que apresentaram valores de retenção de atividade acima de 100% foram escolhidas para a continuação do trabalho.

### 7.2.2 Estabilidade de LipBC livre e imobilizada frente à temperatura

Uma das etapas mais importantes do processo de imobilização em suportes heterofuncionais é a estabilização da enzima através de ligações covalentes multipontuais com o suporte (FIGURA 1). Essa etapa é realizada em pH alcalino e em um curto período de tempo (cerca de 1 h). Em alguns casos, essas condições podem acarretar perda de atividade, dependendo da enzima e sua interação com o suporte (MATEO et al., 2010). Entretanto, a perda de atividade pode ser compensada com um aumento na estabilidade da enzima devido a ligações multipontuais favorecidas nessas condições (MATEO et al., 2010; SANTOS et al., 2015).

Nessa etapa do trabalho, as preparações C8, C12 e C18-aldeído-LipBC foram incubadas em tampão bicarbonato de sódio a pH 8,5 e 10,0 por 1 h, visando a formação ligações covalentes multipontuais entre a enzima e o suporte. Após a incubação, as preparações foram incubadas em um banho termoestabilizado a 55 °C por até 48 h. Ao longo do tempo, a atividade residual foi avaliada pela hidrólise do propionato de *p*-nitrofenila (item 7.1.2).

Como se observa na Figura 2, as preparações previamente incubadas a pH 10 se mostraram mais estáveis ao longo do tempo, provavelmente devido à maior formação de ligações covalentes multipontuais com o suporte nessa condição. As preparações C8-aldeído-LipBC e C12-aldeído-LipBC mantiveram 100% de sua atividade após 48 h de incubação, garantido um aumento significativo na estabilidade, quando comparadas com a enzima livre, que perdeu mais de 50% de

sua atividade inicial em apenas 30 min (FIGURA 2). Esses resultados estão de acordo com a literatura, onde vários trabalhos têm demonstrado maior estabilidade térmica para enzimas imobilizadas, principalmente por ligação covalente, em relação às enzimas livres (BAYRAMOGLU et al., 2011; MATEO et al., 2007ac). Em geral, a maior estabilidade se deve às ligações entre o suporte e a enzima, que garantem uma estrutura tridimensional mais rígida, evitando a quebra das interações responsáveis por manter a conformação ativa, mesmo em temperaturas mais elevadas (MATEO et al., 2000).

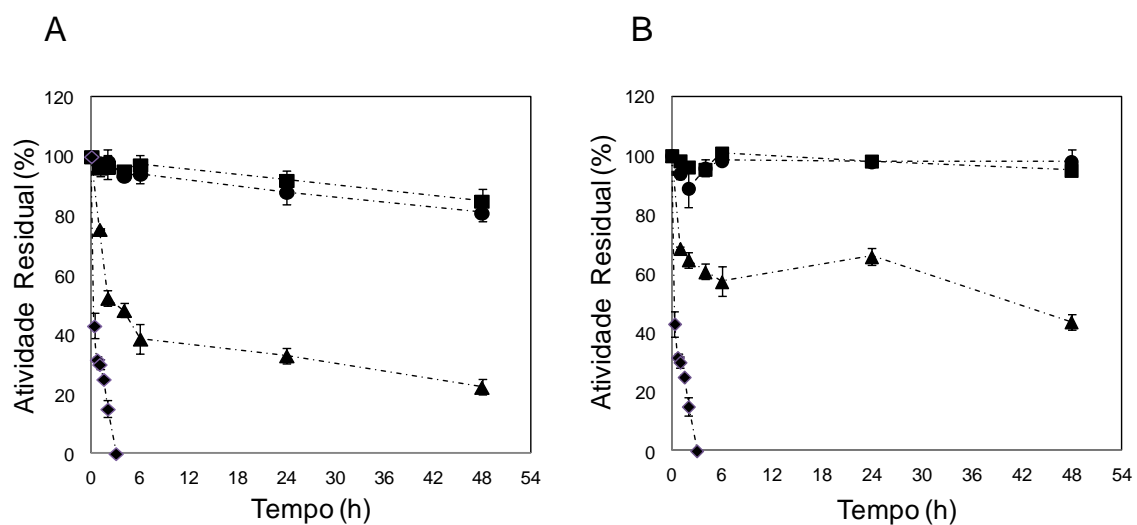


FIGURA 2 - ESTABILIDADE DA LIPASE LipBC LIVRE E IMOBILIZADA FRENTE À TEMPERATURA

(♦) enzima livre; C8-aldeído (●); C12-aldeído (■); C18-aldeído (▲)  
(A): pH 8,5; (B) pH 10.

#### 7.4 CONCLUSÃO

Nesta etapa do trabalho, estudou-se a imobilização da lipase LipBC em diferentes suportes heterofuncionais. A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que o melhor suporte para imobilização de LipBC foi suporte hidrofóbico C12-aldeído, com eficiência de imobilização de 100% em apenas 30 min e uma retenção de atividade de 165%. A preparação C12-aldeído-LipBC manteve 100% de sua atividade após 48 h de incubação a 55 °C, garantido um aumento significativo

na estabilidade quando comparada com a enzima livre, que perdeu mais de 50% de sua atividade inicial em apenas 30 min.

Esses resultados parciais são promissores e motivam a continuação do trabalho em relação a caracterização de LipBC imobilizada nesse suporte, assim como da avaliação de novos suportes para imobilização da lipase LipBC complexada com a foldase LifBC.

## 8. CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudou-se a produção, imobilização e a caracterização das lipases LipC12 e LipBC. Os resultados obtidos sugerem que as lipases LipC12 e LipBC imobilizadas apresentam potencial para serem utilizadas em processos biocatalíticos e fundamentam a continuidade dos estudos com estas enzimas para o desenvolvimento de aplicações de interesse industrial. Em adição, as novas estratégias de imobilização propostas nesse trabalho podem ser aplicadas para sintetizar novos suportes com diferentes grupos funcionais ou utilizando uma matriz diferente da agarose, visando sua aplicação em meio aquoso ou orgânico, obtendo assim, biocatalizadores com propriedades diferenciadas.

Os principais resultados que nortearam esta conclusão foram os seguintes:

- O sequenciamento genômico permitiu a identificação de dois operons distintos (*lipAB* e *lipEF*), contendo genes que codificam para lipases e foldases distintas. A análise do genoma também permitiu a identificação molecular da cepa *Burkholderia contaminans* LTEB11, anteriormente classificada como *Burkholderia cepacia*.
- Os genes *lipA* e *lipB* foram amplificados e clonados em vetores de expressão. Foram realizados testes de expressão e atividade para combinações individuais e co-expressões da lipase e foldase. Os testes de expressão e atividade mostraram que a lipase LipBC precisa ser expressa concomitantemente com a foldase LipBC para exibir atividade. A lipase LipBC foi superexpressa e purificada complexada com a foldase LipBC.
- Os estudos de caracterização da lipase LipBC mostraram que a enzima possui preferência por substratos de cadeia curta (tributirina, 1426 U mg<sup>-1</sup>), e também apresenta atividade para substratos de cadeia longa (óleo de oliva, 845 U mg<sup>-1</sup>). LipBC também apresentou atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH (entre 6,5 a 10) e temperatura (25 - 45 °C).

- LipBC immobilizada no suporte sepabeads apresentou atividade de esterificação na síntese de oleato de etila em *n*-hexano ( $4 \text{ U g}^{-1}$ ), com 90% de conversão em 6 h, o que evidencia seu potencial para aplicação em reações de síntese em meio orgânico.
- Foi desenvolvido uma nova classe de suportes bifuncionais a partir de agarose com grupos hidrofóbicos e aldeídos para imobilização de lipases. Esses suportes possibilitam a imobilização de lipases em sua conformação "aberta" por adsorção a pH 7,0 e a estabilização da enzima nessa conformação através de ligações covalentes formadas entre a enzima e os grupos aldeídos do suporte em pH alcalino. A imobilização da lipase LipC12 nos novos suportes resultou em uma hiperativação em termos de atividade (acima de 300%) e um aumento significativo de estabilidade (acima de 2000 vezes) em comparação uma a enzima livre.
- A preparação C12-aldeído-LipC12 foi aplicada com sucesso na hidrólise regioseletiva do substrato peracetilado D-glucal, apresentando 69% de conversão do produto C-3 mono-desacetilado após 96 h.
- A lipase LipBC foi imobilizada em diferentes suportes heterofuncionais (IDA-aldeído, IDA-Ni<sup>2+</sup>-aldeído, amino-aldeído e alquil-aldeído). A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que o melhor suporte para imobilização de LipBC foi suporte hidrofóbico C12-aldeído. Nesse suporte foi obtido uma retenção de atividade de 165% e a preparação C12-aldeído-LipBC manteve 100% de sua atividade após 48 h de incubação a 55 °C.

## 9. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas de utilização das lipases LipC12 e LipBC imobilizadas em processos biocatalíticos. Portanto, sugerem-se como estudos futuros:

- Clonagem, co-expressão e caracterização da lipase e foldase descritas no operon *lipEF* indentificado no genoma de *Burkholderia contaminans* LTEB 11;
- A utilização de diferentes materiais (celulose, sílica ou resinas acrílicas) como suportes para ativação com os grupos funcionais propostos nesse trabalho, visando à sua utilização em meios orgânicos.
- A imobilização de novas enzimas (lipases, esterases e quitinases) obtidas por prospecção metagenômica recentemente no grupo de pesquisa nos novos suportes descritos.
- Realização de ensaios de cristalização da lipase LipBC complexada com a foldase LipBC e determinar a estrutura tridimensional do complexo, com o objetivo de obter mais informações a respeito da interação lipase-foldase que possa contribuir para novos estudos de imobilização.



## 10. REFERÊNCIAS

- AKBARI, N.; KHAJEH, K.; REZAI, S.; et al. High-level expression of lipase in *Escherichia coli* and recovery of active recombinant enzyme through in vitro refolding. **Protein Expression and Purification**, v. 70, n. 1, p. 75–80, 2010.
- ALI, Y. BEN; CHAHINIAN, H.; PETRY, S.; et al. Might the kinetic behavior of hormone-sensitive lipase reflect the absence of the lid domain? **Biochemistry**, v. 43, n. 29, p. 9298–9306, 2004.
- ALMEIDA, R. V.; BRANCO, R. V.; PEIXOTO, B.; LIMA, C. S.; ALQUERES, S. M. C.; MARTINS, O. B.; ANTUNES, O. A. C.; FREIRE, D. M. G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 531-537, 2008
- ALNOCH, R. C.; MARTINI, V. P.; GLOGAUER, A.; et al. Immobilization and characterization of a new regioselective and enantioselective lipase obtained from a metagenomic library. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–18, 2015.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257–270, 2016.
- BARON, A. M.; BAROUH, N.; BAREA, B.; et al. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. **Fuel**, v. 117, n. PART A, p. 458–462, 2014.
- BARON, A. M.; ZAGO, E. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, n. 1, p. 19–24, 2011.
- BARON, A.M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Curitiba, 2008. 154 p. Tese (Doutorado em Química)–Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; et al. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486–493,

1998.

BAWEJA, M.; NAIN, L.; KAWARABAYASI, Y.; SHUKLA, P. Current technological improvements in enzymes toward their biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 1–13, 2016.

BAYRAMOGLU, G.; HAZER, B.; ALTINTAS, B.; ARICA, M. Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 372-378, 2011.

CABRERA, Z.; PALOMO, J. M. Enantioselective desymmetrization of prochiral diesters catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 22, n. 24, p. 2080–2084, 2011.

CARVALHO, A. C. L. D. M.; FONSECA, T. D. S.; MATTOS, M. C. DE; et al. Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 29682–29716, 2015.

CHOW, J.; KOVACIC, F.; ANTONIA, Y. D.; et al. The Metagenome-Derived Enzymes LipS and LipT Increase the Diversity of Known Lipases. **PLoS ONE**, v. 7 :-10., n. 10, 2012.

CYCLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, n. 1992, p. 3–27, 1997.

DAIHA, K. DE G.; ANGELI, R.; OLIVEIRA, S. D. DE; ALMEIDA, R. V. Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0131624, 2015.

DECASTRO, M. E.; RODRIGUEZ-BELMONTE, E.; GONZALEZ-SISO, M. I. Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozyms. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–21, 2016.

ELEND, C.; SCHMEISSER, C.; LEGGEWIE, C.; et al. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 5, p. 3637–3645, 2006.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4 ed. Springer: Berlin, 2000.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; et al. Esterification and

transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 1, p. 8–13, 2007.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISAN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 185–197, 1998.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; et al. Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 9, p. 2610–2615, 2006.

FILICE, M.; GUIBAN, J. M.; TERRENI, M.; PALOMO, J. M. Regioselective monodeprotection of peracetylated carbohydrates. **Nature protocols**, v. 7, n. 10, p. 1783–96, 2012. Nature Publishing Group.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, n. 8, p. 1721–1754, 2007.

GLOGAUER, A.; MARTINI, V.; FAORO, H.; et al. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 54, 2011.

GUIBAN, J. M.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; et al. Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: Adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 11, n. 4–6, p. 817–824, 2001.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–781, 2004.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured

- microorganisms. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, n. 4, p. 669–685, 2004.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245–R249, 1998.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.
- HOBSON, A. H.; BUCKLEY, C. M.; AAMAND, J. L.; et al. Activation of a bacterial lipase by its chaperone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 12, p. 5682–5686, 1993.
- HOLMQUIST, M.; TESSIER, D. C.; CYGLER, M. Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II. **Biochemistry**, v. 36, n. 48, p. 15019–15025, 1997.
- JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; et al. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1994.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315–+, 1999.
- JORGENSEN, S.; SKOV, K. W.; DIDERICHSEN, B. Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: Lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 559–567, 1991.
- KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, p.1525-1530, 2005.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012a.
- KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas-cepacia*, and lipase from *Candida-rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2656–2665,

1991.

KIM, Y. H.; KWON, E. J.; KIM, S. K.; et al. Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 1, p. 45–49, 2010.

KLIBANOV, A. M. in Organic Solvents. **Nature**, v. 409, n. January, p. 9–11, 2001.

KOJIMA, Y.; KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, S. A novel lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380: gene cloning, overproduction, renaturation-activation, two-step purification, and characterization. **J Biosci Bioeng**, v. 96, n. 3, p. 242–249, 2003.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; et al. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 279–286, 2004.

KUMAR, R.; BANOTH, L.; BANERJEE, U. C.; KAUR, J. Enantiomeric separation of pharmaceutically important drug intermediates using a Metagenomic lipase and optimization of its large scale production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 995–1003, 2017.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; et al. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, n. 1–3, p. 53–61, 2004.

MADALOZZO, A. D.; MARTINI, V. P.; KUNIYOSHI, K. K.; et al. Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 45–51, 2015.

MADALOZZO, A. D.; MARTINI, V. P.; KUNIYOSHI, K. K.; et al. Synthesis of flavor esters and structured lipids by a new immobilized lipase, LipC12, obtained from metagenomics. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, n. August, p. 294–300, 2016.

MADAN, B.; MISHRA, P. Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas aeruginosa* to a functional lipase in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 597–604, 2010.

MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S. DOS; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015.

MARCIELLO, M.; FILICE, M.; PALOMO, J. M. Different strategies to enhance the activity of lipase catalysts. **Catalysis Science & Technology**, v. 2, n. 8, p. 1531, 2012.

MARTINI, V. P.; GLOGAUER, A.; MÜLLER-SANTOS, M.; et al. First co-expression of a lipase and its specific foldase obtained by metagenomics. **Microbial cell factories**, v. 13, p. 171, 2014.

MATEO, C.; GRAZU, V.; PALOMO, J. M.; et al. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1022–1033, 2007a.

MATEO, C.; GRAZÚ, V.; PESSELA, B. C. C.; et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. Pt 6, p. 1593–1601, 2007b.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007c.

MATEO, C.; BOLIVAR, J. M.; GODOY, C. A.; et al. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 3112–3117, 2010.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509–515, 2000.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

MOKOENA, N.; MATHIBA, K.; TSEKOA, T.; STEENKAMP, P.; RASHAMUSE, K.

Functional characterisation of a metagenome derived family VIII esterase with a deacetylation activity on Beta-lactam antibiotics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 437, n. 3, p. 342–348, 2013.

MOURE, V. R.; FABRÍCIO, C.; FRENSCH, G.; et al. Enhancing the enantioselectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 towards the resolution of secondary allylic alcohols. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, , n. 0, 2014.

OGINO, H.; KATOU, Y.; AKAGI, R.; et al. Cloning and expression of gene, and activation of an organic solvent-stable lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Extremophiles**, v. 11, n. 6, p. 809–817, 2007.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; et al. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Eng**, v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.

PALOMO, J. M. Lipases enantioselectivity alteration by immobilization techniques. **Current Bioactive Compounds**, v. 4, p. 126–138, 2008.

PALOMO, J. M.; MUNOZ, G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 19, p. 279–286, 2002.

PAQUES, F.W; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, n.1, p. 93-99, 2006.

PAUWELS, K.; LUSTIG, A.; WYNS, L.; et al. Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 4, p. 374–375, 2006.

PENG, P.; LIN, J.; WEI, D. Co-expression of an organic solvent-tolerant lipase and its cognate foldase of *Pseudomonas aeruginosa* CS-2 and the application of the immobilized recombinant lipase. **Appl Biochem Biotechnol**, v.165, p.926- 937, 2011.

ROH, C.; VILLATTE, F. Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 116–123, 2008.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; et al. Cloning the soil

metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2541–2547, 2000.

ROSENAU, F.; TOMMASSEN, J.; JAEGER, K.-E. Lipase-Specific Foldases. **Chembiochem**, v. 5, n. 2, p. 152–161, 2004. WILEY-VCH Verlag.

RUEDA, N.; ALBUQUERQUE, T.; BARTOLOME-CABRERO, R.; et al. Reversible Immobilization of Lipases on Heterofunctional Octyl-Amino Agarose Beads Prevents Enzyme Desorption. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 646, 2016.

RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S. DOS; ORTIZ, C.; et al. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. **Catalysis Today**, v. 259, p. 107–118, 2016. Elsevier B.V.

SAHOO, R. K.; KUMAR, M.; SUKLA, L. B.; SUBUDHI, E. Bioprospecting hot spring metagenome: lipase for the production of biodiesel. **Environmental science and pollution research international**, 2016. Environmental Science and Pollution Research.

SALUM, T. F. C.; BARON, A. M.; ZAGO, E.; et al. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 3, p. 197–203, 2008.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; et al. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1348–1354, 2010.

SANTOS, J. C. S. DOS; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; et al. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 2015.

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

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. Pt 6, p. 1583–1587, 2007.

SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A. G.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical



water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15–23, 2013.

SOARES, C. M.; CASTRO, H. F.; MORAES, F., F.; ZANIN, G., M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 745-57, v. 77-9, 1999.

SUESCUN, A.; RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S. DOS; et al. Immobilization of lipases on glyoxyl-octyl supports: Improved stability and reactivation strategies. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1211–1217, 2015.

TRAUB, P. C.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMITT, J.; SCHMID, R. D. Gene synthesis, expression in *E. coli*, and in vitro refolding of *Pseudomonas* sp. KWI 56 and *Chromobacterium viscosum* lipases and their chaperones. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 2, p. 198–204, 2001.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; et al. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 102–111, 2009.

VERGER, R. “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, 1997.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.

WU, X.; YOU, P.; SU, E.; et al. In vivo functional expression of a screened *P. aeruginosa* chaperone-dependent lipase in *E. coli*. **BMC biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 58, 2012. BMC Biotechnology.

YADAV, G.D.; JADHAV, S.R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transterification in non-aqueous medium. **Microsporous and Mesoporous Materials**, v. 86, p. 215-222, 2005.

ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable**

**and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182–197, 2015.

ZHENG, J.; LIU, C.; LIU, L.; JIN, Q. Characterisation of a thermo-alkali-stable lipase from oil-contaminated soil using a metagenomic approach. **Syst Appl Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 197–204, 2013.