

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WELTON AURELIO OLIVEIRA DE ANHAIA

ANÁLISES *IN SILICO*, COEXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE
UMA NOVA LIPASE DE *Burkholderia contaminans* LTEB11

CURITIBA
2021

WELTON AURELIO OLIVEIRA DE ANHAIA

ANÁLISES *IN SILICO*, COEXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE
UMA NOVA LIPASE DE *Burkholderia contaminans* LTEB11

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Nadia Krieger

Coorientador: Dr. Robson Carlos Alnoch

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Anhaia, Welton Aurelio Oliveira de

Análises *in silico*, coexpressão e caracterização preliminar de uma nova lipase de *Burkholderia contaminans* LTEB11. / Welton Aurelio Oliveira de Anhaia. – Curitiba, 2021.

87 p.: il.

Orientadora: Nadia Krieger.

Coorientadora: Robson Carlos Alnoch .

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Lipase. 2. Burkholderia. 3. Expressão gênica. 4. Simulação por computador. I. Título. II. Krieger, Nadia. III. Alnoch, Robson Carlos. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

CDD (22. ed.) 572.757



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **WELTON AURELIO OLIVEIRA DE ANHAIA** intitulada: **ANÁLISES IN SILICO, COEXPRESSION E CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE UMA NOVA LIPASE DE *Burkholderia contaminans* LTEB11**, sob orientação da Profa. Dra. NADIA KRIEGER, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

01/09/2021 17:22:16.0

NADIA KRIEGER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/09/2021 14:24:53.0

BEATRIZ GOMES GUIMARAES

Avaliador Interno (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Assinatura Eletrônica

01/09/2021 12:19:54.0

VIVIAN ROTUNO MOURE VALDAMERI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 109092

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 109092

AGRADECIMENTOS

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

Ao doutor Robson Carlos Alnoch por toda a ajuda na realização deste trabalho, pela orientação e por todos os conselhos que me fizeram crescer como profissional e como pessoa. E principalmente, muito obrigado pela sua paciência.

À doutora Janaína Marques de Almeida pela ajuda, orientação e conselhos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia Fermentativa e Enzimática e também do LTEB. Todos contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Meus agradecimentos especiais vão ao doutorando Gleydison Soares pela valorosa ajuda durante os ensaios analíticos e cinéticos, além de todas as discussões linguísticas e risadas. Ao doutorando Leonardo Pelizzari por todas as dicas e conselhos que me ajudaram muito no entendimento de processos laboratoriais.

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

Aos membros da Banca Examinadora, Beatriz Guimaraes, Vivian Moure e Jorge Iulek pelas valiosas contribuições

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

À Fernanda, a mulher que sempre esteve ao meu lado durante os melhores e piores momentos da minha vida. Sendo a pessoa doce que cuidou de mim em todos esses anos e também sendo meu porto seguro quando eu mais precisei. Sem você eu não estaria onde estou hoje. Te amo até o fim.

Aos meus pais Dona Jô e Seu Bordeaux por todo o suporte durante toda minha vida, as minhas irmãs pelas conversas e ajuda. Agradeço a todos vocês pelo meu maior presente.

Aos meus sogros Dona Marta e Seu Pedro por toda a ajuda e por terem me acolhido como um filho.

*“Keep a little fire burning; however
small, however hidden.”*

Cormac McCarthy

RESUMO

Esta dissertação relata análises *in silico* e a expressão e caracterização de lipase e foldase produzidas por *Burkholderia contaminans* LTEB11. O trabalho consistiu, na parte *in silico*, das análises de sequência, modelagem por homologia e análise filogenética; na parte laboratorial, consistiu de ensaios de clonagem, expressão e caracterização de lipase denominada LipE e sua foldase correlata, LifE. As análises de sequência mostraram que os genes *lipE* e *lifE* estão localizados dentro de um operon denominado *lipEF* e a construção do modelo de homologia mostrou que LipE possui a topologia α/β -hidrolase característica de lipases, além de presença de uma “*lid*” formada pela α -hélice $\alpha 5$. Análises de estrutura secundária demonstraram que LipE apresenta características típicas de lipases, como o pentapeptídeo conservado, a tríade catalítica, no caso de LipE formada pelos resíduos His²⁸⁴, Ser⁸⁶ e Asp²⁶², além de um sítio de ligação ao Ca²⁺ e dois resíduos de cisteína, indicando a existência de uma ponte dissulfeto. As análises filogenéticas classificaram LipE na subfamília I.2 de lipases bacterianas, que apresentam a necessidade de uma foldase específica para o correto enovelamento. Ensaios de *cross-refolding* com foldases relacionadas mostraram que apenas outra foldase produzida por *B. contaminans* LTEB11, LifBC, foi capaz de ativar LipE. LipE e LifE foram coexpressas usando os vetores pET-28a e pT7-7, respectivamente. A clonagem foi satisfatória, com clones apresentando atividade em placas de Petri contendo tributirina. Entretanto, depois da expressão, o extrato contendo o complexo LipE-LifE apresentou baixa atividade de hidrólise contra ésteres de *p*-nitrofenila (0,01 a 0,04 U mg⁻¹), e nenhuma atividade contra triglicerídeos em meio líquido, indicando a necessidade de otimização da expressão de LipE para possibilitar sua correta caracterização.

Palavras-chave: Lipases; foldases; *Burkholderia contaminans*; coexpressão; análises *in silico*.

ABSTRACT

This dissertation reports *in silico* analyses and the expression and characterization of lipase and foldase produced by *Burkholderia contaminans* LTEB11. The work consisted, in the *in silico* part, of sequence analysis, homology modeling and phylogenetic analysis; in the laboratory part, it consisted of cloning, expression and characterization assays of a lipase called LipE and its correlated foldase, LifE. Sequence analysis showed that *lipE* and *lifE* genes are located within an operon called *lipEF* and the construction of the homology model showed that LipE has the α/β -hydrolase fold characteristic of lipases, in addition to the presence of a formed "lid" by the α -helix $\alpha 5$. Secondary structure analyzes showed that LipE has characteristics typical of lipases, such as the conserved pentapeptide, the catalytic triad, in the case of LipE formed by residues His²⁸⁴, Ser⁸⁶ and Asp²⁶², in addition to a Ca²⁺ binding site and two cysteine residues, indicating the existence of a disulfide bridge. Phylogenetic analyzes classified LipE in the I.2 subfamily of bacterial lipases, which need the presence of a specific foldase for correct folding. Cross-refolding assays with related foldases showed that only another foldase produced by *B. contaminans* LTEB11, LifBC, was able to activate LipE. LipE and LifE were co-expressed using vectors pET-28a and pT7-7, respectively. Cloning was satisfactory, with clones showing activity in Petri dishes containing tributyrin. However, after expression, the extract containing the LipE-LifE complex showed low hydrolysis activity against *p*-nitrophenyl esters (0.01 to 0.04 U mg⁻¹), and no activity against triglycerides in liquid medium, indicating the need for optimization of LipE expression to enable its correct characterization.

Keywords: Lipases; foldases; *Burkholderia contaminans*; coexpression; *in silico* analyses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações catalisadas por lipases.....	14
Figura 2. Estrutura de lipases.....	16
Figura 3. Sítio de ligação ao Ca ⁺² da lipase de Burkholderia cepacia.....	17
Figura 4. Complexo lipase-foldase.....	18
Figura 5. Mecanismo de secreção de lipases em bactérias gram-negativas..	20
Figura 7. Alinhamento de sequências da lipase LipE e análise de características entre lipases da subfamília 1.2.....	42
Figura 8. Domínio MD1 de foldases.	43
Figura 9. Alinhamento da foldase LifE com estruturas secundárias de foldases da família II....	45
Figura 10. Análise filogenética da lipase LipE e de sua foldase específica, LifE.....	47
Figura 11. Análise estrutural por homologia da lipase LipE.	48
Figura 12. Gráfico de Ramachandran para a lipase LipE	50
Figura 13. Análise estrutural por homologia da foldase LifE.....	51
Figura 14. Sobreposição da foldase LifE com o domínio MD1 da foldase de Pseudomonas aeruginosa (PDB: 5OVM).	52
Figura 15. Gráfico de Ramachandran checando a qualidade das interações estereoquímicas entre os resíduos da proteína.....	53
Figura 16. Eletroforese SDS-PAGE das frações solúveis dos produtos de expressão dos ensaios de cross-refolding da lipase LipE com diferentes foldases.	55
Figura 17. Gel de eletroforese em agarose para confirmação da liberação do gene lifE do vetor pET-28a.....	56
Figura 18. Controles dos testes de ligação do gene lipE no vetor pT7-7.	57
Figura 19. Colônias de Escherichia coli transformadas com o produto da ligação.....	58
Figura 20. Triagem por clones positivos em gel de agarose.	59
Figura 21. Eletroforese SDS-PAGE com amostras das construções das expressões de LipE.	60
Figura 22. Determinação da atividade da lipase LipE em placa com tributirina	61
Figura 23. Atividade de da lipase LipE contra substratos sintéticos.....	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Amp – Ampicilina

D.O. – Densidade Ótica

IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Km - Canamicina

LA - Meio de cultivo com ágar

LB - Meio de cultivo Luria Bertani

LifE – Foldase de *B. contaminans* LTEB11

lifE – Gene de LifE

LipE – Lipase de *B. contaminans* LTEB11

lipE – Gene de LipE

p-NPA - Acetato de *p*-nitrofenila

p-NPB - Butirato de *p*-nitrofenila

p-NPP - Palmitato de *p*-nitrofenila

Rpm – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 LIPASES	13
2.1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS	13
2.1.2 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE LIPASES	15
2.2 FAMÍLIA DE LIPASES BACTERIANAS E FOLDASES ESPECÍFICAS DE LIPASES	18
2.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE LIPASES	26
2.4.1 Lipases de <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11	28
2.4.2 NOVAS LIPASES DE <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 REAGENTES E MATERIAIS CONSUMÍVEIS	32
4.1.1 VETORES E MICRORGANISMOS	32
4.1.2 MEIOS DE CULTIVO.....	33
4.1.3 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO.....	33
4.1.4 OBTENÇÃO DOS GENES <i>lipE</i> e <i>lifE</i>	33
4.1.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	34
4.1.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	35
4.1.7 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EXTRAÍDOS DO GEL DE AGAROSE.....	35
4.1.8 PREPARAÇÃO DO VETOR PLASMIDIAL PARA LIGAÇÃO.....	35
4.2 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DO GENE <i>lifE</i> NO VETOR pT7-7.....	35
4.3 ENSAIOS DE EXPRESSÃO E COEXPRESSÃO	36
4.4 PURIFICAÇÃO de LipE	37
4.5 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	37
4.5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA	37
4.5.2 MODELAGEM ESTRUTURAL POR HOMOLOGIA.....	37
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
4.6.1 ELETROFORESE SDS-PAGE.....	38
4.6.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 ANÁLISES DE SEQUÊNCIA DOS GENES <i>lipE</i> e <i>lifE</i>	40

5.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	46
5.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DA LIPASE LipE.....	47
5.3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA LIPASE LipE	49
5.3.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DA FOLDASE LifE.....	50
5.4 ENSAIOS DE <i>CROSS-REFOLDING</i>	54
5.5 COEXPRESSION DA LIPASE LipE COM SUA FOLDASE ESPECÍFICA, LifE	55
5.5.1 SUBCLONAGEM DO GENE <i>lifE</i> EM VETOR pT7-7	55
5.6 ENSAIOS DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DA LIPASE E FOLDASES UTILIZADAS NESTE TRABALHO.....	59
5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LipE POR HIDRÓLISE DE TRIBUTIRINA EM PLACA DE PETRI	60
5.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE LipE.....	61
6 CONCLUSÕES	63
7. PERSPECTIVAS	65
8 REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que hidrolisam triglicerídeos de cadeia longa em meio aquoso. Essas enzimas são importantes em processos biotecnológicos e industriais pois apresentam grande versatilidade, podendo ser empregadas em diversas áreas, como por exemplo na produção de detergentes, na resolução de racematos para produção de fármacos enantiomericamente puros, em alimentos e na produção combustíveis ambientalmente amigáveis (EL KHATTABI et al., 1999). As lipases microbianas despertam maior interesse devido à sua facilidade de produção e obtenção em larga escala e são vantajosas quando comparadas com lipases extraídas de fontes vegetais e animais, demonstrando maior atividade e estabilidade em solventes orgânicos (GUPTA et al., 2004). Esses aspectos impulsionam a busca por lipases para aplicação em processos industriais. Uma dificuldade que se mostra importante na obtenção de lipases ativas é a necessidade de interação com foldases (Lif), das quais algumas lipases porém, nem todas, dependem para que não formem agregados insolúveis chamados de corpos de inclusão (ROSENAU et al., 2004). Para superar essa dificuldade, uma abordagem utilizada para se obter a lipase ativa é a coexpressão da lipase com sua foldase cognata. Nessa abordagem, o gene que codifica para uma lipase é expresso juntamente com o gene que codifica para uma foldase, sendo mais simples quando comparada com o renovelamento *in vitro*, no qual a lipase e foldase são expressas separadamente e então misturadas *in vitro* para a obtenção da lipase ativa (MADAN e MISHRA, 2010). O conhecimento das características estruturais pode possibilitar estudos sobre a otimização de lipases utilizando a engenharia de proteínas e mutações sítio dirigidas para o melhoramento de propriedades enzimáticas, como atividade, estabilidade e especificidade da lipase. A lipase LipBC produzida por *Burkholderia contaminans* LTEB11 foi isolada como contaminação de um meio de cultura suplementado com óleo vegetal (LIMA et al., 2004). Trabalhos iniciais empregando LipBC mostrou que essa lipase possui características promissoras do ponto de vista biotecnológico como, termoestabilidade, alta atividade contra triglicerídeos naturais de cadeia longa, além de estabilidade em amplo espectro de pH e também em diferentes solventes orgânicos (ALNOCH et al., 2018; LIMA et al., 2004; SALUM et al., 2008). LipBC também apresentou ótimos resultados quando imobilizada e empregada na síntese de oleato de etila e reações de transesterificação do óleo de mamona. Além disso, LipBc demonstrou ser promissora no quesito enantiosseletividade demonstrando resultados de resolução equiparáveis aos obtidos quando utilizados lipases comerciais (MOURE et al., 2014).

Assim, este trabalho teve como objetivo realizar análises *in silico*, expressar e caracterizar LipE e sua foldase cognata LifE de *Burkholderia contaminans* LTEB11.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIPASES

2.1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Lipídeos estão entre as melhores fontes de alimento para os seres vivos, principalmente por serem estáveis quando armazenados, servindo como estoque de energia para o funcionamento do organismo. Prova da importância dessas moléculas é a presença de lipases em todos os reinos biológicos. Lipases são enzimas que catalisam a reação essencial da hidrólise reversível de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos na interface água-lipídeo (GUPTA et al., 2004). Além da importância biológica das lipases, elas despertam grande interesse na área biotecnológica, pois apresentam características importantes como régio-, quimio- e enantiosseletividade, além de exibirem alta versatilidade de substratos sendo utilizadas em diversos ramos da indústria, desde a produção de laticínios na área alimentícia, passando pela síntese de compostos químicos e resolução de racematos na química farmacêutica, chegando até a indústria de combustíveis, na produção de biodiesel (TAN et al., 2010). As lipases oriundas de microrganismos são as mais utilizadas em biotecnologia devido à maior facilidade de produção em larga escala, além de demonstrarem alta atividade e estabilidade em solventes orgânicos (GUPTA et al., 2004). A lipase B produzida por *Candida antarctica* (CALB) é a mais utilizada em processos biotecnológicos e industriais, visto a grande quantidade de patentes registradas utilizando esta enzima em diferentes processos. Existem ainda muitos gêneros produtores de lipases e fosfolipases com características específicas que as tornam atraentes do ponto de vista industrial e tecnológico, dentre os quais se destacam: *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces*, seguidos por *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* e *Arthrobacter* (CHANDRA et al., 2020).

Além das reações de hidrólise, as lipases podem catalisar a reação reversa, ou seja, a síntese de ésteres em meios com baixos teores de água (Figura 1) (GUPTA et al 2004). A reação de síntese de ésteres catalisada por lipases tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, pois compostos como triglicerídeos, ésteres de cadeia curta e esteróides podem ser utilizados como fonte de energia, emulsificantes e flavorizantes (LANGRAND et al., 1990) As lipases podem hidrolisar o triglicerídeo randomicamente ou apresentar especificidade posicional (regiosseletividade). Lipases específicas oferecem aplicações industriais mais vantajosas, pois produzem lipídeos com estrutura e propriedades específicas (SONNET e GAZZILLO, 1991).

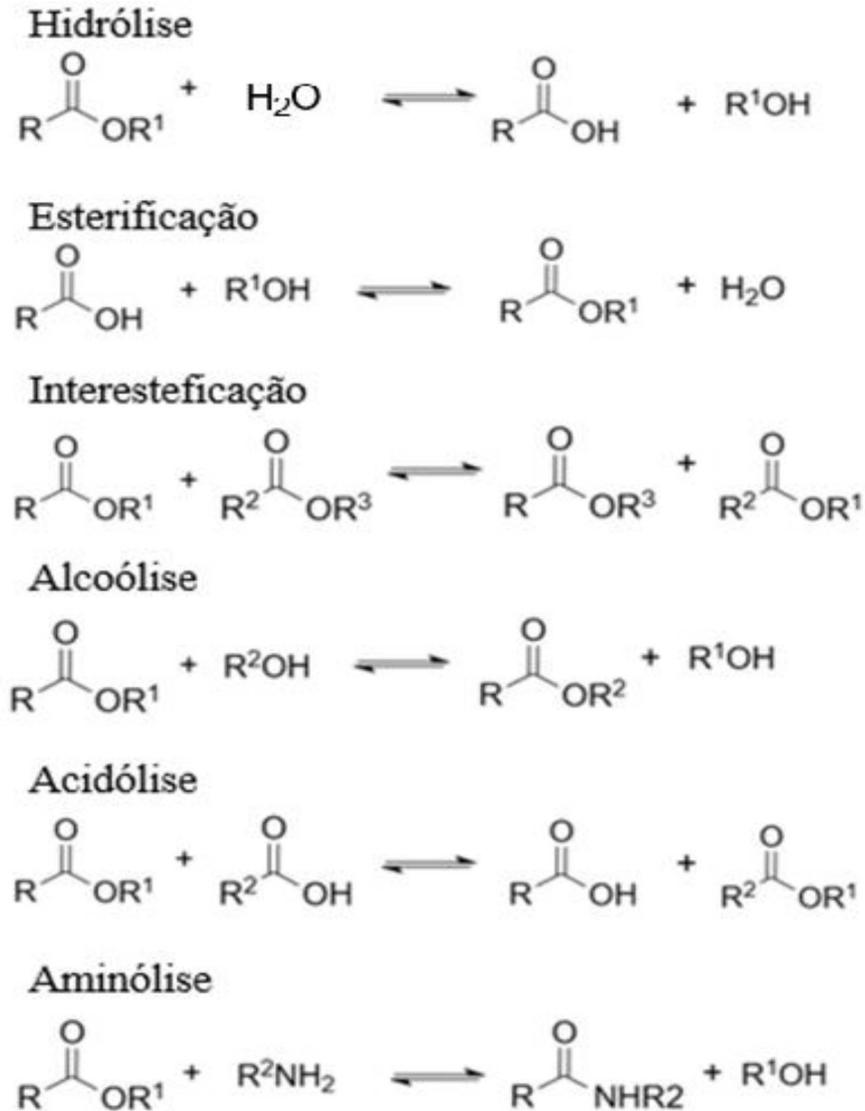


FIGURA 1 - REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES.

O sentido da reação é ditado pela presença da água no meio reacional deslocando a reação para direita (hidrólise) ou esquerda (síntese). FONTE: “O Autor” (2021).

A sequência de aminoácidos determina a conformação assumida pela proteína, porém, para algumas enzimas, é necessária a interação de proteínas acessórias, chamadas chaperonas, para o enovelamento correto; no caso de lipases, estas chaperonas são denominadas de foldases (Lif, *Lipase-specific foldase*) (JAEGER et al., 1994). É importante destacar que foldases e chaperonas são proteínas com funções similares, mas que podem apresentar diferenças: foldases catalisam isomerações e montagem de construções proteicas, já as chaperonas estão

envolvidas no enovelamento. Foldases catalisam isomerações e montagem de construções, já as chaperonas estão envolvidas no enovelamento apenas de polipeptídeos não catalíticos (SINGH et al., 2018).

2.1.2 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE LIPASES

Desde 1990, inúmeras estruturas de lipases bacterianas foram elucidadas (ARPIGNY e JAEGER 1999). As lipases geralmente apresentam a topologia característica conhecida como α/β -hidrolase, onde o *core* da proteína é composto por regiões em conformação de β -fita rodeado por regiões em conformação α -hélice (Figura 2). Geralmente, as enzimas que têm a topologia α/β -hidrolase possuem seus sítios catalíticos compostos por três grupos funcionais sendo eles: um resíduo nucleofílico de serina (Ser), um resíduo de histidina (His) e o terceiro resíduo que pode ser um resíduo de aspartato (Asp) ou glutamato (Glu). Frequentemente, a Ser catalítica está localizada dentro de um pentapeptídeo que consiste de GXSXG, onde o X representa qualquer resíduo de aminoácido, com a serina projetada no arranjo espacial, formando a estrutura conhecida como “cotovelo nucleofílico” (DAVID et al., 1992).

Uma característica notável da estrutura de algumas lipases é a presença de uma hélice anfipática que se projeta sobre o sítio catalítico cobrindo-o e impedindo o acesso do substrato à tríade catalítica. Essa estrutura denominada de tampa ou *lid* foi observada em muitas lipases que tiveram sua estrutura elucidada, tendo sido atribuída a ela a razão de lipases exibirem o fenômeno de ativação interfacial, que é o fenômeno de indução de mudanças na conformação estrutural da lipase ao entrar em contato com uma interface lipídica, ocasionando aumento na atividade; porém, os mecanismos envolvidos nesse fenômeno não foram ainda bem esclarecidos (VERGER et al., 1998).

No entanto, existem casos em que lipases possuem *lid*, mas não demonstram ativação interfacial, fazendo com que a *lid* não possa ser usada como um fator imprescindível para a existência de ativação interfacial (VERGER et al., 1998). Apesar disso, a *lid* desempenha um papel complexo na atividade, na estabilidade conformacional e na especificidade da lipase. Isto foi demonstrado por Secundo et al. (2006), que realizaram mutações na sequência da *lid*, produzindo mudanças fisiológicas em lipases microbianas, porém que também acarretaram em diminuição da atividade catalítica em alguns casos. O domínio *lid* tem sido estudado há bastante tempo. Prova disso é o trabalho de Dugi et al. (1995) onde lipases quiméricas foram construídas

usando lipase hepática (HL) com a *lid* de uma lipase lipoproteica (LPL) e vice-versa, visando o estudo da função da *lid* sobre a atividade da lipase contra triglicerídeos e fosfolípidos como substratos. LPL quimérica que continha a *lid* de HL teve sua atividade de hidrólise contra triglicerídeos reduzida, mas se mostrou eficiente contra fosfolípidos. Por sua vez, HL foi mais ativa contra triglicerídeos do que contra fosfolípidos. Esse estudo mostrou como a atividade contra determinados substratos pode ser influenciada intercambiando-se os domínios *lid* das lipases. Em 2003, Brocca *et al* produziram uma lipase de *Candida rugosa* (CRL) 1 que tinha em sua estrutura um domínio *lid* oriundo de outra lipase de *C. rugosa* (CRL3). Essa lipase mutante apresentou atividade de hidrólise 200 vezes maior contra ésteres de colesterol quando comparada com a lipase selvagem, mostrando que o domínio *lid* também tem papel central na atividade contra ésteres de colesterol. Khan *et al.* (2017) publicaram um excelente artigo de revisão abordando o papel do domínio *lid* em diferentes características apresentadas pelas lipases.

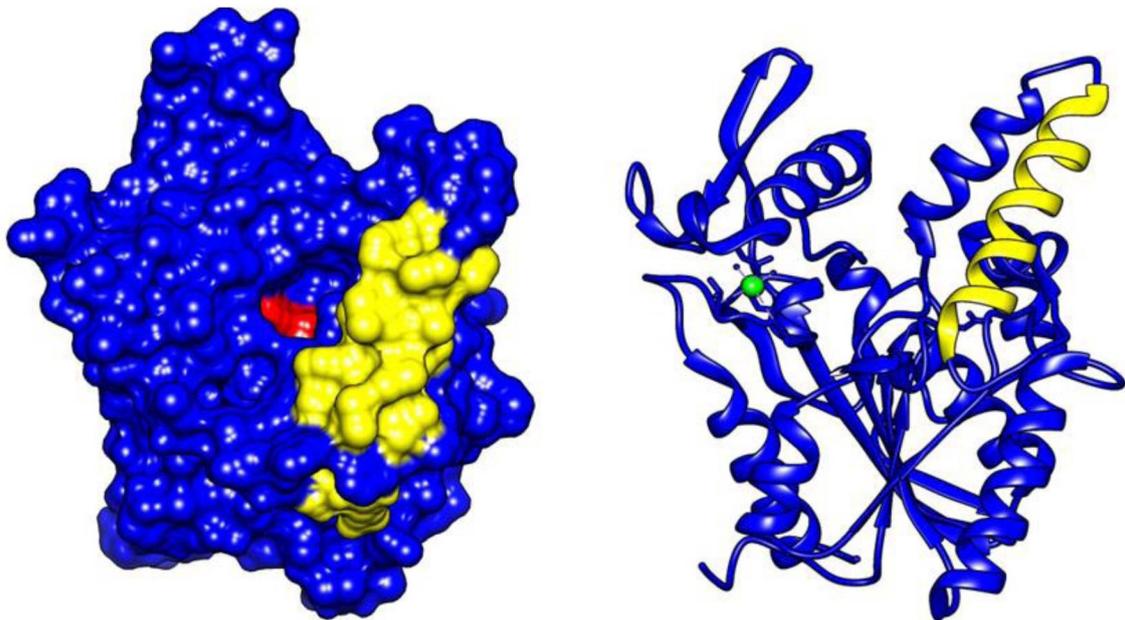


FIGURA 2 - ESTRUTURA DE LIPASES.

Em amarelo, está representada a *lid* deslocada para permitir acesso à cavidade catalítica. Em vermelho, está representada a região da tríade catalítica. O íon Ca^{2+} está representado como uma esfera verde. Imagem gerada utilizando o programa CHIMERA. Modelo de LipE (dados não publicados). FONTE: “O Autor” (2021).

Aproximadamente 40% das proteínas conhecidas, inclusive lipases (Figuras 2, 3), necessitam de cofatores metálicos baseando-se em análise no *protein data bank* (PDB) (LOVELL *et al.*, 2003), sendo o íon Ca^{2+} o mais comumente encontrado em diversos processos

metabólicos, e que pode desempenhar um papel fundamental da termostabilidade de lipases bacterianas (PAPALEO et al., 2011).

Outra característica geralmente encontrada em lipases extracelulares e que tem influência na termoestabilidade é a presença de resíduos de cisteína (Cys), em regiões conservadas da sequência de aminoácidos, que podem se ligar formando pontes dissulfeto. Essa ligação entre resíduos de Cys tem sido foco de estudo de trabalhos que mostram a importância da formação da ponte dissulfeto na estabilidade, dobramento e até mesmo na expressão de lipases em vetores heterólogos (YANG et al., 2000). A ponte dissulfeto se mostrou importante no transporte da enzima através da membrana. Isso foi relatado por Liebeton et al. (2001), para lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, que necessita da *Lif* para o seu correto enovelamento: mutantes com os resíduos de Cys substituídos por resíduos de Ser não foram detectadas no sobrenadante da cultura, indicando que a lipase não foi secretada. Porém, quando esses mutantes foram submetidos a ensaios de *refolding*, as lipases mutantes apresentavam a conformação ativa, mesmo na ausência da ponte dissulfeto. Portanto, a interação entre a lipase e sua foldase não depende da presença de uma ponte dissulfeto (LIEBETON et al., 2001).

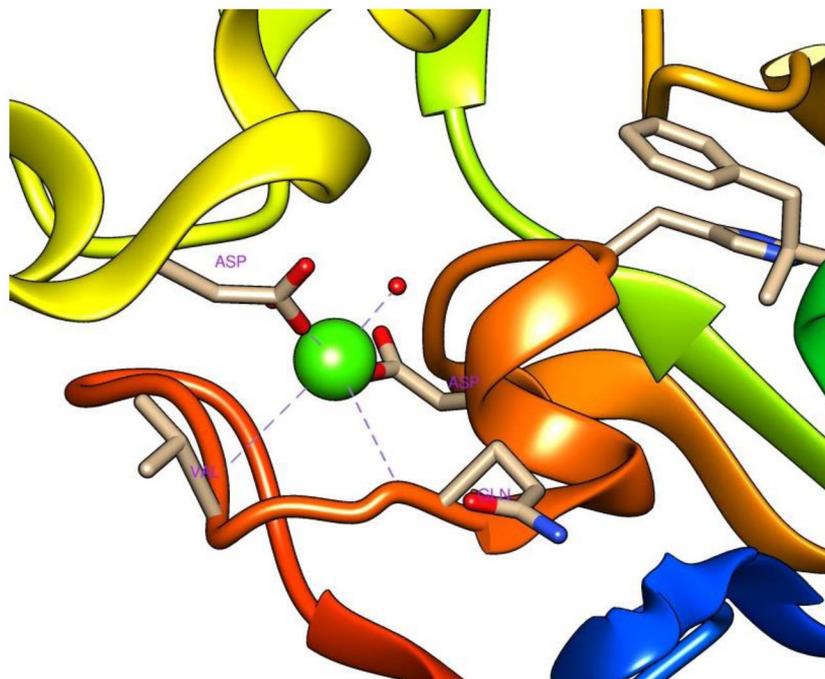


FIGURA 3 - SÍTIO DE LIGAÇÃO AO ÍON CÁLCIO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* (1YS2)

Detalhe mostrando a interação do Ca^{+2} com resíduos de Asp, Val e Gln na lipase. FONTE: "O Autor" (2021).

2.2 FAMÍLIA DE LIPASES BACTERIANAS E FOLDASES ESPECÍFICAS DE LIPASES

Inicialmente, as lipases e esterases bacterianas foram classificadas em 8 famílias baseadas somente em características fisiológicas e sequência de aminoácidos (ARPIGNY e JAEGGER, 1999). Com o avanço dos estudos, o número de famílias aumentou para 19, desta vez baseando-se em sequência, filogenia, motivos conservados e função biológica (KOVACIC et al., 2019). Recentemente, Hitch e Clavel (2019) propuseram uma atualização na classificação feita por Kovacic et al (2019). Usando comparação de sequências, foram integradas novas famílias na antiga classificação, totalizando 35 famílias e 11 subfamílias (TABELA 1). Deve-se notar que Hitch e Clavel classificaram apenas as lipases verdadeiras, com isso, a família II por exemplo, não está representada na Tabela 1 pois não é considerada formada por lipases verdadeiras. Existem muitas diferenças fisiológicas entre as lipases de diferentes famílias. Uma característica importante de grande parte das lipases das subfamílias I.1 e I.2, por exemplo, é a necessidade da interação com as foldases específicas (Lif) (Figura 4).

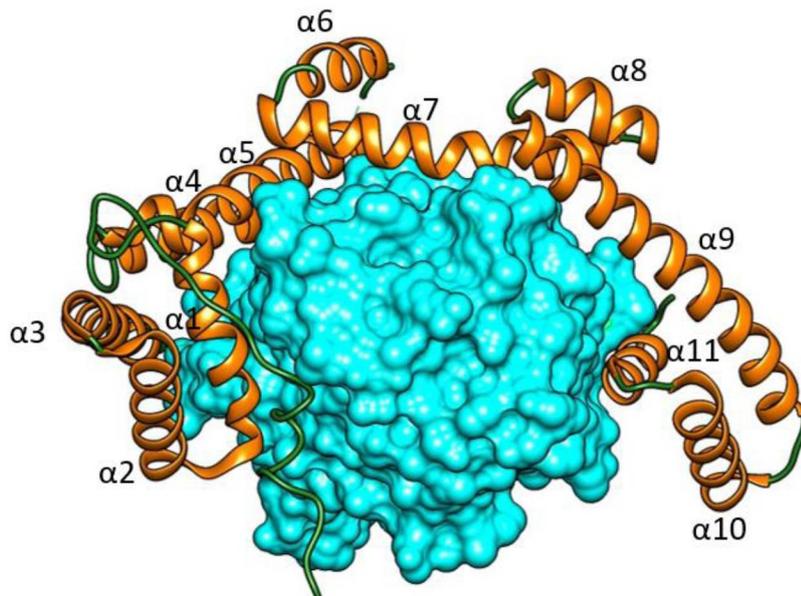


FIGURA 4 - COMPLEXO LIPASE-FOLDASE DE *Burkholderia glumae*

Representação da estrutura secundária da foldase específica (Lif) de *Burkholderia glumae* (2ES4) complexada com a lipase correlata. Lipase representada em azul, foldase em cor laranja. Imagem gerada com o programa CHIMERA. FONTE: “O Autor” (2021)

Lipases bacterianas extracelulares, como as do gênero *Burkholderia*, em geral requerem foldases e são secretadas passando pelas membranas celulares interna e externa, pelo mecanismo de secreção do tipo II (Figura 5), que é assistido por 14 proteínas diferentes. Nesse sistema, a lipase imatura (inativa) é transportada do citoplasma ao periplasma da bactéria pelo conjunto de proteínas do sistema Sec, onde uma sequência sinal (peptídeo sinal), presente na região N-terminal da lipase, é reconhecida e utilizada como “guia” para o início do processo de enovelamento e secreção. No periplasma, ocorre então a clivagem do peptídeo sinal, seguido do enovelamento correto da lipase em sua conformação ativa, com auxílio da Lif. Além da foldase, outras proteínas também auxiliam no enovelamento correto da lipase, incluindo um conjunto de proteínas denominadas Dsb (*disulfide bond protein*), responsáveis pela formação de ligações dissulfeto na lipase. Após atingir sua conformação ativa, a lipase é secretada para o meio extracelular por um mecanismo de secreção denominado Xcp, composto por aproximadamente 12 proteínas diferentes (ROSENAU e JAEGER, 2000).

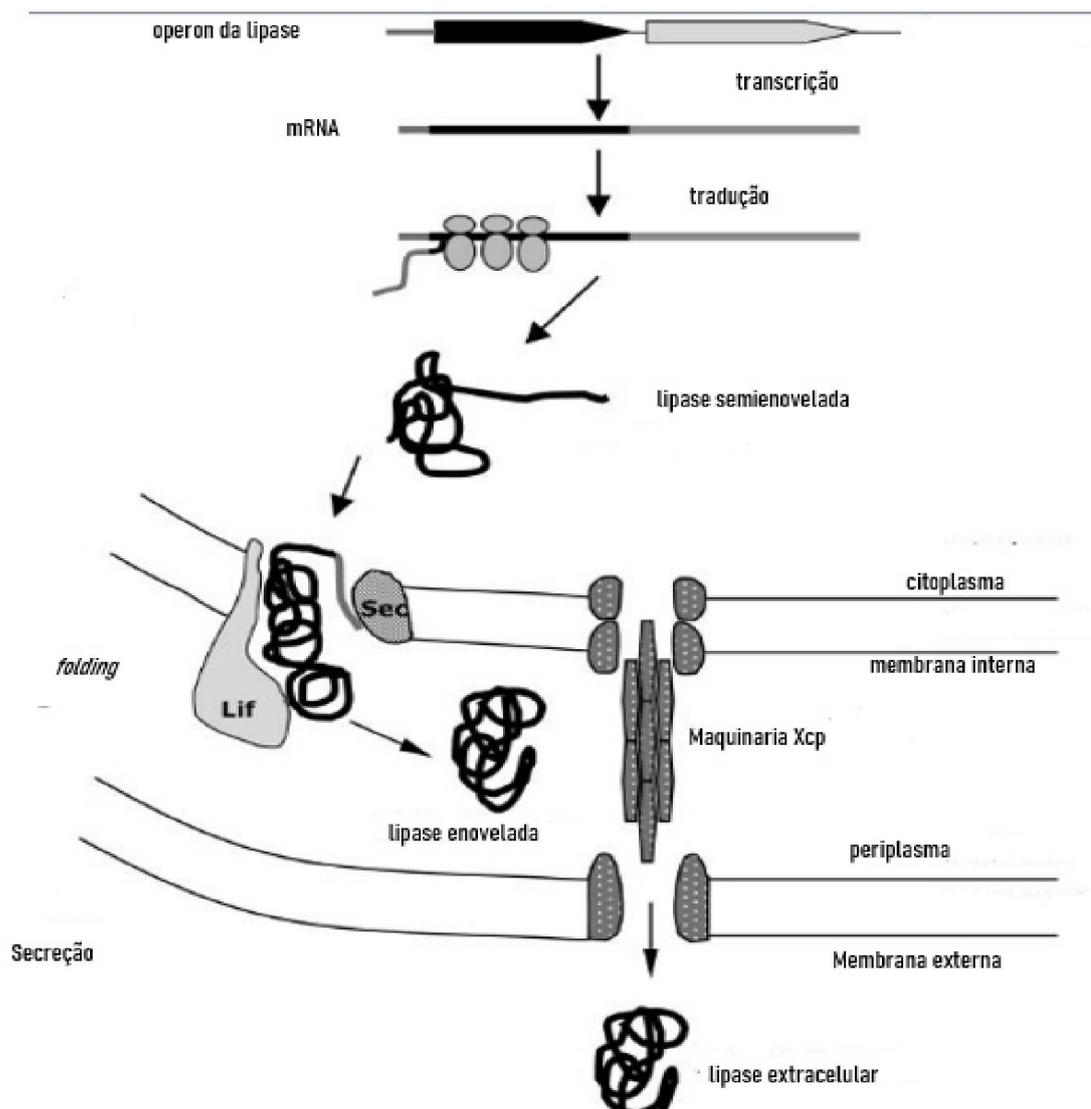


FIGURA 5 - MECANISMO DE SECREÇÃO DE LIPASES EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

FONTE: Adaptado de Rosenau et al. (2004).

As Lif's geralmente são codificadas por um mesmo operon junto com suas lipases correlatas, sugerindo uma proporção de 1:1 (lipase:foldase). As foldases formam um grupo atípico de proteínas que não apresentam homologia significativa com outras classes de chaperona e nem mesmo entre a sua própria classe (HOBSON et al., 1993) e foram agrupadas em 4 famílias por Rosenau et al. (2004). Apesar de não possuírem alta identidade de sequência entre si, todas as Lif's apresentam estrutura secundária similar, sendo a maior parte formada por α -hélices interligadas por alças. Análises de sequências mostraram que as Lif's possuem um segmento N-terminal hidrofóbico que serve como ancoragem na membrana interna do organismo secretor. Deleções desse segmento mostraram que ele não influencia na taxa de

ativação da lipase, tratando-se apenas de uma região que se liga à membrana interna para impedir a secreção da foldase complexada com a lipase. Apesar da baixa homologia de sequência, as foldases apresentam uma região conservada no segmento C-terminal de aproximadamente 138 resíduos de aminoácidos que são importantes na interação lipase-foldase (ROSENAU et al., 2004).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA, CARACTERÍSTICAS E ORGANISMOS DE ORIGEM DE LIPASES MICROBIANAS.

(CONTINUA)

Família	Sub-família	Características gerais	Exemplos de organismo de origem
I	1	Secretadas pelo sistema de secreção tipo II; peso molecular de 30~32 kDa; diversas lipases precisam de <i>Lif</i> ; sítio de Ca ²⁺ ; presença de <i>lid</i> ; pentapeptídeo conservado (GlyXSerXGly); as lipases foram classificadas de acordo com a semelhança da sequência de aminoácidos com a lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PaLip).	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. mendocina</i> ; <i>P. fluorescens</i> C9; <i>P. fragi</i> ; <i>P. wisconsinensis</i> ; <i>Vibrio cholerae</i> ; <i>V. parahaemolyticus</i> ; <i>V. harveyi</i> ; <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ; <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>Rhodoferrax ferrireducens</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Dehalococcoides</i> sp.
	2	Secretadas pelo mecanismo tipo II; peso molecular 33 kDa; diversas lipases precisam <i>Lif</i> ; sítio de Ca ⁺ ; presença de <i>lid</i> ; pentapeptídeo conservado (GlyXSerXGly); 2 fitas-β antiparalelas na superfície; as lipases foram classificadas de acordo com a semelhança da sequência de aminoácidos com a lipase de <i>Burkholderia glumae</i> .	<i>B. glumae</i> ; <i>B. cepacia</i> ; <i>B. cenocepacia</i> ; <i>B. multivorans</i> ; <i>B. thailandensis</i> ; <i>Chromobacterium viscosum</i> ; <i>Pseudomonas luteola</i> ; <i>P. KWI-56</i>
	3	Secretadas pelo mecanismo tipo I; peso molecular de 50~65 kDa; possuem peptídeo sinal na região C-terminal que faz a mediação do transporte da enzima para o meio extracelular.	<i>P. fluorescens</i> SIK W1; <i>P. fluorescens</i> Pfo1; <i>P. fluorescens</i> ; <i>P. sp.</i> 7323; <i>P. entomophila</i> ; <i>Serratia proteamaculans</i> ; <i>S. marcescens</i> ; (A7J993); <i>Psychrobacter</i> sp. PR-Wf-1; <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38
	4	São as menores lipases classificadas com peso molecular por volta de 20 kDa; pentapeptídeo conservado AlaXSerXGly, com Ala na posição 1; máxima atividade em pH 10-11.5; não apresentam resíduos de cisteína.	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>B. pumilus</i> ; <i>B. licheniformis</i> ; <i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. sp.</i> NK13; <i>B. megaterium</i> ; <i>B. clausii</i>
	5	Apresentam apenas uma pequena sequência similar de 15% com as lipases da família I.4, indicando uma evolução distante; pH ótimo variando de 7.5-9.5; peso molecular em torno de 46 kDa, por apresentar grandes inserções que formam sítios de ligação de zinco, proporcionando estabilidade contra inativação térmica.	<i>Bacillus stearothermophilus</i> ; <i>B. thermocatenulatus</i> ; <i>Geobacillus thermoleovorans</i> ; <i>G. zalihae</i> ; <i>Bacillus</i> sp. L2; <i>Geobacillus</i> sp. SF1; <i>G. kaustophilus</i> ; <i>G. thermocatenulatus</i> ; <i>G. stearothermophilus</i>
	6	São expressas como preproteínas (75 kDa) e apresentam N-terminal longo (em torno de 200 aminoácidos), necessário para realizar translocação e possivelmente interagir com chaperona, o qual é clivado após a secreção, tendo a lipase madura com 46 kDa; atividade em uma ampla gama de substratos; estabilidade em pH 4-9.	<i>Staphylococcus hyicus</i> ; <i>S. simulans</i> ; <i>S. xylosus</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. haemolyticus</i> ; <i>S. warneri</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>Propionibacterium acnes</i> ; <i>Streptomyces cinnamoneus</i>

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA, CARACTERÍSTICAS E ORGANISMOS DE ORIGEM DE LIPASES MICROBIANAS.

(CONTINUAÇÃO)

7	Apresentam semelhança com as lipases da subfamília I.2 na região central da estrutura primária que compreende os resíduos de aminoácidos 50-150; foram identificadas 3 lipases pertencentes a essa subfamília: <i>Streptomyces cinnamoneus</i> (29.2 kDa), <i>Propionibacterium acnes</i> (36.4 kDa), e <i>Janibacter</i> HTCC2649 (34.1 kDa).	<i>S. cinnamoneus</i> ; <i>P. acnes</i> ; <i>Corynebacterium glutamicum</i> ; <i>Janibacter</i> sp. HTCC2649
8	Classificação proposta baseada na identificação e caracterização da lipase Lip1 de <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> (51 kDa); está associada à membrana externa mostrando aumento de atividade contra substratos de cadeia longa; semelhança com lipases putativas de cepas psicrófilas marinhas; o motivo LGG(F/L/Y)STG substitui o pentapeptídeo GlyXSerXGly que envolve a serina catalítica.	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> ; <i>Hahella chejuensis</i> ; <i>Colwellia psychrerythraea</i> ; <i>P. tunicata</i>
9	Composta apenas pela lipase LipG; o motivo GlyXSerXGly foi identificado como GHSLG; lipase de origem bacteriana, mas não possui similaridade com nenhuma outra lipase; atividade máxima contra C14 e C16.	Isolada por prospecção metagenômica
10	Composta apenas pela lipase RlipE1 (isolada do rúmen de gado Holandês Chinês); lipase de origem bacteriana, mas não possui similaridade com nenhuma outra lipase; o motivo GlyXSerXGly foi identificado como GLSMG; atividade máxima contra C16 em condições ótimas de 30 °C e pH 7-8.	Isolada por prospecção metagenômica
11	MPlaG é uma fosfolipase isolada das planícies das marés na Coreia; a serina catalítica está presente no pentapeptídeo GHSLG; atividade contra triacilgliceróis de cadeia longa, com condições ótimas de 25 °C e pH 8; a análise de genoma expandido identificou possíveis membros dentro da <i>Oceanospirillaceae</i> , sugerindo que essa subfamília pode ser específica de ambientes marinhos.	Isolada por prospecção metagenômica (possivelmente do gênero <i>Oceanospirillaceae</i>)
III	Possuem peso molecular de 32-35 kDa; a estrutura cristalizada de SeLip mostrou que a estrutura α - β hidrolase é conservada; apresenta tríade catalítica SerXAspXHis, porém sem <i>lid</i> .	<i>Streptomyces exfoliatus</i> ; <i>S. albus</i> , <i>Moraxella</i> sp.; <i>Kinecoccus radiotolerans</i> ; <i>Clavinacter michiganensis</i> ; <i>Thermobifida fusca</i> .

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA, CARACTERÍSTICAS E ORGANISMOS DE ORIGEM DE LIPASES MICROBIANAS.

(CONTINUAÇÃO)

XII	Composta pela lipase LipEH166 (42 kDa) que apresenta o motivo de sítio ativo GHSLG com resíduos catalíticos de His e Asp; possui atividade contra C12; ativa em faixa alcalina e temperatura máxima de 30 °C.	Isolada por via triagem metagenômica de proteínas homólogas não caracterizadas de <i>Clorstridium acetobutylicum</i> , <i>Oceanobacter</i> sp. e <i>Marinomonas</i> sp.
XV	São lipases intracelulares; diferem na preferência pelo substrato; possuem a tríade catalítica Ser, Asp e His conservada com o motivo GLSMGG em torno da serina catalítica; apresentam uma estrutura de <i>cap</i> composta por 1 α -hélice e 2 fitas- β antiparalelas.	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> ; <i>Bacillus</i> sp. H-257; triagem metagenômica.
XVI	Composta pela enzima LipSM54 (55 kDa); tem o motivo GISYGAG conservado em torno da serina catalítica; tríade catalítica composta por resíduos de Asp e His; atividade contra C8-C18 com atividade em temperatura ótima de 35 °C e apresenta alta atividade até 5 °C.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Xanthomonas campestris</i> ; <i>Saccharothrix espanaensis</i>
XVII	Composta pela lipase LipJ2 (44 kDa); a tríade catalítica é composta por Ser, His, Asp, e o pentapeptídeo conservado GYSQG em torno da serina catalítica, com os resíduos de Tyr e Glu envolvidos na formação do buraco oxianion; preferência por substratos de cadeia curta/média (C4-C12); termofílica com atividade a 80 °C a 100 °C; estável em pH extremo.	<i>Janibacter</i> sp. (homóloga das enzimas lipolíticas e lipases dos gêneros <i>Arsenicoccus</i> , <i>Dermatophilus</i> e <i>Janibacter</i>)
XIX	LipSm (40.7 kDa) possui a serina catalítica no pentapeptídeo GHSQG; atividade máxima contra C12; temperatura ótima de 30-40 °C e pH 7.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Psi-1
XXI	Enzima FnL (~30 kDa) foi identificada com enzima específica de <i>Fervidobacterium</i> ; tem o pentapeptídeo AlaXSerXGly em torno da serina catalítica; atividade contra C10 com temperatura ótima de 70 °C e pH 9; identificada como lipase não verdadeira.	<i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1
XXIII	Composta pela lipase LipA (32 kDa); não apresentou semelhança com nenhuma lipase, porém foi identificada como lipase de origem bacteriana; possui o pentapeptídeo conservado AHSMG; temperatura ótima de 35 °C e pH 7.5-8.5; maior atividade contra C10.	Isolada por prospecção metagenômica
XXV	EM3L4 (~37 kDa) apresentou atividade máxima contra C16; condições ótimas de 35 °C e pH 7.5 e 1.5M NaCl; possui uma única hélice transmembrana na posição 9-31.	Isolada por prospecção metagenômica

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA, CARACTERÍSTICAS E ORGANISMOS DE ORIGEM DE LIPASES MICROBIANAS.

(CONCLUSÃO)

XXVIII	LipR (43 kDa) possui a serina catalítica no pentapeptídeo GYSGG; atividade máxima contra C10; condições ótimas de 40 °C e pH 7; contém uma única hélice transmembrana na posição 12-34.	<i>Rhodococcus</i> sp. CR-53
XXIX	EstGX1 (22.4 kDa) possui a serina catalítica dentro do pentapeptídeo GPSGG; atividade máxima contra C4 em condições ótimas de 40 °C e pH 8; não teve similaridade com nenhuma família de esterases.	Isolada por prospecção metagenômica
XXXII	Est9x (32 kDa) possui similaridade com proteínas de <i>Glaciacola</i> ; a serina catalítica está dentro do peptídeo GHSAG; condições ótimas em pH 8 e 65 °C; atividade máxima contra C2 e diminui até C14.	Isolada por prospecção metagenômica

FONTE: Hitch e Clavel (2020).

2.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE LIPASES

A expressão de proteínas em vetores heterólogos se tornou muito mais viável quando foi possível a utilização de sistemas microbianos em ensaios de expressão, causando uma revolução na bioquímica, dispensando a necessidade de grandes quantidades de células vegetais ou animais para a obtenção de uma pequena quantidade de proteína (MAKRIDES et al., 1996). A bactéria *Escherichia coli* é a referência quando se trata de expressão heteróloga, pois já se consolidou como um meio de expressão extremamente eficiente, graças ao completo sequenciamento de seu genoma, o que proporcionou um entendimento completo sobre a bactéria, além de esta apresentar facilidade de produção em larga escala. Porém, ainda existem muitas dificuldades que precisam ser superadas para que se obtenha a expressão de uma proteína utilizável para determinado fim (ROSANO e CECCARELLI, 2014).

Um grande obstáculo para a superexpressão de proteínas heterólogas é a formação de agregados conhecidos como corpos de inclusão. Quando um gene é inserido em um sistema de expressão, em *E. coli* por exemplo, o meio interno do organismo pode ser muito diferente do organismo original que sintetizava o produto daquele gene. Podem haver variações de pH, osmolalidade, potencial redutor e ausência de cofatores. Além disso, quando a proteína é superexpressa, as regiões hidrofóbicas presentes em sua superfície formam um grande segmento altamente hidrofóbico que precisa se “blindar” da água presente no meio. As somas de todos esses fatores levam à instabilidade e agregação da proteína (KANE e HARTLEY, 1991). Portanto, foram desenvolvidas estratégias para a obtenção de proteínas solúveis focando na diminuição dos fatores que levam à agregação. Uma estratégia frequentemente adotada para a produção de proteínas solúveis é a coexpressão de genes codificadores de chaperona auxiliares. Resultados pioneiros dessa abordagem estão mostrados no trabalho de coexpressão das proteínas GroEL-GroES em que o sistema proteína-chaperona se mostrou cooperativo e eficiente para produção de proteínas enoveladas corretamente (NISHIHARA et al., 1998). Existem ainda outros métodos para se obter proteínas recombinantes na forma solúvel como fusionar a porção N-terminal a um Peptídeo Sinal que pode levar a exportação da proteína heteróloga via sistema de secreção tipo II. Essa técnica teve sucesso em possibilitar a secreção de proteínas recombinantes ao meio extracelular. Um exemplo é o trabalho de Mukherjee *et al.* (2004) que demonstrou que células de *E. coli* foram capazes de secretar 90% de anticorpos recombinantes alcançando uma concentração de 160 mg/L.

No caso de lipases que necessitam de interação com a Lif, o enovelamento *in vivo* (coexpressão) se mostrou bastante eficaz em inúmeros trabalhos (HOBSON et al., 1993; QUYEN et al., 1999; YANG et al., 2007 e ZHANG et al., 2021). Nessa estratégia, os genes correspondentes à lipase e foldase são clonados em vetores diferentes e inseridos no mesmo hospedeiro heterólogo. Assim que a lipase é sintetizada, ela interage com a Lif que tem a capacidade de estabilizar temporariamente a lipase semienovelada, prevenindo a formação de corpos de inclusão (ROSANO e CECCARELLI, 2014). Exemplos recentes de sucesso envolvendo a estratégia de coexpressão foram reportados para a lipases de metagenômica LipG9 e LipMF3 (ALMEIDA et al., 2019; MARTINI et al. 2014), e para a lipase de *B. contaminans* LTEB11, denominada LipBC, do mesmo microrganismo do presente trabalho (ALNOCH et al., 2018).

Uma segunda forma de se obter uma lipase ativa, em seu estado solúvel, é a técnica de enovelamento *in vitro*. Nessa abordagem, lipase e foldase são expressas e purificadas separadamente. Como a lipase tende a formar corpos de inclusão, é necessário um processo de isolamento e desnaturação desses agregados. Geralmente, o isolamento é feito por centrifugação em baixa velocidade, já que os corpos de inclusão são relativamente densos tendendo a se decantar mais rapidamente que os demais detritos celulares. Para a a desnaturação, é utilizado um agente caotrópico, normalmente uma solução de amônia 8 M. Após a obtenção e desnaturação dos agregados, as lipases semienoveladas são incubadas em um tampão de *refolding* juntamente com suas foldases onde ocorre a interação e enovelamento da lipase em sua forma solúvel e ativa (VALLEJO et al., 2004).

Uma vantagem a ser destacada da estratégia do enovelamento *in vivo* em relação ao *in vitro* consiste no procedimento envolver uma única etapa, tornando-o mais simples, sendo a lipase ativa obtida logo após a expressão (MADAN e MISHRA., 2010).

2.4 LIPASES DE *Burkholderia contaminans*

O gênero *Burkholderia* é constituído de aproximadamente oitenta espécies, presentes em diversos ambientes, desde solos contaminados, até o trato respiratório humano (DEPOORTER et al., 2016). Algumas espécies são conhecidas por serem agentes fitopatogênicos ou patógenos oportunistas em humanos, que podem causar infecções em pacientes imunodeprimidos, geralmente portadores de fibrose cística

(MAHENTHIRALINGAM et al., 2005). Entretanto, apesar dessas características, diversas espécies de *Burkholderia* são utilizadas em diferentes aplicações biotecnológicas, como por exemplo, em processos de biorremediação (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005) e na produção de lipases (SALUM et al., 2008; ALNOCH et al., 2018). Em geral, as lipases produzidas por *Burkholderia sp.* são secretadas para o meio extracelular durante a etapa de cultivo pelo sistema de secreção do tipo II, já descrito anteriormente (Seção 2.2).

2.4.1 Lipases de *Burkholderia contaminans* LTEB11

A cepa de *B. contaminans* LTEB11 foi isolada no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) em 2004, como contaminante em um meio de cultivo suplementado com óleo vegetal. Essa cepa, classificada inicialmente e erroneamente como *Bacillus megaterium* (LIMA et al., 2004) e mais tarde como *Burkholderia cepacia* (SALUM et al., 2008), é uma β -protobactéria gram-negativa classificada no grupo denominado complexo *Burkholderia cepacia* (BCC). Em contraste com o potencial caráter patogênico, as espécies do complexo BCC apresentam grande diversidade genética e capacidade metabólica para produção de biomoléculas, como polihidroxicanoatos (YANG et al., 2007).

A lipase selvagem desse organismo (LipBC), reclassificada em 2018 como *B. contaminans* LTEB11, (ALNOCH et al., 2019) foi inicialmente produzida por fermentação submersa, imobilizada em Accurel EP 100 e aplicada em diferentes reações em meio orgânico, como por exemplo, na síntese de oleato de etila, onde foi reportado 99% de conversão em éster, em 3 h de reação (SALUM et al., 2008). Em adição, LipBC imobilizada em Accurel EP 100 foi aplicada na reação de transesterificação do óleo de mamona em um sistema livre de solventes, onde foi reportada uma conversão em ésteres etílicos de 90% em 6 h de reação (BARON et al., 2014). Em trabalho utilizando LipBC produzida e imobilizada simultaneamente (SPIL) durante o cultivo, a lipase imobilizada apresentou rendimento na esterificação de oleato de etila três vezes maior do que quando imobilizada por meios convencionais de imobilização, com 95% de conversão em 1 h (BARON et al., 2011). LipBC também apresentou resultados promissores na resolução cinética de racematos. Em 2014, Moure e colaboradores utilizaram LipBC imobilizada em Accurel EP100 na resolução de álcoois secundários obtendo-se valores comparáveis aos de CALB, enzima comercial imobilizada já bem consolidada no mercado.

LipBC também já foi produzida por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais (KRIEGER et al., 2019) 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 seco, produzido por fermentação no estado sólido, contendo LipBC em reações de transesterificação em reator de leito fixo; obtiveram altas conversões (95% em 46 h) em meio livre de solvente orgânico. Ótimos resultados também foram obtidos (92% em 31 h) 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) estudaram o aumento de escala da produção de ésteres do biodiesel em reatores de leito fixo, tendo conseguido um aumento de 10 vezes na escala do processo, com conversão de 88% em 24 h de reação. Este sistema foi utilizado em 6 lotes sucessivos de 48 h com o mesmo sólido fermentado no qual um total de 4,6 kg de éster foi produzido. Foi a maior escala na qual um processo (esterificação ou transesterificação) foi realizado com sólidos fermentados até a data. O sólido fermentado contendo LipBC foi também utilizado em reações de síntese de ésteres de açúcar (VILLALOBOS et al., 2018) e na síntese de biodiesel de óleo de palma (GALEANO ET AL. (2017).

2.4.2 NOVAS LIPASES DE *Burkholderia contaminans* LTEB11

Recentemente, os genes que codificam uma lipase (LipBC) e a sua foldase (LifBC) foram identificados a partir do sequenciamento do genoma de *B. contaminans* LTEB11 e clonados. As proteínas foram coexpressas em *E. coli* e o complexo Lip-LifBC foi purificado e caracterizado (ALNOCH et al., 2018). Em adição, LipBC recombinante foi imobilizada no suporte Sepabeads FP-BU e aplicada na síntese de oleato de etila em meio orgânico, apresentando uma atividade de esterificação de $4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ de suporte e uma conversão em éster de 90% em 6 h (ALNOCH et al., 2018).

No trabalho de Alnoch et al, (2019), diferentes genes envolvidos na maquinaria lipolítica de *B. contaminans* LTEB11 foram identificados. No total, sessenta genes foram classificados como codificadores de α/β -hidrolases, sendo dezessete classificados como genes

que codificam para lipases ou esterases. Além disso, no cromossomo 1, foi identificado um segundo operon composto de genes que codificam para uma lipase (*lipE*) e uma foldase (*lifE*). Esse operon foi denominado *lipEF*. Em adição, ainda no cromossomo 1, mais dois genes que codificam para lipases foram anotados e denominados *lipC* e *lipD*. A expressão e caracterização das proteínas expressas pelos genes *lipE* e *lifE* foi o escopo deste trabalho, portanto, serão mais bem descritos abaixo.

No Operon *lipEF*, *lipE* e *lifE* apresentam 65% e 53% de identidade com *lipA* e *lipB*, respectivamente, que codificam para a lipase LipBC, caracterizada na forma recombinante por Alnoch et al. (2018). Análises comparativas entre o genoma de *B. contaminans* LTEB11 e outras espécies de *Burkholderia* mostraram que um operon similar a *lipEF* somente foi anotado no genoma de *Burkholderia lata* FL 7530S1D0. Análises iniciais de sequência mostraram que LipE apresenta uma sequência N-terminal típica (peptídeo sinal), sugerindo que essa lipase pode ser secretada por *B. contaminans* LTEB11. Em adição, análises filogenéticas iniciais classificaram LipE na família I.2 de lipases bacterianas, próximas às lipases de *B. glumae*, *B. lata*, e *C. viscosum*. Até o momento, não foram reportadas na literatura a clonagem e a caracterização de um segundo operon lipase/foldase em espécies de *Burkholderia sp.* e *Pseudomonas sp.*

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar análises *in silico* e expressar e caracterizar a lipase LipE e sua foldase específica, LifE, produzidas por *Burkholderia contaminans* LTEB11.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e comparar as sequências dos genes *lipE* e *lifE* com os genes de lipases disponíveis em banco de dados;
- Construir modelos de homologia de LipE e LifE utilizando diversas ferramentas disponíveis *online* para a obtenção e validação dos modelos obtidos;
- Caracterizar filogeneticamente LipE e LifE;
- Realizar ensaios de *cross-refolding* de LipE, utilizando diferentes foldases bacterianas;
- Realizar subclonagem do gene *lifE* em vetor de expressão pT7-7;
- Coexpressar a lipase LipE e a foldase LifE em *Escherichia coli*;
- Testar atividade de LipE contra triglicerídeos naturais e substratos sintéticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Fermentativa e Enzimática do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química (LTEB) na Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.1 REAGENTES E MATERIAIS CONSUMÍVEIS

Para os ensaios de clonagem foram utilizadas as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e para os ensaios de indução foi utilizado IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) todos adquiridos da empresa Invitrogen (MA, USA). Os ensaios de cromatografia de afinidade foram feitos utilizando uma coluna HiTrap *Chelating* HP 5 mL (GE Life Sciences, Uppsala, SWE). Os substratos utilizados para determinação de atividade da lipase foram azeite de oliva (65%) (marca Gallo) adquirido de um mercado local, tricaprilina (99%), tributirina (98%), acetato de *p*-nitrofenila (*p*-NPA), butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB) e palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) (Sigma-Aldrich, MO, USA). Para o cultivo e seleção dos clones positivos foram utilizados os antibióticos: canamicina $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Km^{100}) e ampicilina $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Amp^{250}) (Invitrogen, MA, USA).

4.1.1 VETORES E MICRORGANISMOS

O gene *lipE* juntamente com o gene da foldase (*lifE*) foram encomendados já clonados no vetor pET-28a à empresa GenScript (NJ, EUA) e denominados *lipE-pET-28a* e *lifE-pET-28a*. O vetor pT7-7 (USB, OH, USA) e T4 ligase (Invitrogen, MA, USA) foram utilizados na subclonagem do gene *lifE* para os ensaios de coexpressão. Na clonagem e expressão foram utilizadas células de *E. coli* BL21 (DE3), Shuffle, pLysS, Star e Rosetta, além de variantes TOP10 para a propagação do gene (Novagen, MA USA). Para os ensaios de *cross-refolding* foram utilizadas as foldases LifG9 e LifMF3 oriundas de uma biblioteca metagenômica (GLOGAUER et al., 2011) e LifBC, produzida por *B. contaminans* LTEB11, porém, com sua sequência localizada fora do operon *lipEF*. As três foldases utilizadas já haviam sido clonadas no vetor pT7-7 (ALMEIDA et al. 2019, ALNOCH et al. 2018 e MARTINI et al. 2014).

4.1.2 MEIOS DE CULTIVO

Os meios de cultivo foram preparados segundo o protocolo de Sambrook et al (1989). O crescimento das estirpes foi feito em meio Luria Bertani (LB) e meio Luria Bertani-Ágar (LA). Para os ensaios de atividade lipolítica em placas de Petri, foi utilizado meio composto de peptona (5 g L^{-1}), extrato de levedura (3 g L^{-1}), ágar (12 g L^{-1}) suplementado com os triglicerídeos tributirina, tricaprilina ou azeite de oliva (ANDERSON et al., 1939).

4.1.3 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO

Uma colônia isolada de *E. coli* que estava armazenada a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, foi inoculada em 5 mL de meio LB e incubado a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 h. Em seguida, a cultura foi diluída em uma proporção de 1:100 em meio LB e incubada a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até atingir-se a D.O.₆₀₀ de 0,3. Em seguida, a cultura foi dividida em 2 tubos tipo *falcon* de 50 mL e centrifugada a $4700\times g$ por 10 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$; o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25 mL de CaCl_2 0,1 M a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa mistura foi incubada em gelo por 1 h e centrifugada novamente a $4700\times g$ por 10 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e as células foram novamente ressuspensas em 4 mL de CaCl_2 0,1M + 15% glicerol (v/v). Foram coletadas alíquotas de 50 μL e armazenadas a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

O protocolo de transformação seguiu o método de choque térmico de Hanahan et al. (1983). Alíquotas de células *E. coli* quimicamente competentes (50 μL) foram descongeladas em banho de gelo, e a elas foram adicionados 2 μL de plasmídeo carregando o gene de interesse. As misturas foram mantidas em banho de gelo por 1 min e então submetidas a choque térmico a $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 s, voltando ao banho de gelo por mais 5 min. Em seguida, foram adicionados 800 μL de meio de cultura LB às suspensões de células, que foram então mantidas por 90 min a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação. Após esse período, as suspensões foram plaqueadas em meio LA contendo canamicina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ampicilina ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Para os testes de *cross-refolding*, a reação de transformação foi feita seguindo o mesmo método, apenas variando genes das diferentes foldases (*lifBC*, *lifMF3* e *lifG9*) em cada ensaio.

4.1.4 OBTENÇÃO DOS GENES *lipE* e *lifE*

Como os genes foram obtidos comercialmente já clonados no vetor pET-28a, a construção estava pronta para os ensaios. Portanto, para extração do gene *lifE* do plasmídeo pET-28a realizou-se digestão com endonucleases de restrição em duas etapas utilizando as

enzimas NdeI e EcoRI. A reação foi dividida em duas etapas visando otimizar a atividade das enzimas, incubando cada reação com uma enzima por vez. Na primeira etapa, foi feita uma mistura que consistiu em 10 µL da construção *life-pET-28a*, 2 µL de tampão Cutsmart® (Invitrogen, MA, USA), 1 µL de NdeI e 7 µL de água ultrapura. A mistura foi incubada por 16 h em estufa a 37 °C. O sucesso da reação de digestão foi confirmado utilizando-se eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 4.1.6). Em seguida, o vetor linearizado foi submetido a uma segunda reação de digestão usando as mesmas condições descritas acima, porém, empregando a enzima EcoRI. Após o tempo de incubação, a liberação do gene foi verificada em gel de agarose 0,8%.

4.1.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina segundo Sambrook et al (1989). Uma alíquota de 1,5 mL de cultura de *E. coli* contendo os plasmídeos foi submetida à centrifugação a 16000×g por 1 min, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o sedimento ressuspense em 150 µL de solução GET (50 mM glicose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8) com Rnase (1 mL : 2 µL). Em seguida, adicionou-se 150 µL de solução de lise (200 mM NaOH, 1% SDS) e então o tubo foi homogeneizado por inversão. Após 5 min de incubação em banho de gelo, foram adicionados 150 µL de solução de KAcF (3 M acetato de potássio, 1,8 M ácido fórmico) a 4 °C e o tubo foi homogeneizado por inversão para precipitação do DNA cromossômico. Incubou-se a 0 °C por 15 min, adicionou-se 150 µL de solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se a 16000×g por 5 min. Então, 250 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo estéril de 1,5 mL, onde o DNA plasmidial foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto a 4 °C. O precipitado foi coletado por centrifugação a 16000×g por 10 min. Deixou-se secando em temperatura ambiente para a evaporação de todo o etanol. Após a evaporação, o precipitado foi ressuspensado em 30 µL de água ultrapura e armazenado a -80 °C.

A remoção de impurezas das amostras de DNA foi feita pelo método de precipitação etanólica. Para tanto, à 20 µl da mistura contendo as amostras de DNA foram adicionados 0,1 volume de acetato de sódio (3 M) e 2 volumes de etanol. A mistura foi incubada a 4 °C por 16 h. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada a 16000×g por 30 min usando uma minicentrífuga (Eppendorf® MiniSpin), descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensado em etanol 70% (0,5 mL) e centrifugado por 10 min a 16000×g. Na última etapa,

o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em água ultrapura e armazenado a 4 °C para ser utilizado nos ensaios.

4.1.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para o preparo de gel de agarose 0,8%, foram adicionados 80 mg de agarose em 200 mL de tampão TAE (EDTA 50 mM, Tris 2 M e ácido acético 1 M). A mistura foi aquecida em microondas até que adquirisse um aspecto cristalino. A solução foi resfriada e colocada em cuba eletroforética para a polimerização. A corrida foi realizada usando 180 mV, por aproximadamente 1 h, em tampão TAE.

4.1.7 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EXTRAÍDOS DO GEL DE AGAROSE

Após as clivagens com as enzimas NdeI e EcoRI, as soluções contendo o gene *lifE* e o vetor pET-28a foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio, cujas bandas foram visualizadas com luz UVB (302 nm) em um transluminador 3UV™ Transilluminator (UVP Corp, Analytik Jena, USA.). A banda correspondente ao padrão de corrida do fragmento do gene *lifE* (1026 pb) foi cortada do gel com um estilete estéril, o DNA foi extraído do gel usando o *DNA Gel Extraction Kit Monarch*® (BioLabs, NJ, USA), seguindo as instruções do fabricante.

4.1.8 PREPARAÇÃO DO VETOR PLASMIDIAL PARA LIGAÇÃO

O plasmídeo pT7-7 foi submetido à reação de restrição. A mistura de reação foi composta por 10 µL de tampão Cutsmart® 10x, 20 µL do plasmídeo pT7-7 e 2 µL de cada endonuclease (NdeI e EcoRI) A mistura foi incubada por 4 h a 37 °C. O resultado da restrição foi verificado por corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%.

4.2 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DO GENE *lifE* NO VETOR pT7-7

A reação de ligação do gene *lifE* no plasmídeo foi preparada numa proporção de 10:1. A mistura de reação foi composta por 10 µL de gene *lifE*, 1 µL de plasmídeo pT7-7 linearizado, previamente digerido com NdeI e EcoRI, 2 µL de tampão T4 Ligase e 2 µL da enzima T4

Ligase, completando-se para um volume final de 20 μL com água ultrapura. Os componentes da reação foram pipetados cuidadosamente para impedir que a enzima aderisse na lateral do tubo. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 4 h. A ligação foi confirmada por padrão de corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%.

4.3 ENSAIOS DE EXPRESSÃO E COEXPRESSÃO

Para o ensaios de expressão, cepas de *E. coli* transformadas com as construções mostradas na TABELA 2 foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura LB com antibióticos e mantidas sob agitação de 120 rpm a 37 °C por 16 h. Ao final deste período, a cultura foi inoculada na proporção 1:20 em meio LB e mantida nas mesmas condições de crescimento citadas acima (120 rpm a 37 °C), até a cultura atingir a D.O.₆₀₀ de 0,6. Alcançada a D.O. desejada, as culturas foram deixadas sobre a bancada por 20 min para evitar choque térmico e então foi adicionado IPTG em uma concentração final de 0,5 mM, para promover a expressão das proteínas de interesse. A incubação foi feita por 16 h a 20 °C, em agitador orbital a 120 rpm. A cultura bacteriana foi centrifugada a 4700 \times g por 10 min à temperatura ambiente. O precipitado de células bacterianas formado foi ressuspensionado em solução de lise A (50 mmol \cdot L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol \cdot L⁻¹ de NaCl, 2 mmol \cdot L⁻¹ de CaCl₂, 1% de Triton X-100 (v/v) e glicerol 10% (v/v)) e submetido à lise celular em sonicador, por 15 vezes em banho de gelo, alternando entre turnos de sonicação e descanso (15 s cada ciclo). O extrato celular foi centrifugado a 15000 \times g por 15 min a 4 °C.

TABELA 2. CONSTRUÇÕES DE LIPASE E FOLDASES UTILIZADAS NESTE TRABALHO

Construção	Lipase	Foldase	Referências
<i>lipE-lifBC</i>	Inteira	N-truncada	Alnoch et al. (2018)
<i>lipE-lifE</i>	Inteira	Inteira	-
<i>lipE-lifMF3</i>	Inteira	N-truncada	Almeida et al. (2019)
<i>lipE-lifG9</i>	Inteira	N-truncada	Martini et al. (2014)

4.4 PURIFICAÇÃO de LipE

A purificação da lipase LipE foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de níquel HiTrap *Chelating* HP 5 mL (GE Life Sciences Uppsala SWE) acoplada a uma bomba peristáltica. O sobrenadante contendo a lipase foi injetado na coluna previamente equilibrada com tampão de lise A (seção 4.3). Em seguida, a coluna foi lavada com tampão de ligação (Tris-HCl 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, imidazol 20 mM e glicerol 10% (v/v)), e eluída com gradiente de imidazol (Tris-HCl 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, imidazol 50, 100, 150, 300, 500 mM e glicerol 10% (v/v)). As frações purificadas foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

4.5 ANÁLISES *IN SILICO*

As análises da região hidrofóbica transmembrana da foldase e da sequência-sinal da lipase foram realizadas utilizando o servidor TMHMM (KROGH et al., 2001) e o programa SignalP (BENDTSEN et al., 2004), respectivamente.

4.5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para determinar as famílias de LipE e LipF, foi feito um alinhamento com os representantes das 19 famílias e subfamílias de lipases microbianas agrupadas por Kovacic et al (2019) utilizando o programa MUSCLE (EDGAR et al., 2004) com as sequências disponíveis no banco de dados do UniProt. A construção da árvore filogenética foi baseada no método *Neighbor-Joining* usando o programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). Para determinação da estrutura secundária de LipE e LipF, foram utilizados os programas T-COFFEE (NOTREDAME et al., 2000) e Esript 3 (ROBERT; GOUET., 2014).

4.5.2 MODELAGEM ESTRUTURAL POR HOMOLOGIA

A modelagem por homologia foi realizada utilizando o programa SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018). As sequências homólogas utilizadas como modelos estruturais foram selecionadas com o algoritmo QMEANDisCo (STUDER et al., 2019) e obtidas no banco de sequências Protein Data Bank (PDB). A estrutura cristalográfica da lipase de *Burkholderia cepacia* (PDB: 1YS2) (MEZZETTI et al., 2005) foi selecionada como molde pois apresenta

alto nível de similaridade com LipE (>70%). Já para a modelagem de LipE foi utilizada a estrutura cristalográfica da foldase de *B. glumae* (PDB: 2ES4) (PAUWELS et al., 2006). O refinamento dos modelos obtidos foi feito utilizando o programa MODELLER embutido no programa CHIMERA (PETTERSEN et al., 2004). A qualidade estereoquímica dos modelos finais foi avaliada e refinada pelos programas Q-MEANDisCO (STUDER et al., 2020) e ReFOLD (ADIYAMAN e MCGUFFIN, 2021).

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 ELETROFORESE SDS-PAGE

A eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE) foi realizada para acompanhar o processo de purificação e selecionar as frações eluídas contendo as enzimas. Foi utilizado o método descrito por Laemmli (1970), usando o gel de empilhamento de 5% (m/v) e o gel de separação de 12% (m/v) (acrilamida 40%, bis-acrilamida 1,6%). Amostras das frações eluídas foram aquecidas a 100 °C por 10 min e submetidas à eletroforese, aplicando-se 20 µL de amostra em cada poço.

A corrida foi realizada em um equipamento Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, CA, USA), por 1 h e 20 min, a 180 V. Em seguida, o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250 (0,05%, m/v) e revelado com uma mistura de metanol: ácido acético: água (5/1/4, v/v). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: fosforilase b (97kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -La (14,4 kDa) (Pierce Biotechnology, IL, EUA).

4.6.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A atividade de LipE foi determinada por dois métodos, utilizando como substratos os ésteres de *p*-nitrofenila e triglicerídeos naturais.

Para os ésteres de *p*-nitrofenila (*p*-NP-), foi utilizado o método espectrofotométrico inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979). O método baseia-se na hidrólise do *p*-NP- pela enzima em meio aquoso contendo como surfactante Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol (*p*-NP), de coloração amarela, foi seguida por leitura em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 µmol/min de *p*-

NP. Os ensaios foram feitos em cubeta de vidro de 1 mL. Os testes de atividade foram feitos utilizando 200 μL de enzima a 37 °C sob agitação. Com substratos de cadeia lateral longa ($C \leq 10$), para a remoção da turbidez, a mistura foi aquecida previamente em banho-maria a 60 °C por 25 s ou até que ficasse transparente.

Para a dosagem de atividade de LipE pelo método titulométrico, utilizou-se a metodologia proposta por Stuer, Jaeger e Winkler (1986) que é baseada na liberação de ácidos graxos durante a reação de hidrólise de triglicerídeos catalisada pela lipase e na titulação com NaOH utilizando um titulador automático tipo pHStat (Metrohm 718 Stat Titrimo, Suíça). Os substratos utilizados foram tributirina, tricaprilina e óleo de oliva. Para todos os substratos foi feita uma emulsão com goma arábica (3%, m/v), CaCl_2 (2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), tampão Tris-HCl (2,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,25) e NaCl (150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (TISS et al., 2001). Esta emulsão foi preparada por agitação durante 1 h em agitador mecânico. O volume de 200 μL da solução enzimática foi adicionado em 20 mL da emulsão sob agitação magnética (300 rpm) no próprio frasco de reação (capacidade de 50 mL e termostatizado) a 37 °C; a reação foi seguida por 5 min. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a produção de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de ácidos graxos nas condições do ensaio.

4.6.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi feita de acordo com o método de Bradford (1976), calculando-se a concentração de proteínas a partir da curva de calibração com o padrão soroalbumina bovina (Sigma-Aldrich, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DE SEQUÊNCIA DOS GENES *lipE* e *lifE*

O gene *lipE*, quando visualizado usando o programa SnapGene (SnapGene software, Insightful Science) apresenta um tamanho de 1119 pares de bases e codifica uma lipase com 318 aminoácidos com peso molecular teórico de 38 kDa e ponto isoelétrico teórico de 6.8. O programa SignalP (BENDTSEN et al., 2004) identificou uma sequência sinal nos primeiros 50 resíduos da região N-terminal de *lipE*, indicando que a lipase LipE pode ser secretada ao meio extracelular em *B. contaminans* (Figura 6 A). O gene *lipE* encontra-se em um operon denominado *lipEF* juntamente com o gene *lifE*, que codifica uma foldase (LifE) (Alnoch et al., 2019). Esses resultados indicam que a lipase LipE é secretada pelo mecanismo de secreção tipo II, característico de bactérias gram-negativas (ROSENAU e JAEGER, 2000).

O gene *lifE* tem 1029 pares de bases e codifica para uma foldase com 275 aminoácidos com peso molecular teórico de 36 kDa e ponto isoelétrico teórico 8.5. A análise utilizando o servidor TMHMM, disponível no site ExPASy, mostrou que a sequência de aminoácidos codificada pelo gene apresenta uma porção transmembrana nos primeiros 45 resíduos na porção N-terminal (Figura 6 B). Isto já era esperado, pois a foldase se encontra ancorada na membrana interna de bactérias gram-negativas, com sua maior porção projetada para o periplasma, facilitando a interação com a lipase no momento da secreção (ROSENAU et al., 2004).

A sequência de LipE foi submetida ao alinhamento com lipases do banco de dados disponíveis no NCBI. O alinhamento sugeriu que LipE tem 89% de identidade com lipases produzidas por *B. metallica* e 88% com lipases produzidas por *B. cepacia*. As sequências das lipases relacionadas pertencentes à subfamília I.2 foram utilizadas de molde para uma análise de estrutura secundária. As representantes foram escolhidas pelo grau de identidade com LipE sendo elas: a lipase de *B. cepacia* (PDB: 1YS2), que também serviu como molde estrutural para comparação da estrutura secundária, a lipase LipBC de *B. contaminans* (NCBI: WP_071332898.1), a lipase de *B. metallica* (NCBI: WP_175912879.1) e a lipase de *B. stabilis* (NCBI: WP_129514761.1) (Figura 7). A partir desse alinhamento, foi possível observar que LipE possui características comuns em lipases bacterianas, como o pentapeptídeo conservado formado pelos resíduos Gly-X-Ser-X-Gly, no qual o X representa qualquer aminoácido. No caso de LipE, o pentapeptídeo é composto pelos resíduos Gly⁸⁴, His⁸⁵, Ser⁸⁶, Gln⁸⁷ e Gly⁸⁸ (Figura 7). A tríade catalítica de LipE é formada pelos resíduos His²⁸⁴, Ser⁸⁶ e Asp²⁶². Além disso, outras regiões importantes foram observadas, como um possível sítio de ligação ao cálcio,

formado pelos resíduos Asp²⁸⁶, Gln²⁹⁰, Ile²⁹⁵ e Ala²⁹⁷. Esse é um aspecto importante, pois pode conferir maior estabilidade e maior atividade às lipases que apresentam íon Ca⁺² ligado em suas estruturas (NARDINI et al., 2000). Também foram anotados resíduos de cisteína nas posições Cys¹⁸⁸ e Cys²⁶⁸, que sugerem que LipE pode apresentar uma ponte dissulfeto.

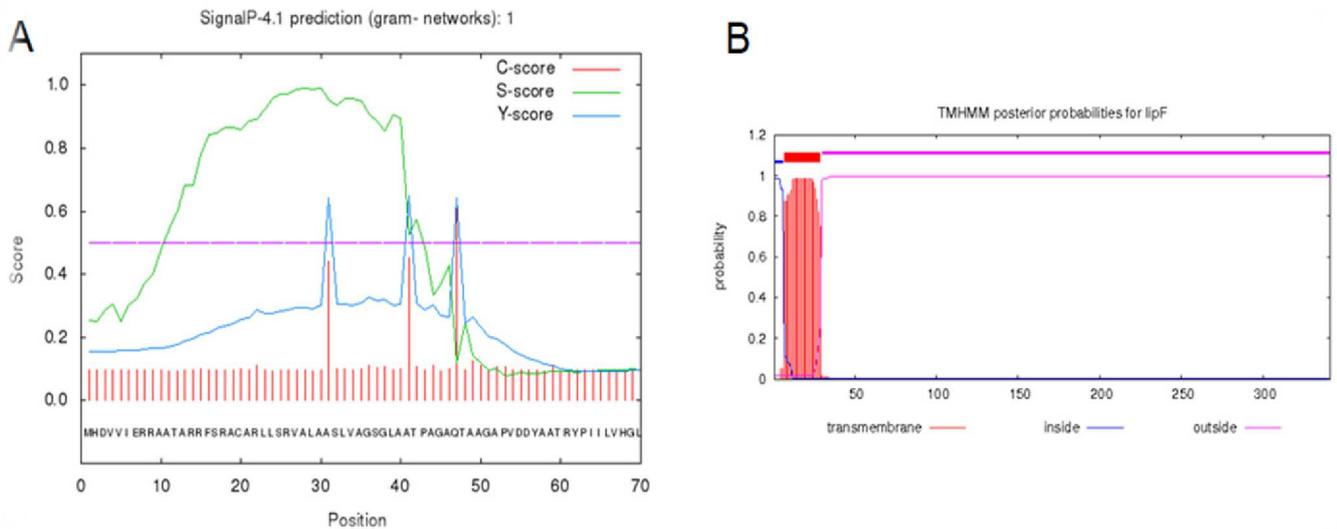


FIGURA 6 - ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DA LIPASE LipE E DE SUA FOLDASE, LifE

LEGENDA: **A**: As regiões com S-score maior são correspondentes ao peptídeo sinal na região N-terminal na lipase. **B**: Os primeiros 50 resíduos na sequência de LifE formam a porção transmembrana responsável pela ancoragem da proteína.

LipE provavelmente é secretada pelo mecanismo de secreção tipo II, pois esse mecanismo é amplamente conservado em bactérias gram-negativas. Além disso, a sequência de LipE possui o peptídeo sinal característico de lipases secretadas por esse mecanismo. Na foldase, um domínio transmembrana foi detectado com o servidor TMHMM. Como o domínio transmembrana da foldase e a sequência sinal da lipase não são requeridas para a atividade das proteínas, geralmente elas são expressas de maneira truncada nessas regiões visando um aumento da sua solubilidade. Por falta de tempo, os genes truncados de *lipE* e *lifE* não puderam ser obtidos neste trabalho.

Já o alinhamento com estruturas secundárias de foldases pertencentes a família II mostrou que LifE apresenta o motivo conservado (RXXFDY(F/C)L(S/T)A). Acredita-se que essa sequência seja indispensável para a interação entre lipase e foldase (VIEGAS et al., 2020). Esse motivo está situado dentro do domínio MD1 constituído pelas hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ (Figura 8).

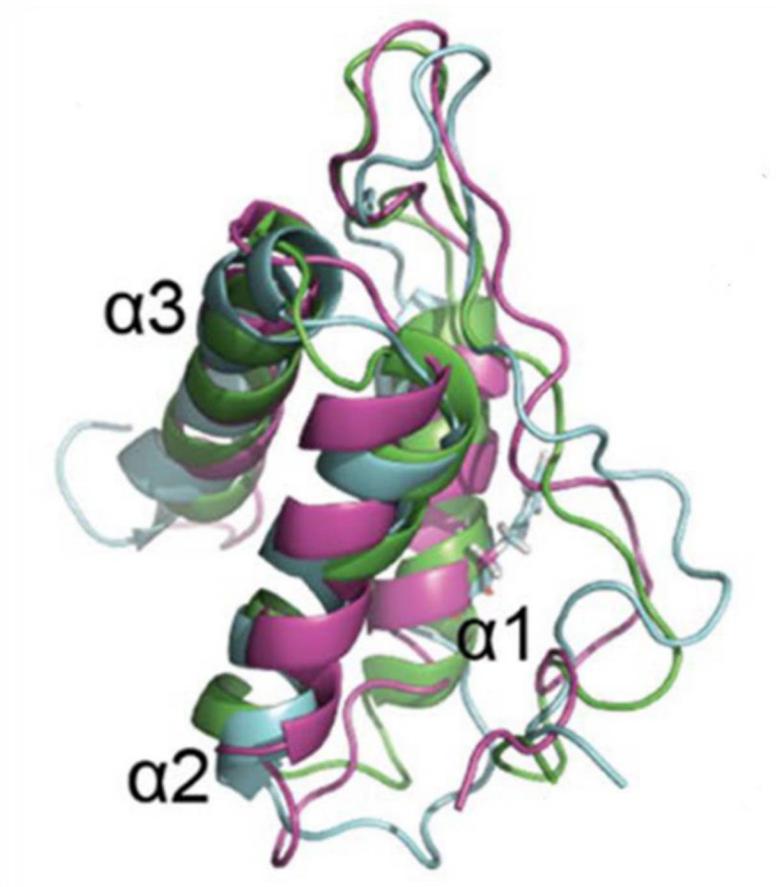


FIGURA 8 - DOMÍNIO MD1 DE FOLDASES

Representação em *cartoon* da estrutura de MD1 de *Pseudomonas aeruginosa* resolvida com NMR (Ressonância magnética nuclear) sobreposta com MD1 de lipase de *Burkholderia glumae* (2ES4). FONTE: Viegas et al. (2020).

Como o motivo MD1 não é inteiramente conservado, alguns resíduos podem ser diferentes entre as foldases. No caso de LifE, um resíduo de Asp⁸⁶ se encontra no lugar do resíduo de Glu⁸⁶ encontrado nas sequências das outras foldases usadas para o alinhamento. LifE também apresenta um resíduo de Phe na posição 93, enquanto que as outras foldases apresentaram um resíduo de Cys na mesma posição. Em adição, o resíduo de Leu⁹⁵ está presente

em LifE, diferentemente das demais sequências de foldases, que possuem um resíduo de Thr⁹⁵ (Figura 9).

As α -hélices que compõem o domínio MD1 estão em contato direto com a lipase, formando uma grande área interfacial entre a lipase e a foldase. O alinhamento usando as foldases de *P. aeruginosa* e *B. glumae* revelou que esse domínio é o que apresenta maior identidade (52%) com as foldases (VIEGAS et al., 2020). A importância do domínio MD1 para a atividade da lipase foi mostrada quando Shibata et al. (1998) realizaram experimentos envolvendo mutações nessa região que resultaram em foldases incapazes de ativar a lipase.

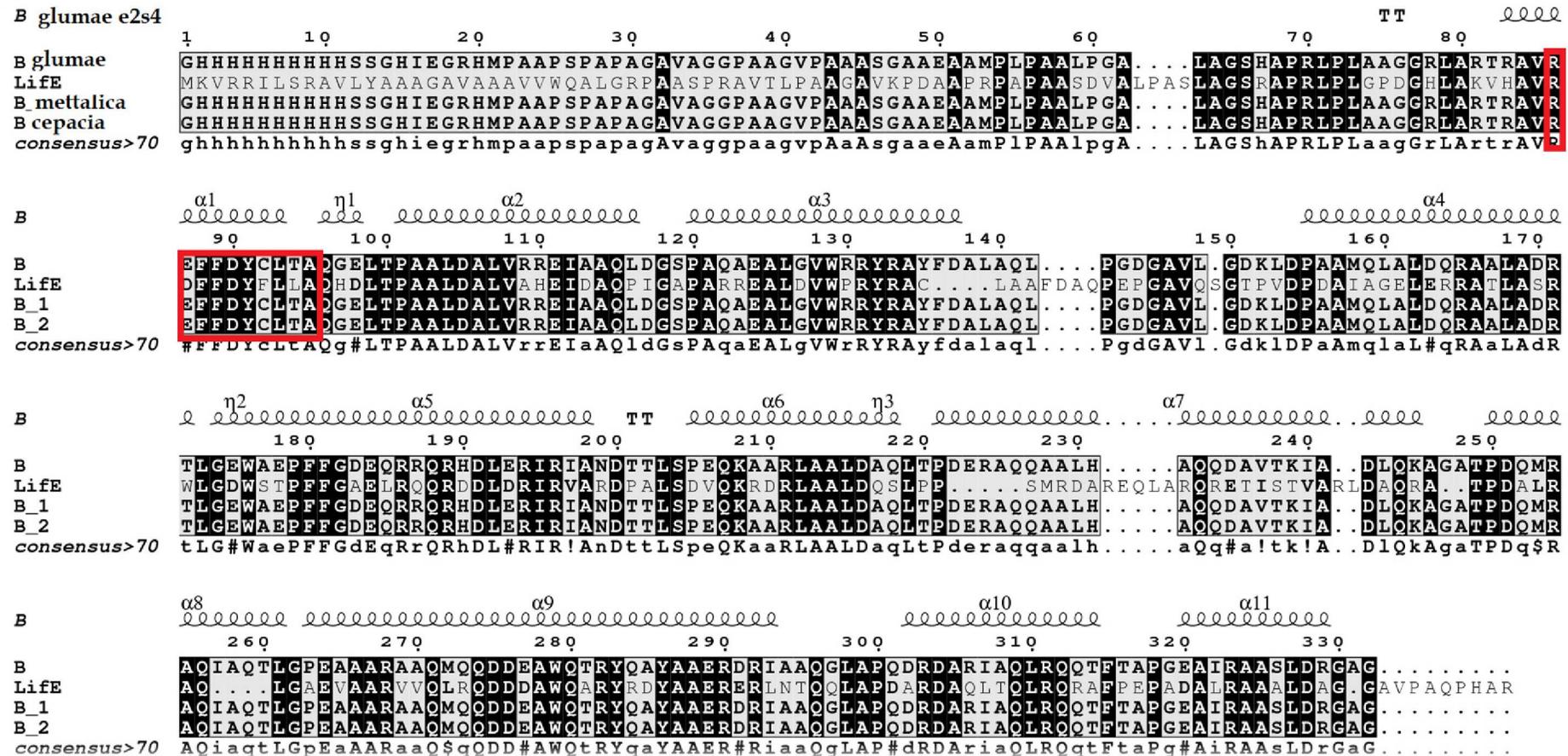


FIGURA 9. ALINHAMENTO DA FOLDASE *Life* COM ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DE FOLDASES DA FAMÍLIA II

LEGENDA: O retângulo vermelho mostra o motivo conservado na alfa hélice $\alpha 1$.

5.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Utilizando o programa MEGAX, a sequência de aminoácidos de LipE e de representantes das 19 famílias de lipases bacterianas classificadas por Kovacic et al (2019) foram submetidas à análise para a classificação filogenética de LipE (Figura 10 A). Foram ao todo 63 sequências, tendo o histórico evolucionário sendo inferido usando o método *Neighbor-Joining*. LipE foi classificada na subfamília 1.2 de lipases bacterianas. Estas lipases exibem alta similaridade com lipases de *B. glumae* (>70%) e apresentam pesos moleculares maiores que os das lipases da família 1.1 devido à presença adicional de duas β -fitas em seu *core* e são secretadas pelo mecanismo tipo II. Várias dessas lipases apresentam pontes dissulfetos e necessitam da interação com foldases específicas para se tornarem ativas (Kovacic et al., 2019). Os resultados estão de acordo com os observados anteriormente na modelagem por homologia confirmando a classificação filogenética de LipE.

A sequência de LifE também foi submetida à análise filogenética utilizando o mesmo método de análise de LipE (Figura 10 B), mas com representantes dos quatro grupos de foldases de bactérias gram-negativas (ROSENAU et al., 2004). Análise classificou LifE no grupo II de foldases bacterianas, grupo este composto por foldases produzidas pelos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*.

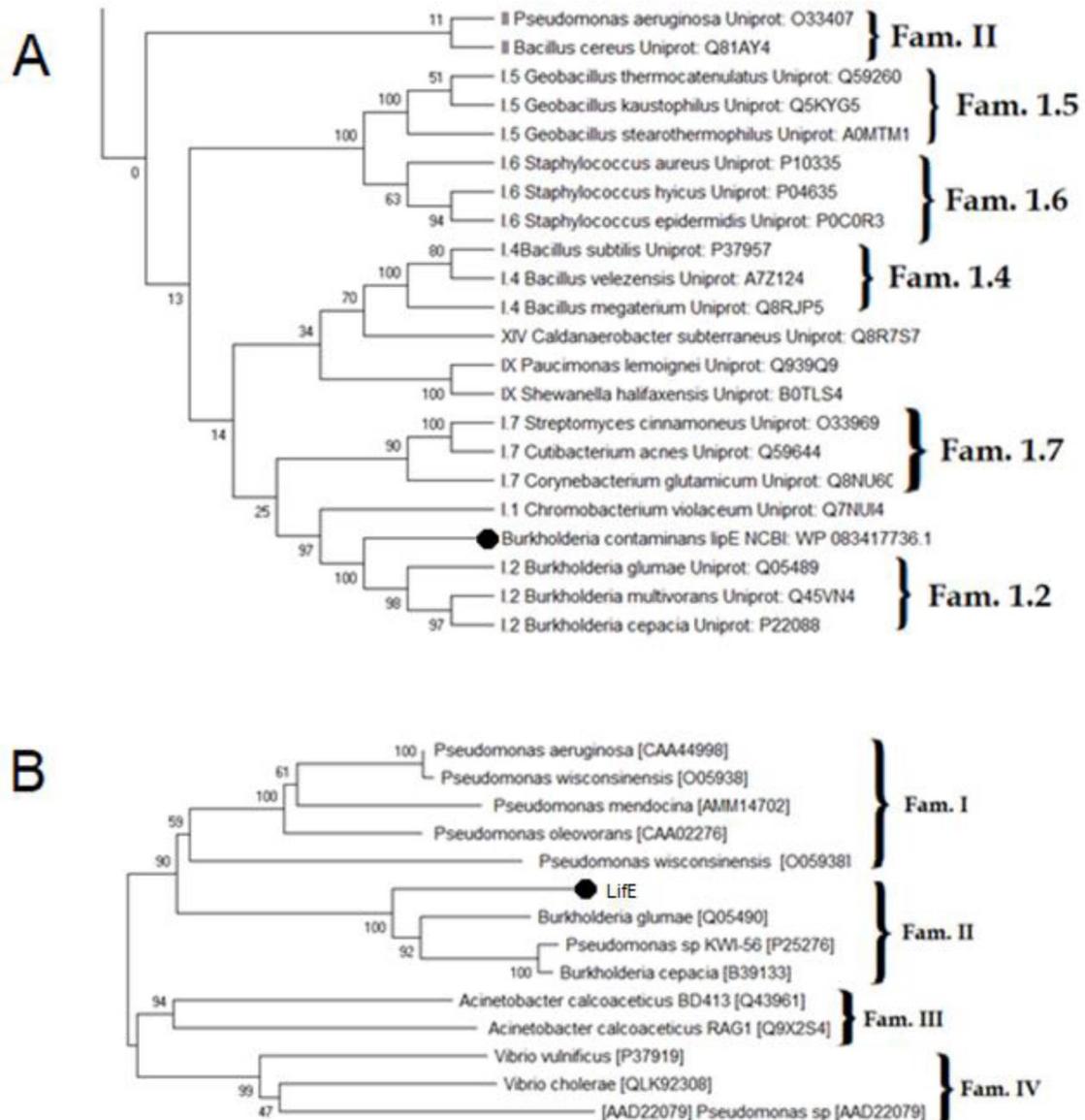


FIGURA 10 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DA LIPASE LipE E DE SUA FOLDASE ESPECÍFICA, LifE

LEGENDA: **A:** As proteínas mais similares à LipE são lipases de *Burkholderia contaminans*, *B. glumae* e *B. multivorans*, todas pertencentes à subfamília 1.2. **B:** A análise classificou LifE na família II de foldases próxima a foldases de *Burkholderia sp.* e *Pseudomonas sp.*

5.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DA LIPASE LipE

O modelo de homologia de LipE foi construído utilizando o programa SWISS-MODEL, tendo a estrutura da lipase de *B. cepacia* (1YS2) (MEZZETTI et al., 2005) como molde, que

foi escolhida porque apresenta alta identidade com *lipE* (70.75%) e estrutura resolvida com resultados confiáveis. O modelo foi exaustivamente refinado, principalmente nas regiões de alças, que foi feito utilizando o programa MODELLER (SHEN; SALI., 2006), que gera diferentes conformações com diferentes valores de DOPE (Discrete Optimized Protein Energy). A conformação com menores valores DOPE, portanto, de menor energia e, conseqüentemente, de maior estabilidade foi escolhida para obtenção do modelo definitivo (Figura 11).

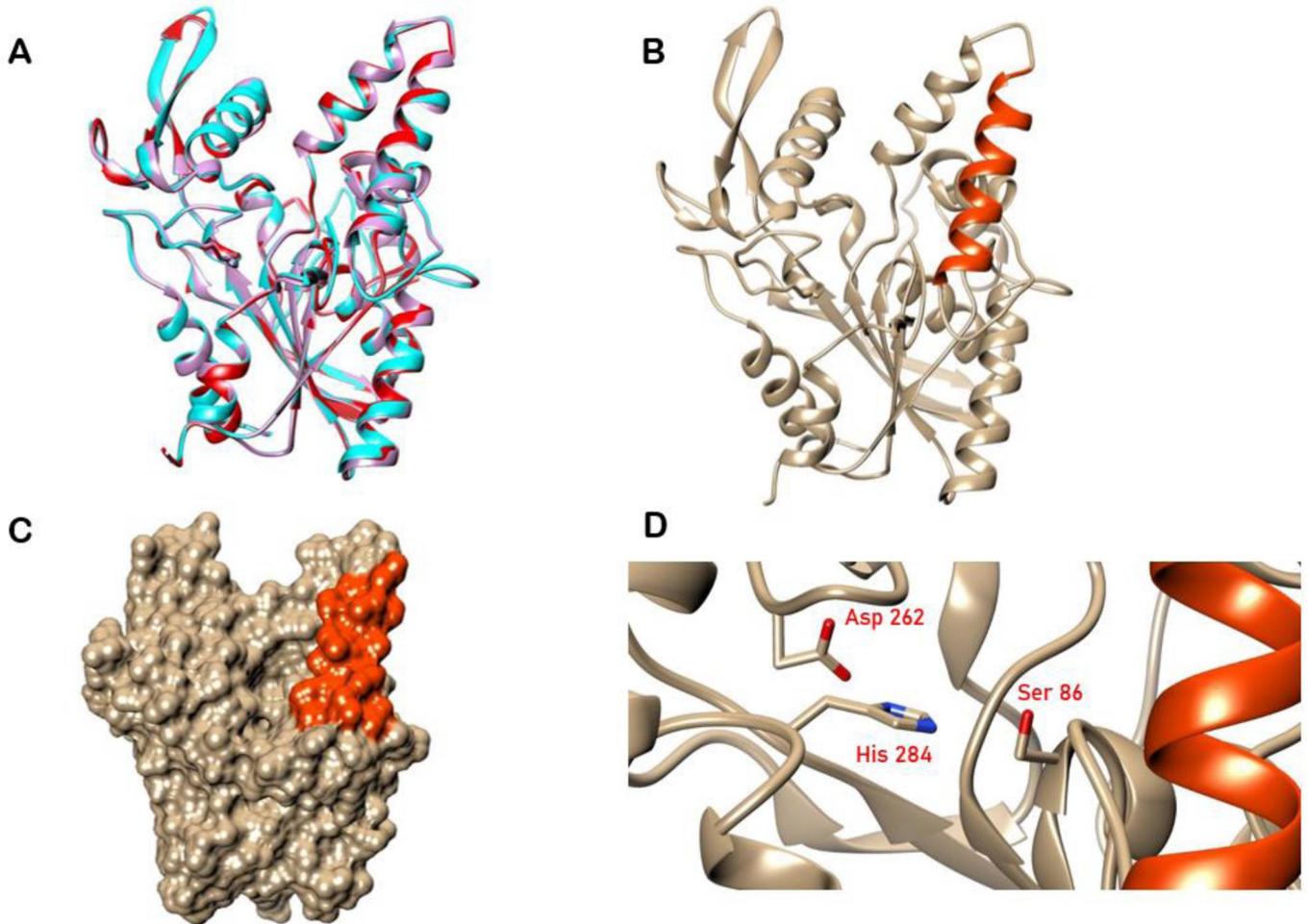


FIGURA 11. ANÁLISE ESTRUTURAL POR HOMOLOGIA DA LIPASE LipE

LEGENDA: **A:** Modelo sobreposto com as lipases de *Burkholderia cepacia* (PDB: 1YS2) e *B. contaminans* (LipBC). **B:** Modelo estrutural de LipE em conformação aberta com detalhe em laranja mostrando a *lid*. **C:** Modelo com representação em superfície. **D:** Detalhe mostrando os resíduos da tríade catalítica. Imagem gerada utilizando o programa CHIMERA.

5.3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA LIPASE LipE

A estrutura tridimensional de LipE apresenta conformação globular, consistindo de um domínio *core* com características típicas das α/β -hidrolases (Figura 11 B e C). Sua α -hélice 5 compõe a *lid* que cobre a cavidade catalítica na conformação fechada da lipase.

Os resíduos da tríade catalítica estão situados na posição característica das lipases pertencentes a subfamília I.2 de lipases bacterianas, com o resíduo de serina catalítica situado no cotovelo catalítico (Figura 11 D). Essa conformação do nucleófilo está presente em outras estruturas tridimensionais já elucidadas, nas quais o resíduo de serina adota uma conformação com ângulos desfavoráveis; porém, estudos mostraram que essa conformação é essencial para a atividade catalítica da lipase já que quando a serina foi induzida a uma conformação mais favorável, a atividade da lipase foi seriamente afetada, portanto, sendo muitas vezes considerada como característica em comum de todas as α/β -hidrolases (NARDINI et al., 2000).

A análise com o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) mostrou que o modelo conta com 91,2% dos resíduos em posições altamente favoráveis e apenas um resíduo de serina em uma posição ligeiramente permitida (Figura 12). Esse resultado está de acordo com a literatura, pois esse resíduo é a Ser⁸⁶ da lipase, responsável pela ação catalítica da enzima, e que se encontra em conformação desfavorável no cotovelo catalítico ($\phi = 57^\circ$, $\psi = -111^\circ$). Uma estrutura de boa qualidade tem a maioria dos seus resíduos em regiões permitidas (NARDINI et al., 2000). O modelo final, usando o programa ReFOLD (ADIYAMAN e MCGUFFIN, 2021) apresentou uma pontuação de qualidade global de 0,566 com um valor de p de $4,877 \cdot 10^{-6}$ indicando o enovelamento correto. Além disso, o modelo foi refinado usando o programa Q-MEANDisCo (STUDER et al., 2020), obtendo-se uma pontuação de 0,78, podendo então ser considerado um modelo com boa qualidade, pois está acima do valor de 0,40, que é o limiar entre o modelo aceitável e o incorreto.

O gráfico de Ramachandran foi usado como teste da qualidade do modelo por que ele é uma representação em 2D, dos ângulos ϕ e ψ do esqueleto estrutural da proteína, oferecendo uma versão simplificada da conformação da proteína estudada. Os ângulos ϕ e ψ se arranjam em regiões específicas no gráfico, onde cada região corresponde a uma estrutura secundária particular. Dependendo da conformação, os átomos podem ocupar três das maiores regiões “permitidas”, sendo duas regiões maiores conhecidas como regiões alfa e beta e uma região menor representando as conformações que espelham as encontradas na região alfa (Figura 12). Essas regiões são consideradas permitidas, pois quando os átomos dos resíduos se encontram

nesses arranjos, não há o risco de colisão entre eles. Portanto, quando um modelo apresenta resultados positivos no gráfico de Ramachandran (com a maioria de seus resíduos encontrados em regiões favoráveis ou próximas delas), sua qualidade é considerada boa (HOLLINGSWORTH e KARPLUS, 2010).

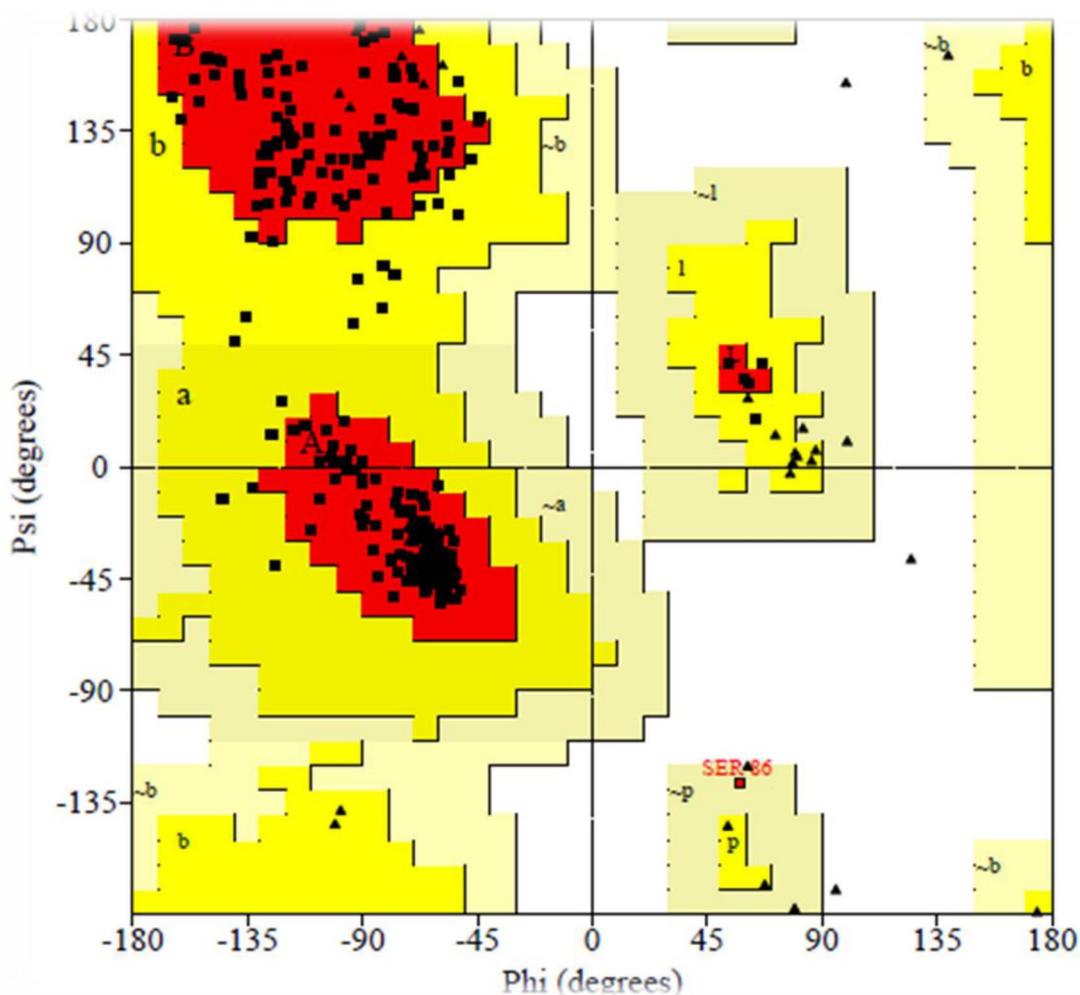


FIGURA 12 - GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA A LIPASE LipE

O modelo de LipE tem 91,2% dos resíduos em regiões estereoquimicamente favoráveis. Região mais favorecida em cor vermelha, região adicionalmente favorecida em cor amarela, região ligeiramente favorecida em bege e região proibitiva em branco (Os triângulos nas posições proibitivas são glicinas, resíduos que apresentam grande mobilidade de torção e podem assumir essa conformação menos favorável estericamente).

5.3.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DA FOLDASE LipE

Estudos mostraram que todas as foldases possuem estrutura secundária muito similar entre si, consistindo quase que exclusivamente de α -hélices (70%) e de segmentos desordenados

(30%). A estrutura conservada pode indicar a conservação do mecanismo que auxilia no envelhecimento da lipase (ROSENAU et al., 2004). O modelo de LifE foi obtido utilizando as mesmas ferramentas e métodos que foram empregados para a obtenção do modelo de LipE (Figura 13). O modelo de homologia foi construído utilizando como molde a foldase de *B. glumae* (PDB: 2ES4) (PAUWELS et al., 2006), a única foldase complexada com a sua lipase a ter sua estrutura resolvida até esta data. O modelo foi validado utilizando o programa PROCHECK, que forneceu o gráfico de Ramachandran, mostrando que 96,3 % dos resíduos de aminoácidos estão em conformação estéricas altamente favoráveis (Figura 15).

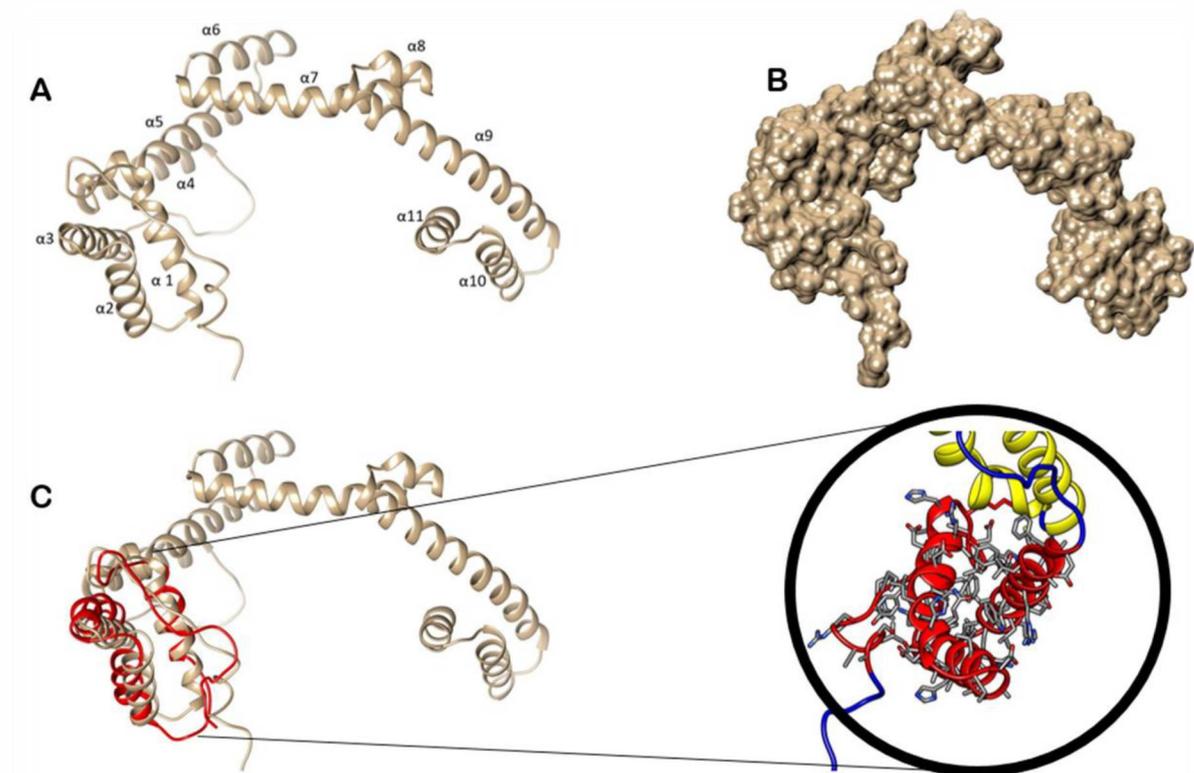


FIGURA 13 -ANÁLISE ESTRUTURAL POR HOMOLOGIA DA FOLDASE LifE

LEGENDA: **A**: modelo de homologia de LifE; **B** Modelo com representação em superfície; **C**: Sobreposição usando o domínio MD1 de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB: 5OVM) com detalhe da porção C-terminal, possivelmente responsável direta pela interação com a lipase.

As foldases são compostas geralmente por cinco domínios: um domínio transmembrana (TMD), seguido por uma região altamente desestruturada que serve como *linker* (VLD), um

domínio helicoidal estendido (EHD) e dois minidomínios globulares MD1 e MD2, sendo MD1 e MD2 os domínios que interagem diretamente com a lipase (VIEGAS et al., 2020). A sobreposição de LifE com o domínio MD1 de foldase de *P. aeruginosa* (PDB: 5OVM) mostrou que LifE possui o resíduo de Tyr na posição esperada (Figura 14). Três resíduos se mostraram importantes para a atividade das Lifs: Tyr⁹⁹, Ser¹⁰² e Arg¹¹⁵ e dentre eles a Tyr⁹⁹ pode ter um efeito determinante na formação do complexo lipase-foldase (SHIBATA et al., 1998).

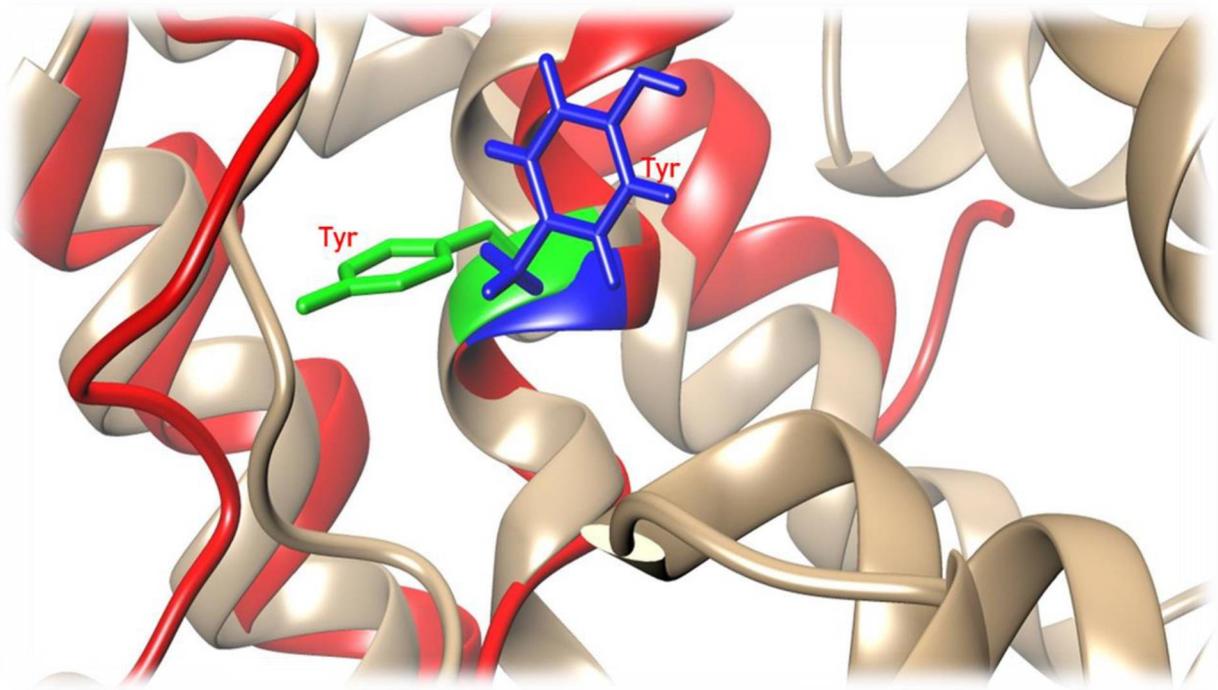


FIGURA 14 - SOBREPOSIÇÃO DA FOLDASE LifE COM O DOMÍNIO MD1 DA FOLDASE DE *Pseudomonas aeruginosa* (PDB: 5OVM)

LEGENDA: Os resíduos de Tyr na posição 99 no MD1 são protagonistas na interação com a lipase. A sobreposição com o domínio MD1 da foldase de *Pseudomonas aeruginosa* (detalhe em verde) mostrou que LifE apresenta o resíduo de Tyr na posição esperada (detalhe em azul), confirmando a conservação desse resíduo entre as foldases. Representação em *cartoon*. FONTE: “O Autor” (2021)

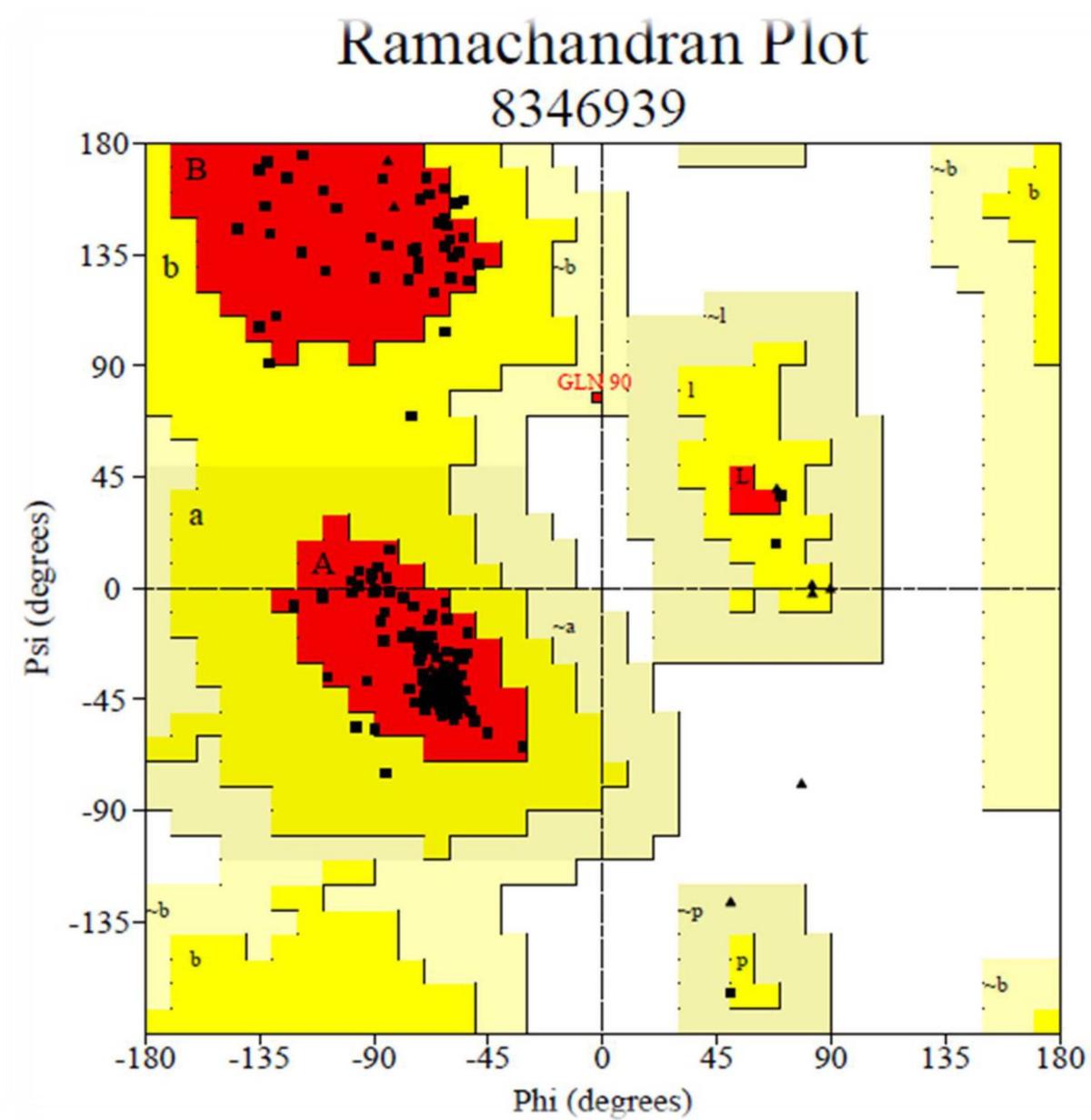


FIGURA 15 - GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA A FOLDASE LifE

O modelo de LifE tem 96,3% dos resíduos em regiões favoráveis. Região mais favorecida em cor vermelha, região adicionalmente favorecida em cor amarela, região generosamente favorecida em bege e região proibitiva em branco.

5.4 ENSAIOS DE *CROSS-REFOLDING*

Sabendo que LipE precisa de interação com uma foldase para se tornar ativa, antes dos ensaios de subclonagem para a obtenção do gene *lifE* clonado em pT7-7, foram realizados experimentos para testar se LipE poderia ser ativada por outras foldases além de sua foldase específica, LifE. Isto foi feito porque as foldases empregadas neste experimento já estavam clonadas e disponíveis para uso. Para tanto, foram realizados ensaios de *cross-refolding*, técnica que foi empregada por Traub et al. (2001), onde estudos usando lipases de *Chromobacterium viscosum* e *Burkholderia cepacia* e a foldase de *Pseudomonas sp* produziram lipases com atividades entre 72% e 120% das atividades obtidas com as lipases cognatas. Esses experimentos mostraram, pela primeira vez, que lipases podem ser enoveladas eficientemente na presença de foldases relacionadas, de preferência pertencentes à mesma família.

Tendo conhecimento dessas informações, LipE foi submetida a ensaios de enovelamento *in vivo* com as foldases LifBC, LifMF3 e LifG9, sendo a primeira oriunda de *B. contaminans* LTEB11 e as duas últimas isoladas, juntamente com as suas lipases, de biblioteca metagenômica. LifMF3 e LifG9 foram classificadas na família III, enquanto LifBC pertence à família II das foldases bacterianas (ALMEIDA et al., 2019; ALNOCH et al., 2018 e MARTINI et al., 2014).

Para os ensaios de expressão foram utilizadas diferentes cepas de *E. coli*. Foram elas: Roseta *pLysS*, BL21 Star, SHuffle, B121 (DE3) e Rosetta. Após as etapas de transformações, as colônias transformantes foram plaqueadas em meio seletivo com canamicina e ampicilina. Após 16 h de incubação, foram obtidas colônias apenas nas placas contendo as cepas Rosetta e BL21 (DE3). Essas colônias foram coletadas e induzidas para expressão da proteína recombinante. A eletroforese SDS-PAGE (Figura 16) mostrou que LipE, que possui peso molecular teórico de 38 kDa, ficou na fração solúvel quando coexpressa com LifMF3 em Roseta, com LifBC em B121 (DE3) e com LifG9 em BL21 (DE3). Esse resultado é interessante, pois a proteína só se torna solúvel quando está enovelada corretamente, sugerindo que as foldases foram capazes de enovelar LipE.

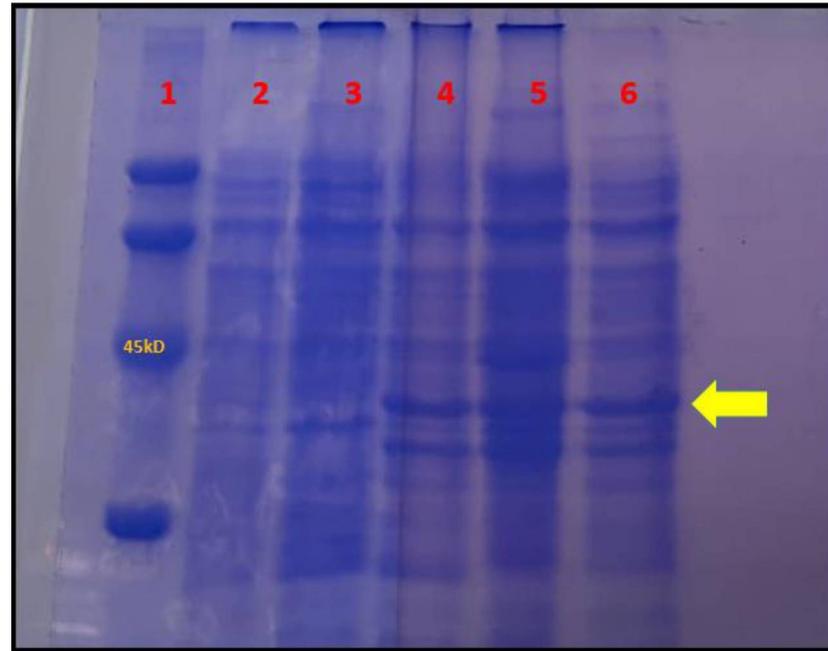


FIGURA 16 - ELETROFORESE SDS-PAGE DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRODUTOS DE EXPRESSÃO DOS ENSAIOS DE *CROSS-REFOLDING* DA LIPASE LipE COM DIFERENTES FOLDASES

LEGENDA: 1: Marcadores de peso molecular; 2: LipE-LifMF3, expressa em BL21; 3: LipE-LifBC expressa em Roseta; 4: LipE-LifMF3, expressa em Roseta; 5: LipE-LifBC, expressa em BL21; 6: LipE-LifG9, expressa em BL21. **Seta amarela:** Bandas correspondentes à LipE (peso molecular teórico 38 kDa).

Os ensaios de atividade de hidrólise contra acetato de *p*-nitrofenila dos extratos resultantes das reações de *cross-refolding* mostraram que apenas a coexpressão de LipE com a foldase de LipBC apresentou atividade, mas ainda assim, muito baixa ($0,10 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) para ser considerada importante. Esta construção também foi testada em ensaios de hidrólise contra tributirina, óleo de oliva e tricaprilina pelo método titulométrico, mas também não apresentou atividade.

5.5 COEXPRESSÃO DA LIPASE LipE COM SUA FOLDASE ESPECÍFICA, LifE

5.5.1 SUBCLONAGEM DO GENE *lifE* EM VETOR pT7-7

No intuito de expressar LipE em sua forma ativa, sabendo-se que ela necessita da interação com a foldase LifE, pode-se optar por duas estratégias já bem consolidadas na literatura: a coexpressão *in vivo* ou o *refolding in vitro*. A primeira oferece uma vantagem em relação à segunda, pois é um procedimento mais simples e se obtém a lipase ativa em apenas uma etapa. Para os ensaios de coexpressão, é necessário que os genes estejam clonados em vetores com resistência a diferentes antibióticos. Para isso, foi escolhido o vetor pT7-7, que

contém um sítio de ligação ribossômica T7, controlado pelo promotor Lac, possibilitando a indução por IPTG, além de possuir uma região codificadora de His-tag para purificação por cromatografia de afinidade. O vetor pT7-7 já demonstrou bons resultados em trabalhos anteriores abordando estratégias de coexpressão (ALMEIDA et al., 2019; ALNOCH et al., 2018; MARTINI et al., 2014).

A reação de subclonagem é um processo relativamente simples, porém, foram encontrados problemas para se concluir essa etapa. Quando a reação foi preparada e incubada na condição ótima das enzimas de restrição, o resultado não pôde ser confirmado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, onde não foi detectada banda visível. As condições da reação foram mudadas, variando-se a quantidade de enzima, o vetor e o tempo de incubação e a reação foi repetida várias vezes, porém com resultados negativos. O sucesso da reação de restrição e a detecção da banda observável de *lifE* em gel de agarose foi alcançado após a obtenção de novos lotes de enzimas de restrição, indicando que o problema na obtenção do gene estava na qualidade das enzimas (Figura 17). O vetor pT7-7 utilizado para a clonagem de *lifE* foi linearizado com as mesmas enzimas para se certificar que o vetor tinha extremidades complementares às do gene *lifE*.

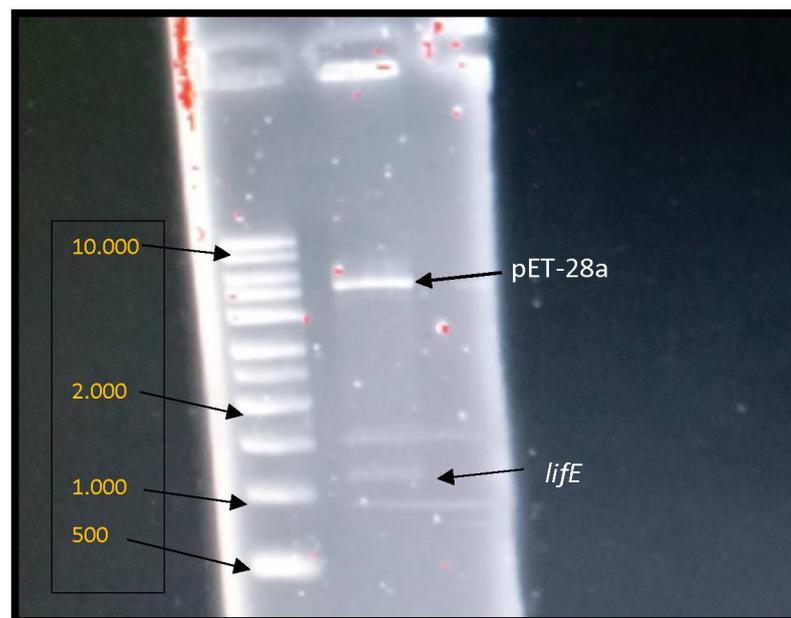


FIGURA 17 - GEL DE ELETROFORESE EM AGAROSE PARA CONFIRMAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO GENE *lifE* DO VETOR pET-28a

O fragmento foi cortado do gel e purificado. As marcas acima e abaixo da banda do gene *lifE* são os cortes feitos para a extração da banda do gel.

Para a introdução do gene *lipE* no vetor pT7-7, tanto o vetor quanto o gene purificados foram submetidos à uma reação de ligação. Os resultados dos controles foram satisfatórios, indicando que todos os componentes da ligação estavam adequados para a ligação (Figura 18). A reação de ligação foi incubada por 2 h em temperatura ambiente e após o tempo de incubação, o produto da ligação foi transformado em células termocompetentes TOP10 e plaqueado em meio seletivo contendo ampicilina. Colônias visíveis de células transformantes foram detectadas após incubação da placa de Petri por 16 h a 37 °C (Figura 18 E). Entretanto, após a ligação, o clone positivo não pôde ser encontrado, pois não apresentou nenhuma banda eletroforética diferente do padrão dos demais controles.

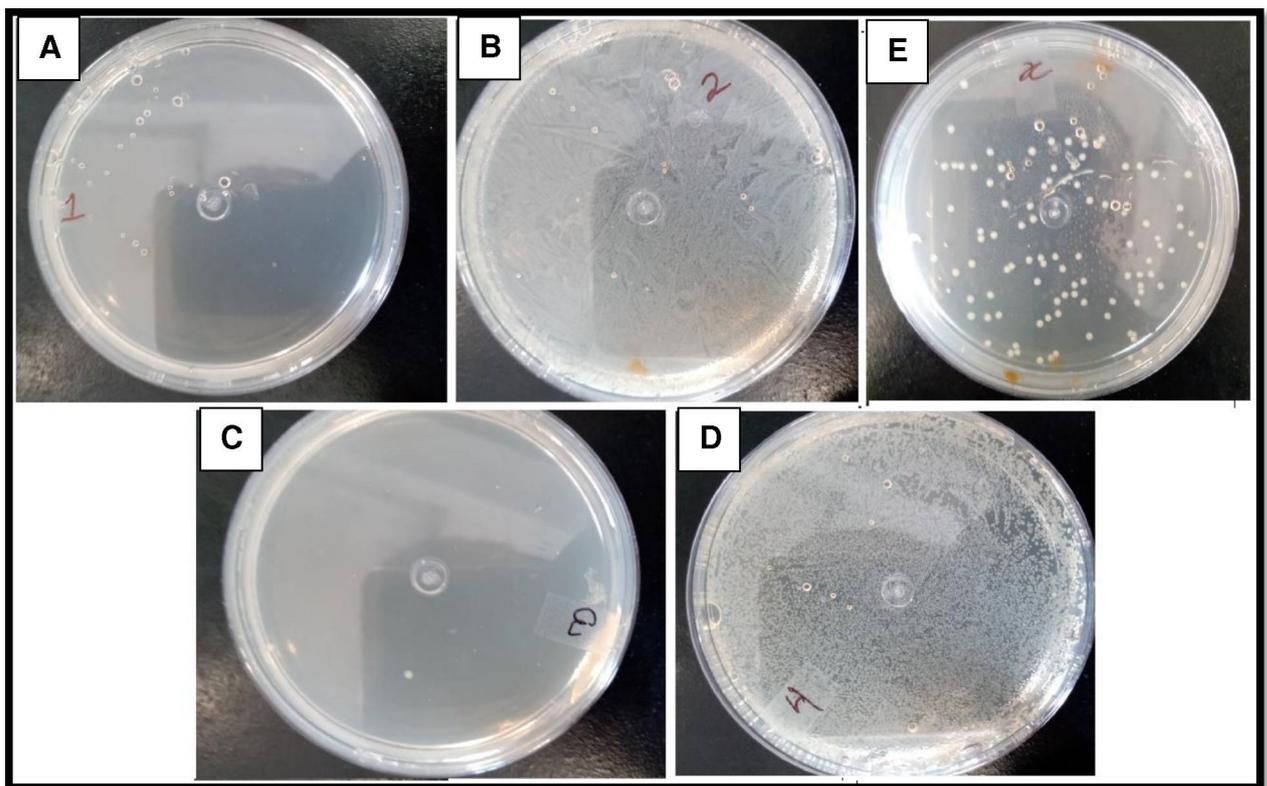


FIGURA 18 - CONTROLES DOS TESTES DE LIGAÇÃO DO GENE *lipE* NO VETOR PT7-7

LEGENDA: **A:** Controle negativo: *E. coli* sem inserto, para testar a eficiência dos antibióticos; **B:** controle positivo: *E. coli* transformada com plasmídeo contendo o gene de resistência à ampicilina, para testar a qualidade das células competentes; **C:** Teste de digestão: *E. coli* transformada com o plasmídeo submetido à reação de restrição, para testar a qualidade das endonucleases; **D:** Teste de religação: *E. coli* transformada com o plasmídeo digerido com uma enzima (NdeI) e religado, para checar a qualidade da enzima T4; **E:** Colônias de *E. coli* transformadas com os plasmídeos da reação de ligação.

Uma segunda forma de abordagem foi adotada no intuito de obter a construção de forma mais rápida e menos dispendiosa, que baseou-se na montagem da reação de ligação sem purificar as amostras de DNA. Após a ligação e transformação obteve-se formação de colônias

de *E. coli* em placa de Petri contendo o antibiótico ampicilina (Amp), sugerindo que a clonagem foi bem-sucedida (Figura 19). A triagem dos clones positivos foi feita utilizando gel de agarose 0,8%. Os clones positivos apresentam maior tamanho que os vetores sem o inserto de *lifE*, portanto, o padrão de corrida dos clones se diferenciou, ficando ligeiramente acima das demais bandas de corrida (Figura 20).



FIGURA 19 - COLÔNIAS DE *Escherichia coli* TRANSFORMADAS COM O PRODUTO DA LIGAÇÃO

A formação de colônias em meio contendo o antibiótico (ampicilina) indica o sucesso da reação de clonagem.

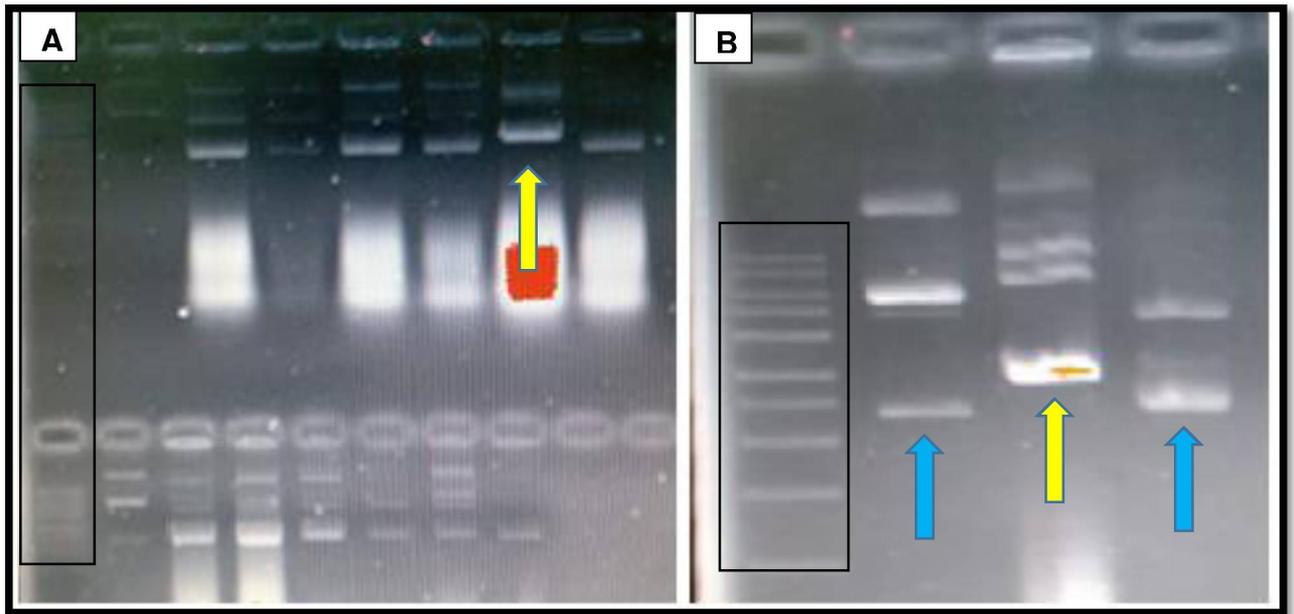


FIGURA 20. TRIAGEM POR CLONES POSITIVOS EM GEL DE AGAROSE

LEGENDA: Os clones positivos carregam o inserto, portanto apresentam padrão de corrida diferente dos demais (seta amarela). **A:** Corrida inicial de triagem **B:** Confirmação do padrão por uma segunda corrida eletroforética usando vetor pT7-7 vazio como controle de confirmação (seta azul).

5.6 ENSAIOS DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DA LIPASE E FOLDASES UTILIZADAS NESTE TRABALHO

Os clones positivos foram cultivados em meio Luria Bertani para extrair e purificar o vetor recombinante, que foi, em seguida, transformado em BL21e submetido à indução da expressão de LipE com IPTG para expressão da proteína de interesse. Após o rompimento das células e centrifugação para remoção dos restos celulares, o extrato livre de células foi analisado por eletroforese SDS-PAGE. Foram detectadas as bandas compatíveis com as massas moleculares teóricas de LipE e LifE (Figura 21 B) para a construção na qual LipE é coexpressa com LifE ou com a foldase LifBC (Linhas 1 e 2 respectivamente). Quando LipE é expressa na ausência de LifE, verificou-se que ficou na fração insolúvel, demonstrando a necessidade da presença de LifE para a obtenção da lipase enovelada (Figura 21 A).

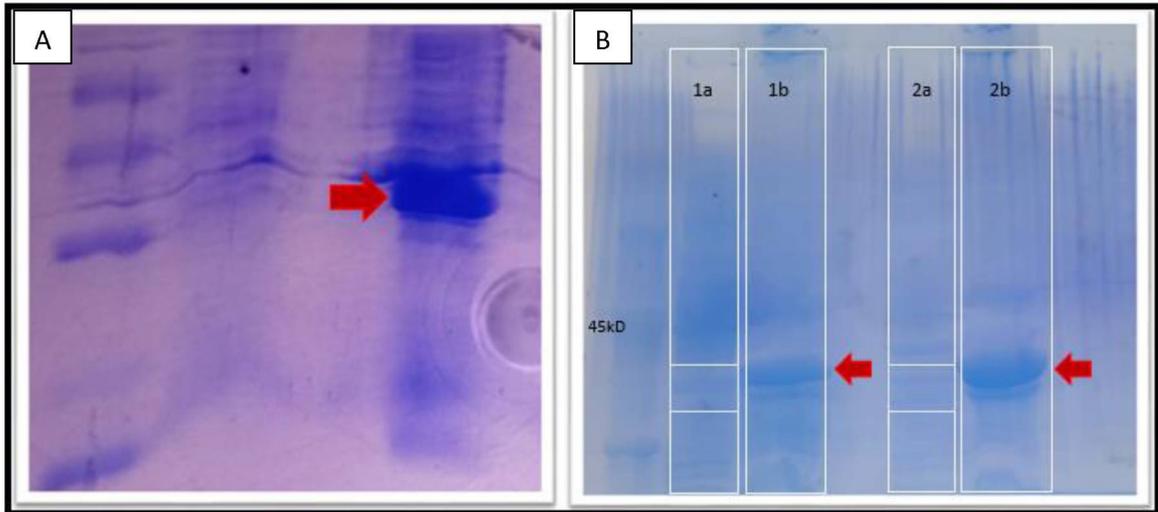


FIGURA 21 - ELETROFORESE SDS-PAGE COM AMOSTRAS DAS CONSTRUÇÕES DAS EXPRESSÕES DE LipE

LEGENDA: **A:** Expressão de LipE na ausência da foldase, onde LipE permaneceu inteiramente na fração insolúvel (seta vermelha). **B:** Coexpressão de LipE com LifE (à esquerda) e com LifBC (à direita) indicando que LipE se encontra em uma pequena fração na forma solúvel quando coexpressa com a foldase (retângulos brancos). O peso molecular teórico de LipE é 38 kDa. **1a:** LipE-LifE fração solúvel. **1b:** LipE-LifE fração insolúvel. **2a:** LipE-LifBC fração solúvel. **2b:** LipE-LifBC fração insolúvel

5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LipE POR HIDRÓLISE DE TRIBUTIRINA EM PLACA DE PETRI

Para a confirmação dos clones com atividade, os extratos lisados contendo as proteínas LipE e LifE foram diretamente aplicados em placas com ágar suplementado com tributirina como substrato, juntamente com os controles correspondentes à LipE, expressa sem a foldase, LifE, o extrato da lipase LipC12 (controle positivo) e LipE expressa com a foldase LifBC. também foram aplicados. Após a incubação (37 °C por 16 h) houve formação de halos de hidrólise apenas ao redor das regiões onde o extrato de LipE-LifE e do controle positivo (LipC12) foram aplicados (Figura 22 A,B). Foram feitos testes de hidrólise em placas de Petri contendo óleo de oliva e tricaprilina, porém, não houve formação de halos.

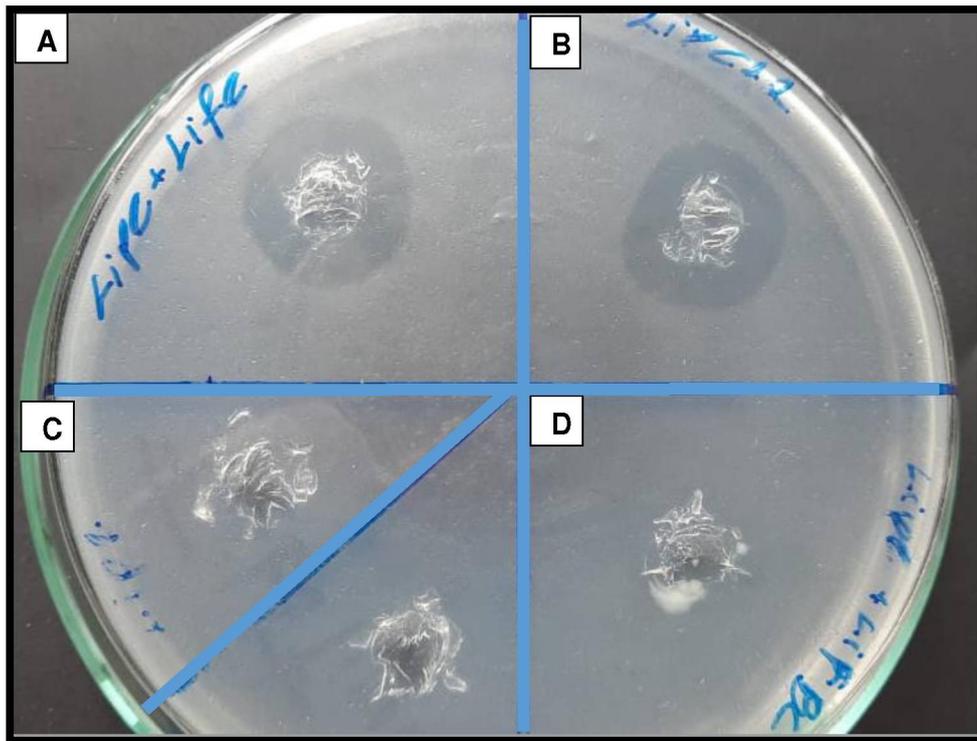


FIGURA 22 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE LipE EM PLACA COM TRIBUTIRINA

LEGENDA: **A:** LipE coexpressa com LifE onde foi detectado halo de hidrólise após incubação por 5 dias a 37°
C; B: LipC12, controle positivo; **C:** LipE e LifE expressas separadamente; **D:** LipE coexpressa com LifBC.

5.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE LipE

A fração solúvel da coexpressão LipE-LifE foi submetido a ensaios de hidrólise utilizando acetato de *p*-nitrofenila (*p*-NPA), butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB) e palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP). LipE apresentou atividade de hidrólise contra os três substratos, sendo observado o aumento da atividade com o decréscimo no número de carbonos do substrato (Figura 21); entretanto, os valores foram muito baixos, variando de 0,01 a 0,04 U·mg⁻¹ e ainda precisam ser validados repetindo e variando as condições de ensaio.

Quando a atividade de LipE foi testada contra triglicérides naturais pelo método titulométrico, não foi detectada atividade contra nenhum dos substratos utilizados (tributirina, óleo de oliva e tricaprilina), mostrando que o extrato contendo LipE-LifE não apresentava atividade suficiente para detecção quantitativa, contrariamente do que foi observado para os ensaios em placa de Petri, onde foi possível a visualização de formação de halo contra a tributirina.

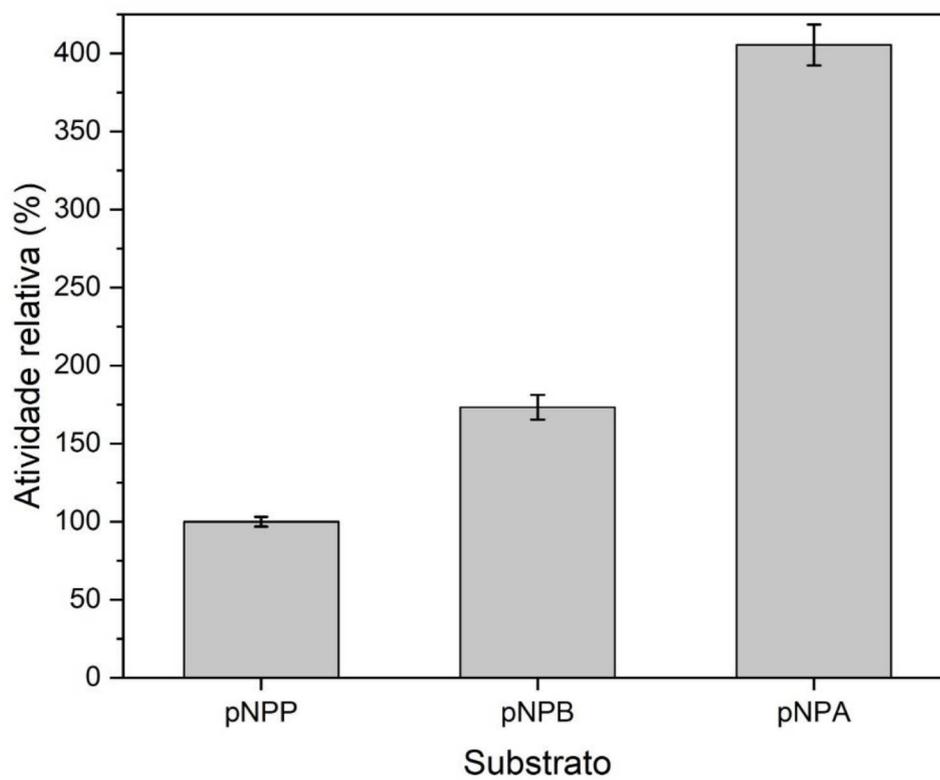


FIGURA 23 - ATIVIDADE DA LIPASE LIPE CONTRA SUBSTRATOS SINTÉTICOS

Atividade contra palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) ($0,0116 \pm 0,0004 \text{ U mg}^{-1}$) corresponde a 100%.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram feitos experimentos de expressão e caracterização de uma lipase, LipE, e sua foldase, LifE, além de ensaios *in silico* para determinação estrutural destas proteínas e sua classificação filogenética.

A partir dos resultados obtidos dos ensaios *in silico*, pode-se concluir que:

- A análise de sequência dos genes *lipE* e *lifE* mostrou que ambas as proteínas são provavelmente extracelulares, sendo secretadas pelo mecanismo de secreção tipo II.
- O alinhamento mostrou que LipE é formada por 318 resíduos de aminoácidos, tem 89% de identidade com lipases produzidas por *Burkholderia metallica* e 88% com lipases produzidas por *B. cepacia*, possuindo um sítio de ligação ao cálcio e dois resíduos de cisteína, com provável formação de ponto dissulfeto. O peso molecular teórico de LipE é 38 kDa e seu ponto isoelétrico teórico é 6.8.
- A modelagem por homologia mostrou que LipE apresenta características compatíveis às lipases da família I.2 de lipases bacterianas, apresentando o domínio *lid*, com o modelo final apresentando a maioria dos resíduos em posições favoráveis (91,2%) e pontuação de qualidade global de 0,56, considerado como modelo de boa qualidade.
- Para a foldase LifE, o modelo obtido por homologia mostrou que 96,3% dos resíduos se encontram em posições favoráveis e que a proteína consiste de α -hélices (70%) e de segmentos desordenados, possuindo um resíduo de tirosina, essencial para a sua função de enovelamento da lipase.
- A análise filogenética de LipE classificou-a na subfamília I.2 de lipases bacterianas, confirmando os resultados obtidos na modelagem por homologia. LifE foi classificada no grupo II de foldases bacterianas, mesmo grupo das foldases produzidas pelos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*.

Para os experimentos de expressão da lipase LipE, pode-se concluir que:

- Os ensaios de *cross-refolding* com outras foldases bacterianas mostraram que apenas a foldase de outra lipase da própria bactéria (LifBC) produziu LipE ativa, mas ainda assim, com atividade muito baixa para ser considerada eficiente.
- Os ensaios de coexpressão de LipE com sua foldase específica, LifE, mostraram que a clonagem foi eficiente, com clones mostrando atividade em placas de Petri com tributirina.
- O extrato solúvel de LipE-LifE apresentou atividade relativamente baixa contra ésteres de *p*-nitrofenila e não apresentou atividade contra triglicerídeos, havendo necessidade de se otimizar a coexpressão de LipE-LifE

7. PERSPECTIVAS

Sugere-se como trabalhos futuros:

- A repetição dos experimentos de expressão, com caracterização da atividade em condições otimizadas;
- A otimização da coexpressão utilizando outras construções de *lipE* e *lifE*, utilizando diferentes vetores e alternando genes inteiros e truncados;
- A caracterização cinética e bioquímica de LipE, envolvendo ensaios de atividade e estabilidade a temperatura e solventes orgânicos;
- A imobilização e caracterização de LipE imobilizada, estudando-se parâmetros como regiosseletividade e enantiosseletividade, para explorar o potencial de aplicação de LipE em biocatálise.

8 REFERÊNCIAS

ADIYAMAN, R.; MCGUFFIN, L. J. ReFOLD3: refinement of 3D protein models with gradual restraints based on predicted local quality and residue contacts. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W589–W596, 2021.

ALMEIDA, J. M. et al. BBiochemical characterization and application of a new lipase and its cognate foldase obtained from a metagenomic library derived. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

ALNOCH, R. C.; CARDOSO, R. L. A.; GUIZELINI, D.; et al. Genome sequencing of *Burkholderia contaminans* LTEB11 reveals a lipolytic arsenal of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 619–624, 2019.

ALNOCH, R. C.; STEFANELLO, A. A.; PAULA MARTINI, V.; et al. Co-expression, purification and characterization of the lipase and foldase of *Burkholderia contaminans* LTEB11. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 1222–1231, 2018.

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

BARON, A. M. H.; 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.

BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignBENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 2004. aIP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, 2004.

BROCCA, S.; SECUNDO, F.; OSSOLA, M.; et al. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 12, n. 10, p. 2312, 2003.

CHANDRA, P.; ENESPA; SINGH, R.; ARORA, P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories** 2020 19:1, v. 19, n. 1, p. 1–42, 2020.

- DAVID, L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; et al. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.
- DEPOORTER, E.; BULL, M. J.; PEETERS, C.; et al. *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5215–5229, 2016.
- DIAS, G. S.; LUZ, L. F. DE L.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Scale-up of biodiesel synthesis in a closed-loop packed-bed bioreactor system using the fermented solid produced by *Burkholderia lata* LTEB11. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, p. 341–349, 2017.
- DUGI, K. A.; DICHEK, H. L.; SANTAMARINA-FOJO, S. Human Hepatic and Lipoprotein Lipase: The Loop Covering the Catalytic Site Mediates Lipase Substrate Specificity (*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 43, p. 25396–25401, 1995.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 2004.
- 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.
- GALEANO, J. D.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production by solvent-free ethanolysis of palm oil catalyzed by fermented solids containing lipases of *Burkholderia contaminans*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 127, p. 77–86, 2017.
- GLOGAUER, A.; MARTINI, V. P.; 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.
- 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.
- HITCH, T. C. A.; CLAVEL, T. A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes. **PeerJ**, v. 7, p. e7249, 2019.
- HOBSON, A. H.; BUCKLEY, C. M.; AAMAND, J. L.; et al. Activation of a bacterial lipase by its chaperone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 12, p. 5682–5686, 1993.

- HOLLINGSWORTH, S. A.; KARPLUS, P. A. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. **Biomolecular Concepts**, v. 1, n. 3–4, p. 271–283, 2010.
- KANE, J. F.; HARTLEY, D. L. Properties of recombinant protein-containing inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Bioprocess technology**, v. 12, p. 121–45, 1991.
- KHAN, F. I.; LAN, D.; DURRANI, R.; et al. The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 0, n. MAR, p. 16, 2017.
- EL KHATTABI, M.; OCKHUIJSEN, C.; BITTER, W.; JAEGER, K. E.; TOMMASSEN, J. Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. **Molecular and General Genetics**, v. 261, n. 4–5, p. 770–776, 1999.
- KOVACIC, F.; BABIC, N.; KRAUSS, U.; JAEGER, K. Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria. In: F. Rojo (Org.); **Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids**. p.1–35, 2019.
- KRIEGER, N.; DIAS, G. S.; ALNOCH, R. C.; MITCHELL, D. A. Fermented Solids and Their Application in the Production of Organic Compounds of Biotechnological Interest. . p.125–146, 2019.
- KROGH, A.; È RN LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; L SONNHAMMER, E. L. Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes.
- LANGRAND, G.; RONDOT, N.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. **Biotechnology Letters** **1990 12:8**, v. 12, n. 8, p. 581–586, 1990.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993. I.
- LIEBETON, K.; ZACHARIAS, A.; JAEGER, K.-E. Disulfide Bond in *Pseudomonas aeruginosa* Lipase Stabilizes the Structure but Is Not Required for Interaction with Its Foldase. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 183, n. 2, p. 597–603, 2001.
- 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.

LOVELL, T.; HIMO, F.; HAN, W. G.; NOODLEMAN, L. Density functional methods applied to metalloenzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 238–239, p. 211–232, 2003.

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.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 144–156, 2005.

MAKRIDES, S. C. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**, v. 60, n. 3, p. 512–538, 1996.

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, n. 1, p. 35–41, 2014.

MEZZETTI, A.; SCHRAG, J. D.; CHEONG, C. S.; KAZLAUSKAS, R. J. Mirror-Image Packing in Enantiomer Discrimination. **Chemistry & Biology**, v. 12, n. 4, p. 427–437, 2005.

MOURE, V. R.; FABRÍCIO, C.; FRENCH, G.; et al. Enhancing the enantioselectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 towards the resolution of secondary allylic alcohols. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 146–153, 2014.

MUKHERJEE, K. J.; ROWE, D. C. D.; WATKINS, N. A.; SUMMERS, D. K. Studies of Single-Chain Antibody Expression in Quiescent *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 3005, 2004.

NARDINI, M.; LANG, D. A.; LIEBETON, K.; JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W. Crystal Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Lipase in the Open Conformation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 31219–31225, 2000.

NISHIHARA, K.; KANEMORI, M.; KITAGAWA, M.; YANAGI, H.; YURA, T. Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1694, 1998.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 1, p. 205–217, 2000.

PAPALEO, E.; INVERNIZZI, G. Conformational plasticity of the calcium-binding pocket in the *Burkholderia glumae* lipase: Remodeling induced by mutation of calcium coordinating residues. **Biopolymers**, v. 95, n. 2, p. 117–126, 2011.

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.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

QUYEN, D. T.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R. D. High-Level Formation of Active *Pseudomonas cepacia* Lipase after Heterologous Expression of the Encoding Gene and Its Modified Chaperone in *Escherichia coli* and Rapid In Vitro Refolding. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 787–794, 1999.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W320–W324, 2014.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, 2014. Frontiers Research Foundation.

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

ROSENAU, F.; TOMMASSEN, J.; JAEGER, K. E. Lipase-specific foldases. **ChemBioChem**, v. 5, n. 2, p. 152–161, 2004.

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.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. the open form . As with all lipases whose Lipases : Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angew.Chem.Int.Ed**, v. 37, p. 1608–1633, 1998.

- SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; et al. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1–4, p. 166–170, 2006.
- SHEN, M.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, v. 15, n. 11, p. 2507–2524, 2006.
- SHIBATA, H.; KATO, H.; ODA, J. Random mutagenesis on the *Pseudomonas lipase* activator protein, LipB: Exploring amino acid residues required for its function. **Protein Engineering**, v. 11, n. 6, p. 467–472, 1998.
- SINGH, H. B.; JOGAIAH, S.; GUPTA, V. K. **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Microbial Genes Biochemistry and Applications.**, 2018.
- 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.
- SONNET, P. E.; GAZZILLO, J. A. Evaluation of lipase selectivity for hydrolysis. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, n. 1, p. 11–15, 1991.
- STUDER, G.; REMPFER, C.; WATERHOUSE, A. M.; et al. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, v. 36, n. 6, p. 1765–1771, 2020.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628–634, 2010.
- TISS, A.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R. Effects of Gum Arabic on Lipase Interfacial Binding and Activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36–43, 2001.
- 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.

VALLEJO, L.P. RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **BioMed Central**, 2004.

VIEGAS, A.; DOLLINGER, P.; VERMA, N.; et al. Structural and dynamic insights revealing how lipase binding domain MD1 of *Pseudomonas aeruginosa* foldase affects lipase activation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3578, 2020.

VILLALOBOS, M. C.; GONÇALVES, A. G.; NOSEDA, M. D.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A novel enzymatic method for the synthesis of methyl 6-O-acetyl- α -d-glucopyranoside using a fermented solid containing lipases produced by *Burkholderia contaminans* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 73, p. 86–93, 2018.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, 2018.

YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3–4, p. 91–96, 2007.

YANG, J.; KOBAYASHI, K.; IWASAKI, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. In Vitro Analysis of Roles of a Disulfide Bridge and a Calcium Binding Site in Activation of *Pseudomonas sp.* Strain KWI-56 Lipase. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 2, p. 295–302, 2000.

ZHANG, J.; TIAN, M.; CHEN, X.; et al. Co-Expression of a Thermally Stable and Methanol-Resistant Lipase and Its Chaperone from *Burkholderia cepacia* G63 in *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 3, p. 717–729, 2021.