



**Caracterização de lipases de mamona  
(*Ricinus communis*) expressas em  
*Pichia pastoris***

**Luca Massaglia**

**Gabriel Mendes Campos**

**Projeto de Final de Curso**

**Orientadores**

**Prof. Rodrigo Volcan Almeida, DSc**

**Gabriela Coelho Brêda, DSc**

**Prof. Ivaldo Itabaiana Jr., DSc**

**Fevereiro de 2023**

# Caracterização de lipases de mamona (*Ricinus communis*) expressas em *Pichia pastoris*

**Luca Massaglia**

**Gabriel Mendes Campos**

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Engenharia de Bioprocessos e Engenharia Química.

Aprovado por:



Elisa d'Avila Costa Cavalcanti, DSc

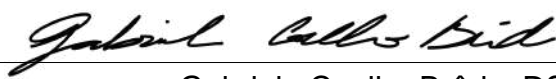


Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca, DSc

Orientado por:



Rodrigo Volcan Almeida, DSc



Gabriela Coelho Brêda, DSc



Ivaldo Itabaiana Junior, DSc

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Fevereiro de 2023

Massaglia, Luca. Campos, Gabriel Mendes.

Caracterização de lipases de mamona (*Ricinus communis*) expressas em *Pichia pastoris*. Luca Massaglia e Gabriel Mendes Campos. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2023.

viii, 36 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2023.

Orientadores: Rodrigo Volcan Almeida, Gabriela Coelho Brêda e Ivaldo Itabaiana Junior.

1. *Ricinus communis*. 2. Expressão recombinante 3. Lipases 4. Monografia. (Graduação – EQ/UFRJ). 5. Rodrigo Volcan Almeida *et al.* I. Título.

*Aos meus pais, que sem seu apoio isso teria sido impossível. - L.M.*  
*À minha família, que nunca deixou de me apoiar, mesmo nos momentos mais difíceis. - G. M.*

*Não somos definidos pela alma com a qual nascemos, mas sim pelo caminho que trilhamos.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, em especial minha mãe, Danielle Mendes, e minha namorada, Mayra Lopes, por sempre me apoiarem durante a faculdade, mesmo nos momentos mais difíceis, nunca me deixando desistir, aos meus amigos por levantarem meu ânimo e me fazerem sorrir, me ajudando a seguir em frente, e a todos do LAMMP por todos os ensinamentos, pela dedicação todos os dias, por nos acolherem, pelo ótimo convívio no período de iniciação científica e por permitirem que esse trabalho pudesse ser feito, gostaria de agradecer em especial à Gabi, que desde o primeiro dia nos acolheu como ICs e nos ensinou, e ao Volcan, que nos deu a possibilidade de entrar no LAMMP e que acreditou em nosso potencial.

Gabriel

Começo por agradecer ao LAMMP pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, ao longo de diversos anos com uma equipe extremamente dedicada e acolhedora, pela qual tenho uma grande admiração. Esse ano vão fazer 5 anos desde que eu, Gabriel, Felipe e Matheus fomos nos voluntariar para uma iniciação científica e pudemos crescer como estudantes e seres humanos e vou levar esse período comigo o resto da minha vida. Em especial mando um grande abraço a Gabi, que nos acompanhou de perto por muito tempo e que pude presenciar a conquista de doutoranda e professora pela UFRJ, e ao Volcan, que nos deu a possibilidade de viver essa experiência e acreditar no nosso potencial. Agradeço também todos os docentes que fizeram parte da minha jornada, os quais tenho grande respeito e admiração, que passaram pelas mais diversas dificuldades e que, especialmente durante esses últimos 4 anos, continuam a defender o ensino superior gratuito e de qualidade. Um grande abraço aos meus queridos amigos, que sem eles não sei se teria mantido a sanidade. Acima de tudo, agradeço o apoio e paciência da minha família, que acreditou em mim e possibilitou que eu trilhasse o meu próprio caminho.

Luca

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenharia de Bioprocessos e Engenharia Química.

## **Caracterização de lipases de mamona (*Ricinus communis*) expressas em *Pichia pastoris***

Luca Massaglia

Gabriel Mendes Campos

Fevereiro, 2023

Orientadores: Prof. Rodrigo Volcan Almeida, DSc.

Gabriela Coelho Brêda, DSc.

Ivaldo Itabaiana Junior, DSc.

Previamente, o nosso grupo de pesquisa clonou em *Pichia pastoris* duas lipases presentes na membrana de corpúsculos lipídicos da semente de *Ricinus communis*, denominadas RcOBL1 e RcATGL, gerando uma biblioteca de 20 recombinantes com 10 para cada lipase. Nesse contexto, o presente trabalho se inseriu na produção e caracterização dos extratos brutos dos sobrenadantes dos cultivos dos recombinantes contendo as lipases de interesse. A partir da biblioteca gerada, duas cepas foram selecionadas, uma para cada lipase, em que os meios de cultura, devido a expressão extracelular, apresentaram maior atividade hidrolítica no éster 4-metilumbeliferil heptanoato (MUF-7), alcançando valores de atividade de 148,0 U/L e 132,8 U/L para RcOBL1 e RcATGL, respectivamente, em cultivo em frascos agitados. Dois métodos de concentração do meio de cultura, liofilização e *salting out*, foram viáveis para as amostras contendo as lipases estudadas, acarretando um aumento de atividade entre 111 e 198,5%. Através da caracterização, foi determinado que ambas as lipases apresentaram melhor atividade em temperaturas acima de 50 °C e pH em torno de 5, além de uma preferência por substratos de cadeia média e uma boa estabilidade ao congelamento. O extrato bruto concentrado, no entanto, não foi capaz de hidrolisar tributirina e óleos vegetais, o que pode ser explicado pela baixa produção das lipases de interesse, conforme observado em eletroforese em gel de poliacrilamida.

# ÍNDICE

<b>Capítulo I – Introdução e Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>1</b>
1.1. Introdução .....	1
1.2. Revisão Bibliográfica.....	1
1.2.1. Lipases e seus usos comerciais.....	1
1.2.2. As lipases de <i>Ricinus communis</i> .....	4
1.2.3. Produção de enzimas recombinantes através da levedura <i>Pichia pastoris</i> .....	8
<b>Capítulo 2 – Objetivo</b> .....	<b>10</b>
2.1. Objetivos específicos .....	10
<b>Capítulo III - Materiais e métodos</b> .....	<b>10</b>
3.1. Meios de cultivo .....	10
3.2. Alinhamento das sequências RcOBL1 e RcATGL e busca por homologia.....	11
3.3. Cultivo em placas.....	12
3.4. Cultivos em frascos agitados .....	13
3.5. Atividade em 4-metilumbeliferil heptanoato .....	13
3.6. Atividade em triglicerídeos .....	14
3.7. <i>Salting out</i> .....	14
3.8. Liofilização .....	15
3.9. Determinação da concentração de proteínas totais .....	15
3.10. SDS-PAGE .....	16
3.11. Caracterização dos extratos brutos.....	16
<b>Capítulo IV - Resultados e discussão</b> .....	<b>17</b>
4.1. Alinhamento e busca por moldes para modelagem .....	17
4.2. Seleção dos recombinantes.....	20
4.2.1. Cultivo em placas.....	20
4.2.2. Cultivo em frascos agitados .....	22
4.3. Cultivo das cepas selecionadas.....	23
4.4. Caracterização dos extratos brutos.....	25
4.5. Ensaio em novos substratos .....	29
4.6. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida .....	31
<b>Capítulo V – Conclusões</b> .....	<b>32</b>
<b>Capítulo VI - Perspectivas</b> .....	<b>33</b>



**Referências Bibliográficas ..... 33**

# Capítulo I – Introdução e Revisão Bibliográfica

## 1.1. Introdução

As triacilglicerol hidrolases, também conhecidas como lipases, são uma classe de enzimas de crescente importância na indústria, tanto como parte de processos de produção quanto como parte da formulação de diversos produtos. A maioria das lipases utilizadas são de origem microbiológica e há pouca literatura disponível sobre as de origem vegetal. De particular interesse estão as lipases oriundas das sementes de mamona (*Ricinus communis*), que possuem altíssimo potencial hidrolítico na sua forma de extrato proteico bruto. No entanto, a produção deste extrato apresenta problemáticas como o uso de solventes como acetona e a presença da ricina, uma substância de alta toxicidade.

Na literatura, um estudo de proteômica de sementes de mamona identificou diversas lipases que tiveram sua expressão aumentada durante a fase de germinação como a lipase ácida de mamona (RcATGL) e a lipase do corpúsculo lipídico (RcOBL1), sendo esta última previamente clonada em *Escherichia coli*. O estudo destas lipases se mostra de grande importância para literatura uma vez que a estrutura dessas lipases e suas homólogas não estão até o momento elucidadas. Nesse contexto, o presente trabalho se inseriu na produção e caracterização das lipases RcOBL1 e RcATGL de forma heteróloga utilizando a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* como plataforma de expressão.

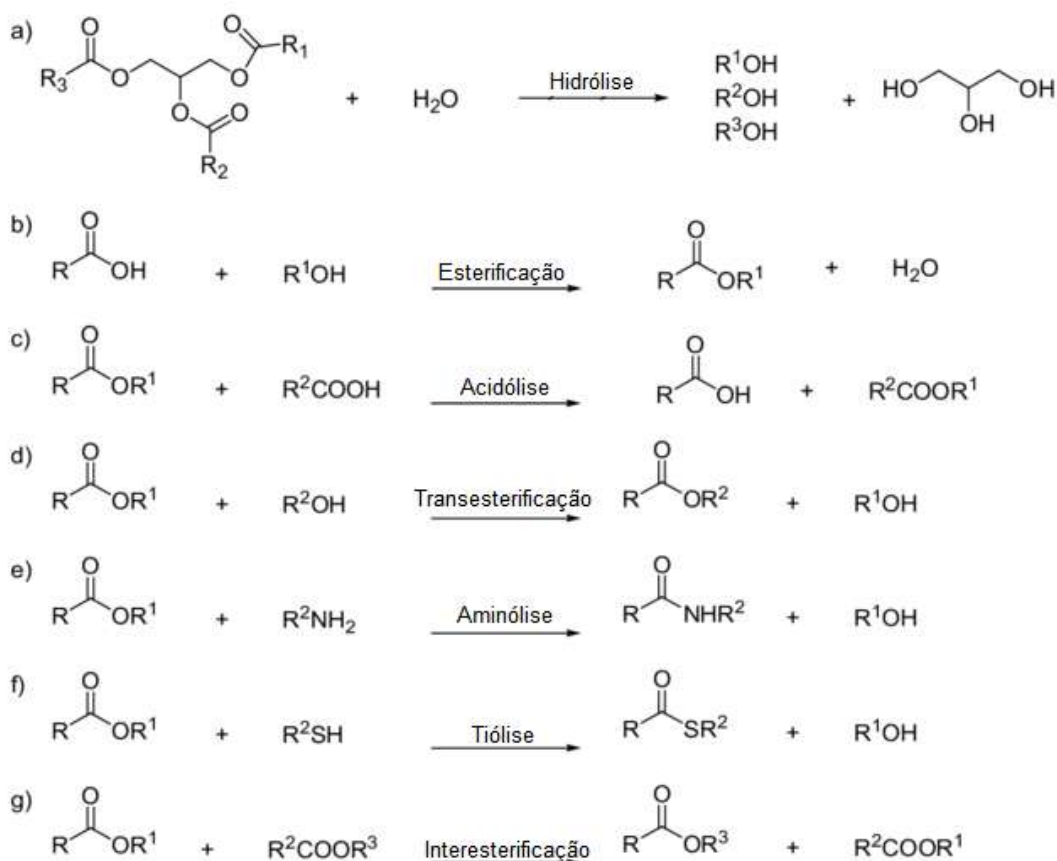
## 1.2. Revisão Bibliográfica

### 1.2.1. Lipases e seus usos comerciais

Lipases são uma classe de enzimas (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) que, na presença de água, catalisam a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa, formando glicerol e ácidos graxos. Pela natureza apolar do substrato, essas enzimas desempenham sua função na interface entre as fases líquidas, mas de

maneira geral elas são estáveis também em meios não aquosos, onde podem então catalisar as reações de esterificação, transesterificação e interesterificação [1], assim como diversas outras reações relacionadas, representadas na figura 1.

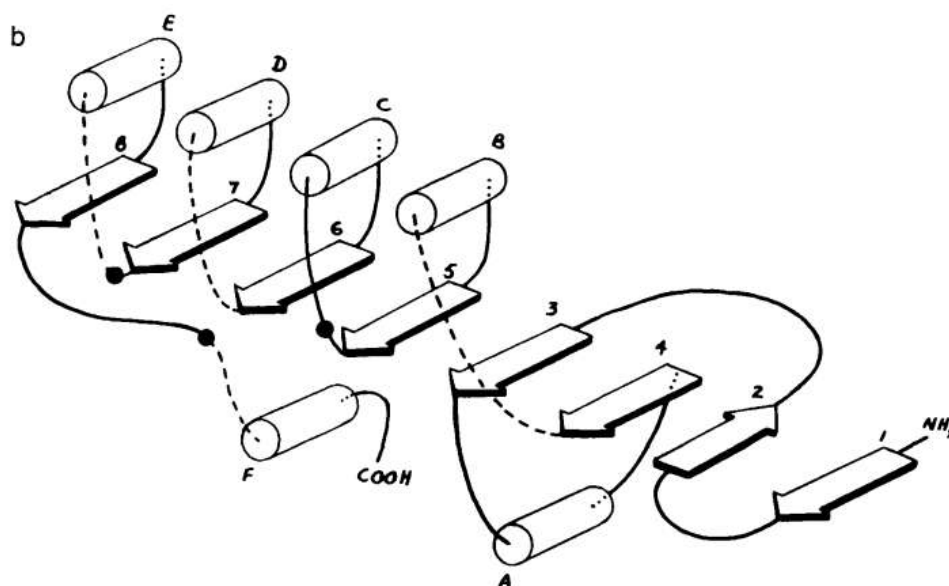
Figura 1. Diferentes tipos de reações típicas realizadas por lipases que atuam sobre ligações éster, podendo tanto ser de triglicerídeos ou não.



Fonte: modificado de Ramos-Sanchez *et al.* [2].

Estruturalmente, lipases fazem parte da família das  $\alpha/\beta$  hidrolases, que possuem como base seis alfa hélices conectadas a oito folhas beta, contendo nos espaços entre essas estruturas secundárias a tríade catalítica, composta por aspartato, histidina e serina, também muito bem conservada [3], com estrutura ilustrada na figura 2. Adicionalmente, algumas lipases possuem uma região de tampa, que cobre o sítio ativo da enzima em solução aquosa se abre na interface entre fases, contribuindo para a ligação com o substrato e foi observado ser importante para a atividade e especificidade dessas lipases [4].

Figura 2. Diagrama simplificado da estrutura de  $\alpha/\beta$  hidrolase. Os cilindros representam as  $\alpha$ -hélices (A, B, C, D, E e F) e as setas representam as folhas- $\beta$  (1 – 8) e os aminoácidos da tríade catalítica estão representados como círculos pretos.



Fonte: Ollis *et al.* [5].

De maneira geral, o que torna certas lipases de interesse comercial são alta estabilidade em temperaturas elevadas e em diversos meios, alta especificidade por substrato, forte enantiosseletividade e não necessidade de cofatores [6]. Além disso, essas enzimas são conhecidas por possuírem uma grande variedade de atividades além das tradicionais, catalisando reações que não se esperariam da classe das triacilglicerol hidrolases [7].

Devido a essas diversas características vantajosas, grande versatilidade e uma crescente preocupação em reduzir impactos ambientais, lipases vêm sendo aplicadas com sucesso em diversos setores industriais. Gorduras e óleos são um componente importante na indústria alimentícia e lipases são utilizadas em seu processamento para melhorar a digestibilidade ou alterar a textura, aroma e sabor de certos alimentos, especialmente derivados de leite como queijos, manteiga e chocolates [8]. Lipases são utilizadas na formulação de detergentes para remoção de manchas de gorduras em tecidos e louças, possibilitando o uso de temperaturas menores durante a lavagem e com menor agressividade química, diminuindo o desgaste e gerando resíduos mais biodegradáveis [9]. Outra aplicação de grande interesse é na indústria farmacêutica pela capacidade de produzir compostos opticamente puros, já que

moléculas quirais podem ter atividade biológica diferentes para cada enantiômero. Comumente as lipases são utilizadas em conjunto com síntese química, obtendo intermediários quirais necessários para a produção de diversas drogas [10]. Uma potencial aplicação de lipases é o seu uso na produção de biodiesel, especialmente com óleos considerados de baixa qualidade, ou seja, com alto teor de ácidos graxos livres, que impedem a utilização do catalisador alcalino e geram menos resíduos que o método ácido. As lipases podem produzir os ésteres que compõem o biodiesel tanto com os ácidos graxos livres, por esterificação, quanto com os triglicerídeos, por transesterificação [11]. Atualmente, a utilização do método enzimático na produção de biodiesel ainda possui um rendimento abaixo do que seria competitivo com os catalisadores convencionais, mas já podem ser considerados os outros fatores vantajosos de sua utilização.

Existem diversas fontes possíveis de lipases, como animais e plantas, mas as de origem microbiológica são as mais utilizadas e bem caracterizadas, devido a uma maior facilidade de manipulação genética e altos rendimentos de produção [12]. A lipase mais estudada e aplicada industrialmente é a lipase B (usualmente chamada de CalB) da levedura *Candida antarctica* (atualmente *Moesziomyces antarcticus*) devido a sua boa estabilidade térmica, em uma grande faixa de pH e diversos solventes, alta regio- e enantioseletividade e especificidade para uma grande gama de substratos [13,14]. Por causa dessas características, a CalB se tornou uma lipase modelo e muito utilizada para comparação com novas lipases.

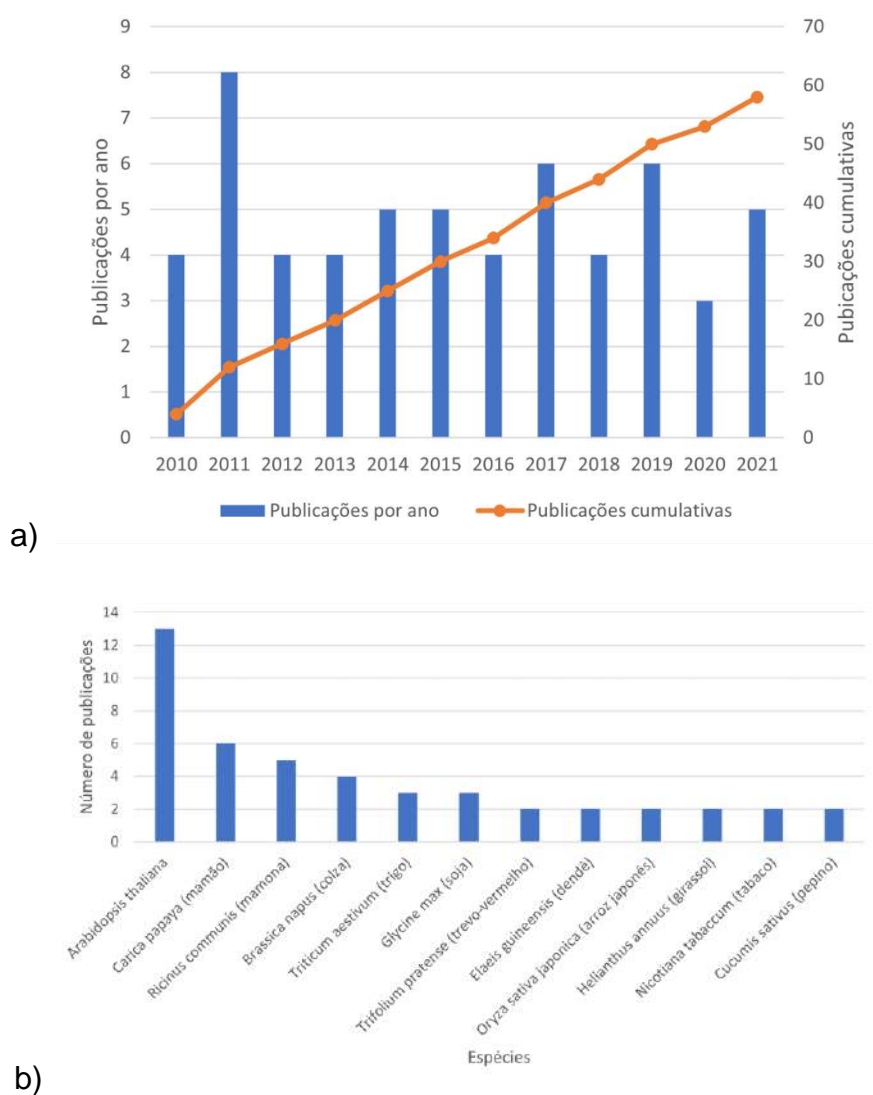
### 1.2.2. As lipases de *Ricinus communis*

Diversas plantas foram reportadas com alta atividade lipásica apresentando diversas vantagens como alta disponibilidade, especialmente em sementes oleaginosas, baixo custo de produção, tolerância a solventes orgânicos e aplicabilidade sem muitos passos para obtenção de um extrato bruto [15]. No entanto, somente em torno de 11% das lipases isoladas na literatura são de origem vegetal devido à grande dificuldade de caracterização, considerando

os processos laboriosos de purificação desse extrato bruto e perda de atividade no processo [16] e por isso poucas dessas lipases foram caracterizadas e não há ainda nenhuma estrutura resolvida de uma lipase de planta [17]. Por esses motivos, é de grande interesse o estudo de lipases vegetais como alternativas.

Foi feita uma pesquisa na literatura para encontrar estudos acerca de lipases vegetais no banco de dados Web of Science, acessada através do Periódicos CAPES, com o objetivo de observar o volume de artigos sobre o assunto e quais são as espécies de origem mais comuns. Devido ao baixo número de publicações, os termos de pesquisa utilizados foram bem gerais: “plant lipase\*” OR “plant phospholipase\*” em *topic*, que faz a busca dos termos no título, resumo e palavras-chave, e restringindo os resultados entre 2010 e 2021. Foi obtido um total de 61 artigos, distribuídos por ano segundo a figura 3a. Como é possível observar, mesmo utilizando termos bem gerais foram encontradas poucas publicações sobre lipases vegetais. A figura 3b ilustra as espécies de origem das lipases mais estudadas, sendo que a *Arabidopsis thaliana* aparece com mais frequência, devido ao seu status como organismo vegetal modelo, seguida pela *Carica papaya* e *Ricinus communis*.

Figura 3. Resultados das buscas bibliográficas sobre lipases vegetais, em termos de número de publicações por ano e cumulativamente (a) e em termos de espécies de origem abordadas pelos artigos, excluindo espécies mencionadas apenas uma vez (b).



Nesse contexto, vemos que a *Ricinus communis*, de nome usual mamona, pode ser uma importante fonte de lipases vegetais. A mamona é uma oleaginosa originária da Ásia que se adaptou bem ao clima brasileiro e se encontra difundida em grande parte do território. Suas sementes acumulam uma grande quantidade de óleo, indicando que há uma alta expressão de lipases. Foi observado que o seu extrato enzimático apresenta uma alta atividade hidrolítica em uma variedade de óleos vegetais [18,19], com atividades maiores que lipases comerciais, mesmo utilizando sementes dormentes como fonte de matéria prima, característica incomum para sementes oleaginosas [20]. No entanto, a extração das enzimas da semente possui uma limitação importante, que é a presença da

ricina, uma das toxinas mais potentes na natureza. A extração com acetona depende de agitação vigorosa com posterior peneiramento do pó gerado, portanto há o risco de volatilização, um problema bastante expressivo ao considerar o escalonamento do processo para a indústria devido ao grande volume processado.

Por causa desse risco, uma alternativa para estudar isoladamente e produzir estas lipases de mamona é a expressão heteróloga, contornando o problema da ricina e evitando passos de extração com solventes orgânicos, além de facilitar a caracterização. No entanto, há pouca literatura sobre expressão heteróloga de lipases vegetais e foram encontrados apenas dois artigos descrevendo a clonagem de lipases presentes na semente de mamona. Sabendo da atividade lipásica ácida do endosperma da semente, um dos trabalhos realizou uma análise proteômica de corpúsculos lipídicos purificados e identificou uma lipase presente em sua membrana, com massa molecular em torno de 60 kDa. Seu gene foi denominado de *Oil Body Lipase 1* (OBL1, referente a corpúsculo lipídico em inglês) e clonado em *Escherichia coli*. Extratos celulares dos recombinantes apresentaram atividades hidrolíticas em trioleína pelo menos 10 vezes maiores que os controles, além de apresentar atividade em uma variedade de triglicerídeos sintéticos, especialmente os de cadeia curta a média, e ésteres de *p*-nitrofenol com pH ótimo entre 4 e 4.5 [21].

O segundo trabalho identificou uma lipase com massa molecular em torno de 38 kDa, denominada RcLipase, presente após 4 dias de germinação, que foi clonada em *Pichia pastoris* X-33 com o vetor pPICZ $\alpha$  para expressão extracelular. Foi verificado através de SDS-PAGE que foram alcançados altos níveis de expressão e a lipase purificada apresentou atividade em diversos triglicerídeos sintéticos e ésteres de *p*-nitrofenol, em especial os de cadeia média a longa, e pH ótimo em torno de 8 [22].

Outro estudo que chamou a atenção, publicado por um dos nossos colaboradores, realizou uma extensa análise do proteoma da semente de mamona, comparando os níveis de expressão durante os estágios de desenvolvimento. Entre as lipases identificadas, uma delas, denominada RcATGL, apresentou um nível de expressão 14 vezes maior no estágio final de maturação da semente [23]. Isso indica que provavelmente ela possui grande



importância para o metabolismo dos lipídeos de reserva para a germinação e possivelmente possui alta atividade hidrolítica.

### 1.2.3. Produção de enzimas recombinantes através da levedura *Pichia pastoris*

Certas enzimas são provenientes de organismos não adequados para aplicações industriais, tanto por não atingirem parâmetros importantes no aumento de escala, como crescimento rápido e altas concentrações de proteínas, quanto por dificuldade de extração e purificação. Para contornar esses problemas, a produção pode ser feita através de expressão heteróloga, um conjunto de técnicas que consistem em etapas de clonagem do gene de interesse em um vetor com marcador de seleção, transformação da cepa hospedeira com o plasmídeo e expressão do gene, regulado por um promotor constitutivo ou indutivo [10]. O primeiro trabalho sobre expressão heteróloga foi realizado por Herbert Boyer e Stanley Cohen em 1973, inserindo genes de *Xenopus laevis* em *Escherichia coli* e demonstrando que tais genes eram expressos ativamente a cada geração seguinte da cepa. A expressão heteróloga propiciou a produção de medicamentos importantes, como a insulina humana, também por expressão em *E. coli* [24].

O aumento da demanda de proteínas heterólogas pelo mercado resultou em uma maior diversidade das mesmas e à necessidade de novas plataformas de expressão, uma vez que proteínas de eucariotos não são bem expressas em bactérias, devido à falta de modificações pós-traducionais mais complexas, como glicosilação, resultando em corpos de inclusão e proteínas inativas. Logo, recorreu-se ao uso de organismos mais complexos, como as leveduras [25].

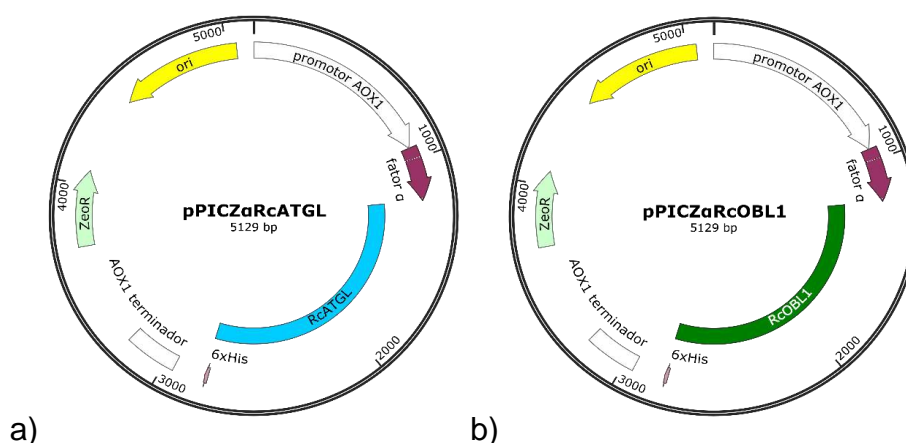
Dentre as plataformas de expressão utilizadas, uma das mais importantes é a *Pichia pastoris*, uma levedura inicialmente usada pela Phillips Petroleum Company, na década de 70, para produção de biomassa como aditivo proteico a partir de metanol e que, a partir da década de 80, começaram estudos sobre

sua via metabólica, até que em 1994 os direitos de venda foram cedidos para a Invitrogen, facilitando o acesso ao sistema de expressão da levedura [26].

A *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica amplamente utilizada para a expressão de lipases heterólogas, e o seu uso se deve a vantagens como a capacidade de atingir altas concentrações celulares em substratos de baixo custo, altos níveis de expressão reportados para diversas proteínas heterólogas, além de ser capaz de realizar modificações pós-traducionais mais complexas, diferente de procariotos [27]. *P. pastoris* apresenta um dos promotores mais eficientes e rigidamente regulados, o promotor pAOX, derivado da enzima álcool oxidase 1 (AOX1), sendo fortemente induzido por metanol e reprimido por outras fontes de carbono, como glicerol [28].

Dessa forma, os genes das duas lipases de *Ricinus communis*, RcOBL1 e RcATGL, foram clonados previamente pelo nosso grupo de pesquisa em *Pichia pastoris* com o vetor pPICZ $\alpha$  através das construções plasmidiais representadas pelos mapas da figura 4. O vetor utilizado torna a expressão das lipases extracelular, devido ao sinal de secreção do fator  $\alpha$ , induzida por metanol (devido a presença do promotor AOX1) e com a marca de resistência ao antibiótico Zeocina. As transformações com estas construções geraram uma biblioteca de 20 cepas, sendo 10 clones transformados com o gene para a lipase RcATGL e 10 clones transformados com o gene para a lipase RcOBL1.

Figura 4. Mapas plasmidiais utilizados para a transformação em X33, com o gene clonado de RcATGL (a) e RcOBL1 (b). Ambos os plasmídeos possuem o promotor e terminador AOX1, o fator  $\alpha$  de secreção, a marca de seleção de zeocina (ZeoR), origem de replicação (ori) para propagação em *Escherichia coli* e uma adição de cauda de histidina (6xHis) no C-terminal.



## Capítulo 2 – Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo expressar e caracterizar os extratos brutos contendo lipases de *Ricinus communis*, RcOBL1 e RcATGL, na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*.

### 2.1. Objetivos específicos

- Alinhamento das sequências da RcATGL e RcOBL1 para identificação das diferenças entre as duas enzimas, assim como uma busca por sequências homólogas.
- Selecionar, dentro da biblioteca de 20 clones gerada pelo grupo de pesquisa, os melhores de cada cepa, os quais foram utilizados para expressão das lipases em frascos agitados.
- Determinar o pH e temperatura ótimos dos extratos brutos contendo as lipases, bem como a medição da atividade em diferentes substratos.
- Realizar a concentração dos extratos brutos por *salting out* e liofilização.
- Analisar a expressão das lipases através de eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos brutos após concentração.

## Capítulo III - Materiais e métodos

### 3.1. Meios de cultivo

Os meios de cultivo utilizados foram os indicados no manual do *Pichia* Expression Kit da Invitrogen [29].

#### YPD (Yeast Peptone Dextrose)

- Extrato de levedura 10 g/L (Kasvi)
- Peptona 20 g/L (Kasvi)
- Dextrose 20 g/L

## BMGY (Buffered Glycerol Complex Medium)

- Extrato de levedura 10 g/L (Kasvi)
- Peptona 20 g/L (Kasvi)
- YNB 13,4 g/L (Difco)
- Glicerol 10 g/L (Vetec)
- Biotina 0,4 mg/L (Sigma)
- Tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6

## BMMY (Buffered Methanol Complex Medium)

- Extrato de levedura 10 g/L (Kasvi)
- Peptona 20 g/L (Kasvi)
- YNB 13,4 g/L (Difco)
- Metanol 2% (v/v) (Vetec)
- Biotina 0,4 mg/L (Sigma)
- Tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6

### 3.2. Alinhamento das sequências RcOBL1 e RcATGL e busca por homologia

As sequências de aminoácidos das lipases RcATGL e RcOBL1 foram alinhadas através do *software* Clustal Omega, para identificação das diferenças de estrutura primária apresentadas entre essas duas lipases. Para realizar a busca por sequências homólogas, foi utilizada a ferramenta *protein* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) hospedada no NCBI (National Center for Biotechnology Information) contra o banco de dados PDB (Protein Data Bank), com a restrição de busca por sequências com estrutura resolvida.

### 3.3. Cultivo em placas

Foram realizados pré-inóculos de dez cepas transformadas com o gene da lipase RcOBL1 (denominadas de RcO1 a RcO10) e dez cepas transformadas com o gene da lipase RcATGL (denominadas de RcA1 a RcA10), em 5 mL de YPD com adição de Zeocina® em concentração de 100 µg/mL em tubos Falcon de 50 mL a 30 °C e 250 rpm em *shaker*, até que a densidade ótica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) alcançasse valores entre 2 e 5. Adicionalmente, foram feitos outros pré-inóculos da cepa de referência X-33 como controle. Baseando-se na DO<sub>600</sub> para padronizar a concentração de células em uma absorvância de 0,1, foram transferidas alíquotas de cada tubo do pré-inóculo para 1,5 mL de BMGY em placa de 24 poços de 3 mL, cultivando a 30 °C e 300 rpm em *shaker* por 24 horas. Para realizar a troca de meio, a placa foi centrifugada a 1500 g e 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspendidas em 1,5 mL de BMMY e cultivadas a 20 °C e 300 rpm em *shaker* por 48 horas. Para finalizar o cultivo, a placa foi centrifugada a 3000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. Foi realizado um ensaio de cinética de fluorescência dos sobrenadantes com 4-metilumbeliferil heptanoato (MUF-7) como substrato em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 a 40 °C em placas de 96 poços. A medida que o éster é hidrolisado é liberado o 4-metilumbeliferona (MUF), que é uma molécula fluorófora com comprimento de onda de 323 nm de absorção e 448 nm de emissão. É medido em um fluorímetro de placas o aumento da emissão ao longo do tempo e os coeficientes angulares das curvas observadas foram comparados entre si para seleção dos clones que apresentaram maior taxa de fluorescência. Baseando-se nos resultados, foram selecionadas as cepas que obtiveram sobrenadantes com maiores fluorescência nas condições de expressão realizada.

### 3.4. Cultivos em frascos agitados

Foram realizados os pré-inóculos das cepas selecionadas em 5 mL de YPD com adição de Zeocina<sup>®</sup> em concentração de 100 µg/mL em tubos Falcon de 50 mL a 30 °C e 250 rpm em *shaker*, até a DO<sub>600</sub> alcançar valores entre 2 e 5. Foram feitos também os controles com a cepa de referência X33. Alíquotas dos pré-inóculos foram transferidas para 25 mL de meio BMGY em frascos Erlenmeyer de 250 mL com uma DO<sub>600</sub> padronizada de 0,1, prosseguindo o cultivo a 30 °C e 250 rpm em *shaker* por 24 horas. Para realizar a troca de meio, o conteúdo dos frascos foi vertido em tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 2000 g e 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 25 mL de meio BMMY também em frascos Erlenmeyer de 250 mL e cultivadas a 20 °C e 250 rpm em *shaker* por 120 horas, adicionando pulsos de metanol para manter sua concentração em torno de 2 % (v/v) a cada 24 horas. Foram coletadas alíquotas nas 96, 120 e 144 horas de cultivo para os frascos de 250 mL. Para finalizar, o conteúdo dos frascos foi vertido em tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 13.600 g por 2 minutos, conservando os sobrenadantes.

### 3.5. Atividade em 4-metilumbeliferil heptanoato

A atividade em 4-metilumbeliferil heptanoato (MUF-7) foi determinada segundo a metodologia de Prim *et al.* [30] com modificações. Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 3 mL de tampão e esperou-se alcançar 40 °C. O tampão citrato de sódio 50 mM pH 5 foi utilizado nas reações padrão, e o tampão universal Britton-Robinson (ácido fosfórico 40 mM, ácido acético 40 mM e ácido bórico 40 mM ajustados com hidróxido de sódio 1 M) foi utilizado nas reações do planejamento estatístico de experimentos. Em seguida, foram adicionados 12 µL de uma solução de MUF-7 25 mM em etilenoglicol monometil éter na cubeta e foi iniciada a medição de fluorescência em um fluorímetro, com excitação no comprimento de onda de 323 nm e emissão em 448 nm, por 30 segundos para

obter o branco. Passado esse tempo, foram adicionados 50 ou 100  $\mu\text{L}$  de amostra, dependendo da concentração e volume de estoque, continuando a medição por mais 1 minuto. Foram analisadas as inclinações das curvas de fluorescência e comparadas com uma curva analítica, montada utilizando concentrações conhecidas de 4-metilumbeliferona (MUF), realizando a análise em triplicata. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de MUF por minuto nas condições descritas.

### 3.6. Atividade em triglicerídeos

A atividade em triglicerídeos foi determinada segundo a metodologia utilizada por Freire *et al.* [31] Um volume de 1 mL da amostra contendo lipase foi incubado com os substratos tributirina e óleos vegetais (óleo de soja e óleo de oliva) na concentração final de 1,5 % (v/v), utilizando goma arábica 5 % (p/v) como emulsificante em tampão citrato de sódio pH 5,0 a 40°C e utilizando um rotor de agitação a solução foi agitada a 200 rpm até ser observada a emulsificação. O ensaio foi conduzido em triplicata e as reações em branco, ou seja, sem adição de amostra, também foram incubadas. Após 30 minutos de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de acetona:etanol (1:1) e então submetidas à titulação com NaOH 0,08 M até atingir o pH final de 11. As amostras foram também adicionadas às reações em branco imediatamente antes da titulação. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos equivalentes por minuto nas condições descritas. Estes ensaios em óleos vegetais foram realizados em parceria com o Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABiM).

### 3.7. *Salting out*

O *salting out* foi realizado adicionando sulfato de amônio ao extrato enzimático bruto até ser verificada a saturação da solução, aproximadamente

uma proporção de 1:2 de massa de sal por volume de sobrenadante. A suspensão das proteínas foi centrifugada e o *pellet* foi ressuspendido em um volume de tampão 20 vezes menor que o inicial.

### 3.8. Liofilização

A liofilização foi realizada congelando o sobrenadante nas paredes de frascos de plástico com nitrogênio líquido, atentando para fazer uma camada congelada mais fina possível, de modo que a água não fique retida. Os frascos foram posicionados em um liofilizador, mantendo temperatura e pressão baixas por diversas horas até a liofilização completa. Os sólidos remanescentes foram coletados e ressuspendidos em um volume de tampão 20 vezes menor que o inicial. As amostras liofilizadas foram posteriormente dialisadas para redução da concentração de sais.

### 3.9. Determinação da concentração de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada segundo a metodologia desenvolvida por Bradford [32]. Em uma placa de 96 poços, foram pipetados 10  $\mu\text{L}$  das amostras em triplicata, assim como alíquotas em concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA) para montar a curva analítica. Em seguida, foram pipetados 190  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye) nos poços e esperaram-se 2 minutos. Passado esse tempo, a placa foi inserida em um espectrofotômetro de placas onde foram medidas as absorvâncias a 595 nm, que foram comparadas com a curva analítica de BSA.



### 3.10. SDS-PAGE

Foi realizada primeiro a dosagem de proteínas para padronizar a concentração das alíquotas utilizadas na eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 12% (p/v) a 30 mA, injetando um volume calculado conforme a concentração de amostra por poço. O gel foi corado com prata seguindo a metodologia descrita no kit (Protein Silver Staining kit, GE Healthcare) e as bandas resultantes foram registradas em um foto documentador DNR Minibis-Pro (BioAmerica®). Foi feita a comparação destas a um padrão de massas moleculares (Bench Mark 10747012, Invitrogen), aplicado no gel no mesmo momento das amostras.

### 3.11. Caracterização dos extratos brutos

A determinação da temperatura e do pH ótimos para os extratos foi realizada utilizando o planejamento experimental de Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) com três repetições do ponto central. A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica 7.0 (StaSoft, EUA). A temperatura e o pH foram as variáveis independentes, com a atividade enzimática, em U/L, como a variável resposta obtida. Na tabela 1 estão representadas as variáveis abordadas, assim como os valores codificados utilizados.

Tabela 1. Valores codificados para as variáveis independentes (temperatura e pH) e seus valores reais.

Variáveis	Valores codificados				
	-1.42	-1	0	1	1.42
Temperatura (°C)	25	29.4	40	50.6	55
pH	4.8	5.5	7	8.5	9.2

A estabilidade ao congelamento das enzimas foi averiguada ao congelar as amostras em tubos utilizados na coleta dos extratos após a centrifugação do sobrenadante no mesmo dia em que são obtidas e deixá-las por 5 dias em congelamento a aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após este período foi verificada a atividade enzimática, permitindo a comparação com aquela do momento de obtenção dos extratos.

Para a caracterização da preferência de substrato em relação ao tamanho de cadeia de carbono, foram utilizados outros 2 ésteres de 4-metilumbeliferona, com tamanhos de cadeias distintos: 4-metilumbeliferil acetato (C2) e butirato (C4). Estes também obtidos da Sigma-Aldrich® e solubilizados na concentração de 25 mM. Os ensaios de atividade hidrolítica foram realizados como descrito para o MUF-7.

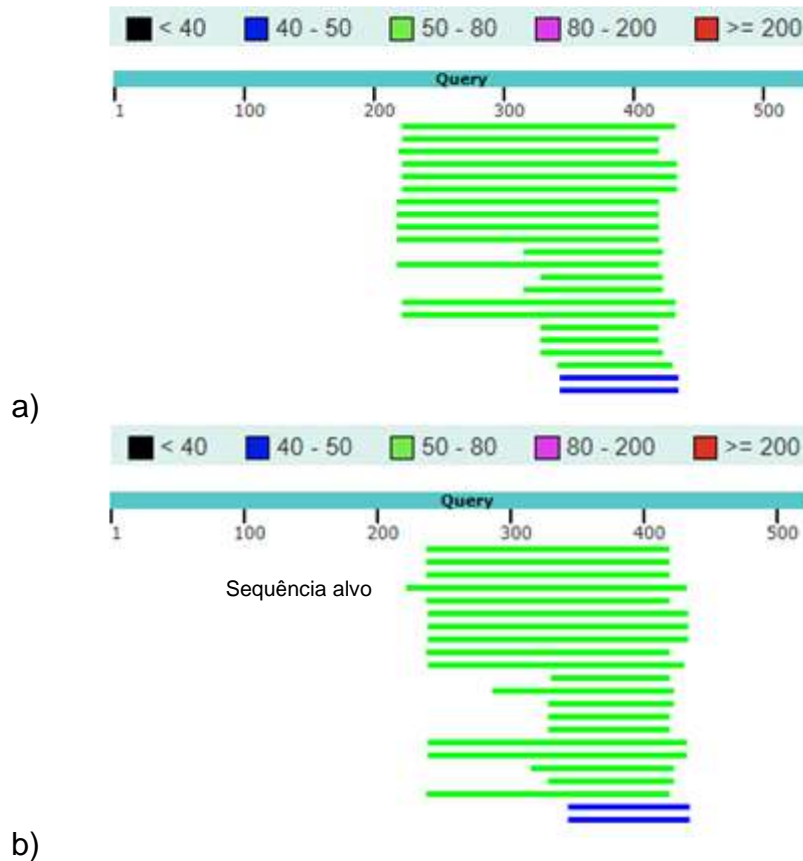
## Capítulo IV - Resultados e discussão

### 4.1. Alinhamento e busca por moldes para modelagem

Através do alinhamento realizado com o Clustal Omega, foi gerado o mapa de alinhamento representado na figura 5 e é possível observar que as sequências das lipases escolhidas são bastante similares, com identidade de sequência de 87%, indicando que provavelmente a RcOBL1 e a RcATGL possuem características e propriedades parecidas.



Figura 6. Representação visual dos resultados de alinhamento pelo BLAST para RcATGL (a) e RcOBL1 (b) contra o PDB. A legenda no topo indica os valores de pontuação do alinhamento (score). Cada linha horizontal representa uma sequência diferente. Os números de 1 a 500 indicam os resíduos de aminoácidos das sequências das lipases.



Vale ressaltar que na busca usando o banco de dados do PDB não seriam encontradas lipases de planta, já que até o momento não há ainda alguma estrutura resolvida. No entanto, estão presentes sequências de outros tipos de enzimas vegetais e lipases provenientes de organismos de outras taxonomias que teriam potencial para serem utilizadas como molde nas modelagens estruturais *in silico*, como reportado anteriormente na literatura para a modelagem de algumas lipases vegetais [17].

Na figura 6 é possível observar que os melhores hits das buscas realizadas para as sequências da RcOBL1 e RcATGL apresentaram pontuações de alinhamento relativamente baixas (scores 50 – 80), além de uma baixa cobertura (abaixo de 40%). Logo, nenhuma das sequências encontradas obtiveram homologia satisfatória para ser utilizada como molde para a

modelagem estrutural in silico, mostrando que a caracterização estrutural experimental dessas lipases de mamona são ainda uma lacuna na literatura.

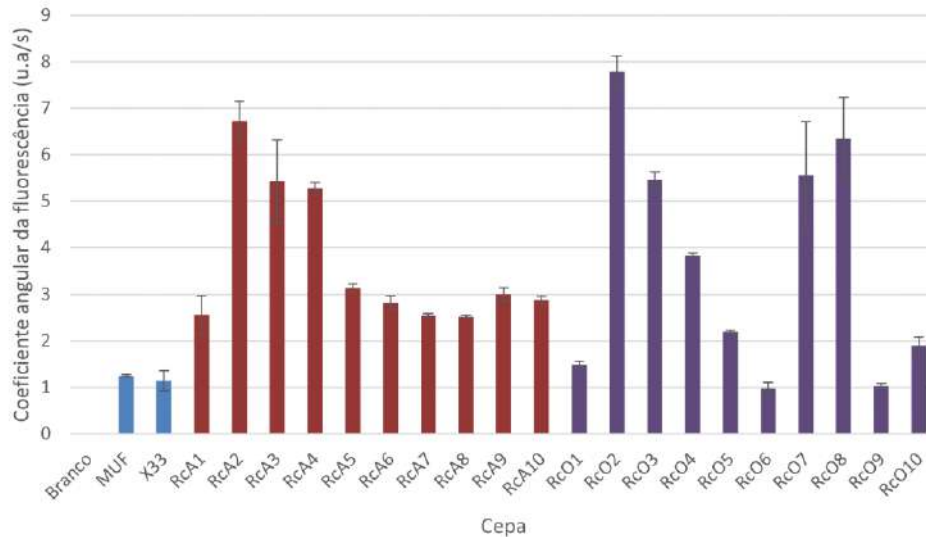
## 4.2. Seleção dos recombinantes

Em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa, os genes que codificam a RcOBL1 e a RcATGL foram clonados na cepa X33 de *Pichia pastoris* através do vetor pPICZ $\alpha$  e foi obtida uma biblioteca de 10 recombinantes para cada enzima, totalizando 20 cepas modificadas. Com isso, a primeira etapa do presente trabalho foi identificar as cepas que apresentassem o extrato bruto com maior atividade e, portanto, foi realizado uma seleção das cepas em duas etapas e determinando, ao final, uma cepa produtora de cada enzima recombinante para serem utilizadas nas etapas seguintes do projeto.

### 4.2.1. Cultivo em placas

Primeiramente, foi feito o cultivo de todas as cepas da biblioteca de recombinantes, as quais demonstraram resistência à marca de seleção, o antibiótico zeocina. O cultivo nesta primeira etapa foi realizado em escala de 2 mL em placas de 24 poços. As cepas recombinantes foram nomeadas através das abreviações RcA (produtoras de RcATGL) e RcO (produtoras de RcOBL1) e numeradas de 1 a 10. Depois de 48 horas de indução em metanol, o sobrenadante dos cultivos foi coletado por centrifugação e foi realizada a medição de cinética de fluorescência com o substrato MUF-7, os resultados sendo apresentados na figura 7.

Figura 7. Resultados de taxa de fluorescência para cada amostra analisada. A coluna denominada branco é somente meio de cultura, a coluna denominada MUF é meio de cultura com MUF-7 e a coluna X33 é para o sobrenadante do cultivo da cepa selvagem. As colunas RcA1 – RcA10 são cepas produtoras de RcATGL e as colunas RcO1 – RcO10 são cepas produtoras de RcOBL1. Os ensaios foram realizados em triplicata analítica em placas de 96 poços.

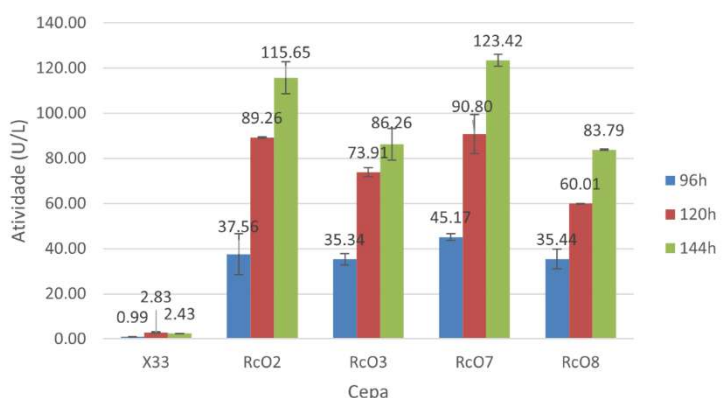


Conforme é possível observar no gráfico da figura 7, as taxas de fluorescência obtidas para os 20 recombinantes foram comparadas em conjunto com os controles (Branco, MUF e X33). Uma maior taxa de fluorescência indica um maior valor de atividade no sobrenadante do cultivo. Nesse caso, não foi necessária uma curva padrão, pois o objetivo desse teste era apenas uma comparação entre as amostras para determinação dos melhores clones para novos cultivos em frascos agitados. Observa-se então que a maioria das cepas apresentou taxa de fluorescência significativamente maior que os controles, confirmando que as lipases estavam realmente sendo expressas e secretadas para o meio de cultivo. A partir destes resultados, as cepas com um valor de taxa de fluorescência maior que 5 u.a./s foram selecionadas. Assim, para a produção de RcATGL foram selecionadas as cepas RcA2, RcA3 e RcA4 e para a produção de RcOBL1 foram selecionadas as cepas RcO2, RcO3, RcO7 e RcO8.

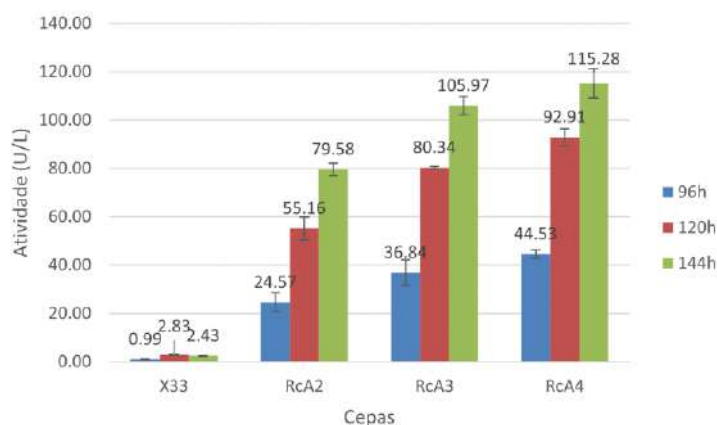
## 4.2.2. Cultivo em frascos agitados

Utilizando as cepas selecionadas, foram realizados cultivos em frascos Erlenmeyer de 250 mL por 24 horas em meio BMGY, com glicerol como fonte de carbono para adaptação e crescimento das células, e, em seguida, por mais 120 horas em meio BMMY, com metanol como fonte de carbono, para a indução da expressão das enzimas recombinantes. Foram retiradas alíquotas de sobrenadante a cada 24 horas a partir das 96 horas totais de cultivo para acompanhar a evolução da atividade enzimática, encerrando o cultivo em 144 horas. Essas alíquotas foram submetidas ao protocolo de atividade em MUF-7 e dessa vez os resultados das taxas de fluorescência foram apropriadamente convertidos para unidades de atividade (U/L) através de um fator de conversão obtido com uma curva padrão de MUF, representados na figura 8.

Figura 8. Acompanhamento da atividade dos sobrenadantes ao longo do cultivo para as cepas referentes a RcOBL1 (a) e RcATGL (b). Os ensaios foram realizados em triplicata analítica.



a)



b)

Como pode ser observado, todas as cepas apresentaram atividade superior ao controle (X33) e crescente ao longo do cultivo. Para determinar se os valores de atividade observados são estatisticamente diferentes, foi feito um teste t de Student com p-valor de corte de 0,05, logo pares de amostras apresentando um p-valor maior ou igual ao de corte foram considerados estatisticamente iguais. Para produção de RcOBL1, foi observado que os pares de amostras RcO2-RcO3 e RcO2-RcO7 são estatisticamente iguais. Já para a produção de RcATGL, foi observado que o par RcA3-RcA4 é estatisticamente igual. Como era necessário escolher somente uma cepa por lipase, foi decidido selecionar as que apresentaram o maior valor absoluto observado de atividade, portanto, para a RcOBL1 foi selecionada a RcO7, renomeada para RcO, e para a RcATGL foi selecionada a RcA4, renomeada para RcA, para dar continuidade ao projeto.

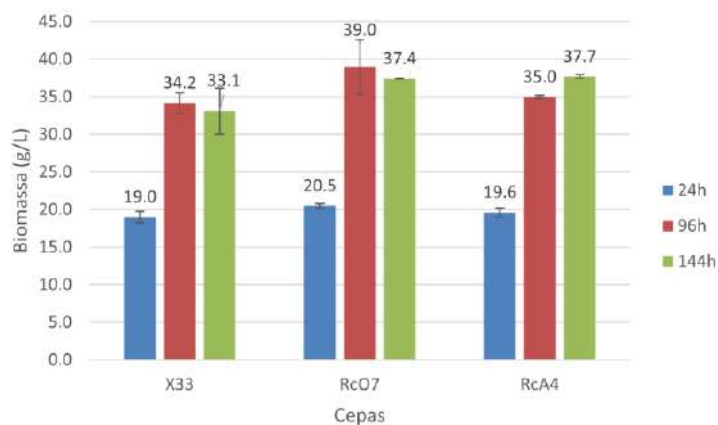
### 4.3. Cultivo das cepas selecionadas

Em posse dos resultados do primeiro cultivo foram selecionadas as cepas RcO e RcA, uma vez que apresentaram as melhores atividades, para um novo cultivo em frascos agitados de 250 mL realizados em duplicata biológica, com a biomassa medido após 24, 96 e 144 horas do início do cultivo e a atividade foi medida em MUF-7 utilizando as alíquotas retiradas em 96, 120 e 144 horas, com os resultados representados na figura 9.

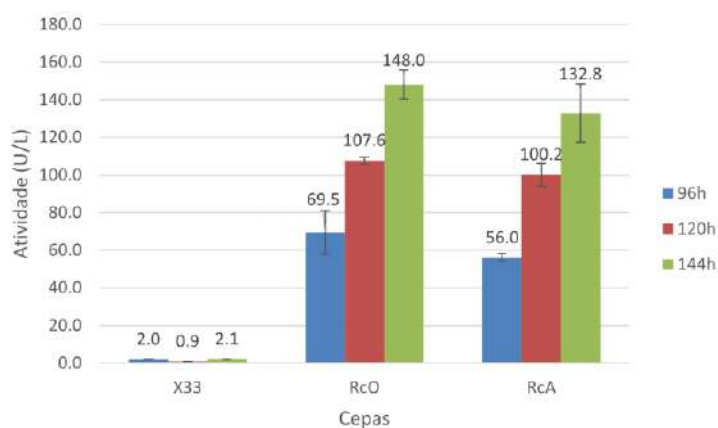


Figura 9. Valores de biomassa medidos em massa seca de células (g/L) (a) e produção de atividade (U/L) (b) para as cepas X33 (controle), RcOBL e RcATGL. As análises foram realizadas em triplicata analítica e réplica biológica. A troca do meio contepara o meio contendo 2% de metanol foi realizada às 24 h de cultivo e foram adicionados 4 mL de metanol a cada 24

h.



a)



b)

As duas cepas recombinantes apresentaram produções de biomassa semelhantes entre si e em comparação com a cepa controle X33. Além disso, o aumento da atividade foi observado para as duas cepas recombinantes ao longo do cultivo. Para as duas cepas, a biomassa e a atividade aumentaram ao longo do cultivo e, tanto a biomassa quanto a atividade apresentaram valores semelhantes, indicando que a expressão heteróloga não prejudica o crescimento celular. Em termos de rendimento,  $Y_{p/x}$ , utilizando o valor de atividade como produto, foram calculados os valores de 4,73 e 3,53 U/g de célula para a RcO e RcA, respectivamente.

Comparando com a literatura, Brêda [33] obteve um valor de  $Y_{p/x}$  de 1,4 U/g de célula em para a produção de uma lipase de *Ustilago hordei*, UHL,

também expressa em *P. pastoris* com o vetor pPICZ $\alpha$  e promotor AOX1, em frascos agitados. Sena *et al.* [34] obtiveram um valor de Y<sub>p/x</sub> de 5,72 U/g de célula para expressão de uma lipase de *Rhizomucor miehei*, RmL, ancorada na superfície de *P. pastoris*. Logo, os valores obtidos para as lipases de mamona ficaram em valores intermediários e compatíveis com os disponíveis na literatura utilizando MUF-7 como substrato.

#### 4.4. Caracterização dos extratos brutos

Para a determinação do pH e temperatura ótimos foi realizado o planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional (DCCR), com os valores de atividade nas diversas condições definidas (item 3.11) apresentados na tabela 2. Em ambas as enzimas foram observados valores no ponto central reproduzíveis por serem valores próximos.

Tabela 2. Valores observados de atividade em cada condição definida do planejamento experimental DCCR para cada lipase

Temperatura (°C)	pH	Atividade RcATGL (U/L)	Atividade RcOBL1 (U/L)
25	7	6,3	17,5
40	4,8	6,8	20,5
29,4	5,5	4,1	11,5
40	7	6,0	17,8
40	7	6,3	17,9
40	7	6,2	17,3
29,4	8,5	3,5	10,4
40	9,2	3,1	9,2
50,6	5,5	10,8	30,7
50,6	8,5	5,1	23,0
55	7	8,7	24,4

Com os valores definidos pelo planejamento experimental, uma equação foi ajustada a esses resultados. Para verificar se as variáveis do modelo gerado descreve bem o comportamento das lipases, foi feita uma análise de variância (ANOVA), obtendo como resultado as tabelas 3a e 3b.

Tabela 3. Tabela ANOVA para o planejamento experimental com a RcATGL (a) e com a RcOBL1 (b). Foram utilizados os fatores de temperatura e pH lineares (L) e quadráticos (Q) independentes e a interação entre os fatores lineares (Temperatura(L) x pH(L)). Foram representados os valores das somas dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM) e os valores de teste F e p. Em negrito estão os fatores significativos.

	Fatores	SQ	gl	QM	F	p
A)	<b>Temperatura(L)</b>	<b>17.2693</b>	<b>1</b>	<b>17.2693</b>	<b>641.9911</b>	<b>0.001554</b>
	<b>Temperatura(Q)</b>	<b>1.7980</b>	<b>1</b>	<b>1.7980</b>	<b>66.8397</b>	<b>0.01463</b>
	<b>pH(L)</b>	<b>16.6319</b>	<b>1</b>	<b>16.6319</b>	<b>618.2955</b>	<b>0.001613</b>
	<b>pH(Q)</b>	<b>2.8285</b>	<b>1</b>	<b>2.8285</b>	<b>105.1514</b>	<b>0.009377</b>
	<b>Temperatura(L) x pH(L)</b>	<b>6.4465</b>	<b>1</b>	<b>6.4465</b>	<b>239.6488</b>	<b>0.004147</b>
	<b>Falta de Ajuste</b>	<b>3.5971</b>	<b>3</b>	<b>1.1990</b>	<b>44.5746</b>	<b>0.02202</b>
	Erro Puro	0.0538	2	0.02690		
	SQ Total	50.5493	10			

	Fatores	SQ	gl	QM	F	p
B)	<b>Temperatura(L)</b>	<b>215.5951</b>	<b>1</b>	<b>215.5951</b>	<b>2121.3582</b>	<b>0.000471</b>
	<b>Temperatura(Q)</b>	<b>20.0686</b>	<b>1</b>	<b>20.0686</b>	<b>197.4662</b>	<b>0.00503</b>
	<b>pH(L)</b>	<b>77.3646</b>	<b>1</b>	<b>77.3646</b>	<b>761.2325</b>	<b>0.001311</b>
	<b>pH(Q)</b>	<b>7.4870</b>	<b>1</b>	<b>7.4870</b>	<b>73.6691</b>	<b>0.013304</b>
	<b>Temperatura(L) x pH(L)</b>	<b>10.6678</b>	<b>1</b>	<b>10.6678</b>	<b>104.9667</b>	<b>0.009393</b>
	<b>Falta de Ajuste</b>	<b>69.3182</b>	<b>3</b>	<b>23.1061</b>	<b>227.3532</b>	<b>0.00438</b>
	Erro Puro	0.2033	2	0.10163		
	SQ Total	411.3980	10			

Os coeficientes de determinação,  $R^2$ , para o ajuste realizado ao modelo foram de 0,9278 e de 0,8310 para RcATGL e RcOBL1, respectivamente. Embora todas as variáveis estudadas tenham se mostrado significativas, o que pode ser observado pelos valores de F calculados, bem acima do valor de F tabelado de

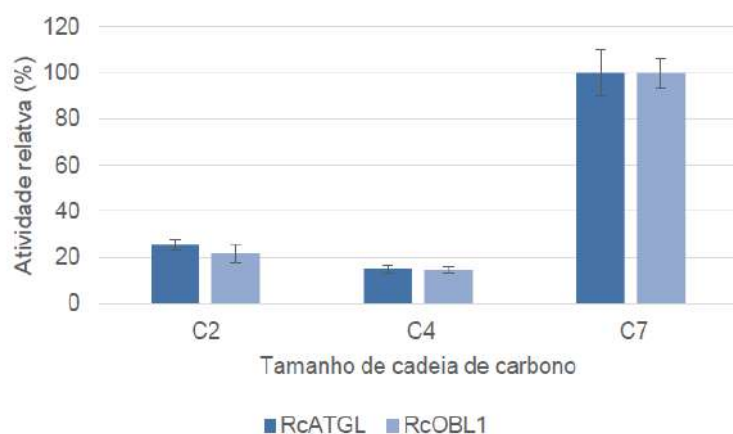
5,05, e dos p-valores menores que 0,05, é possível identificar que as variáveis mais influentes, com maiores valores de F, são temperatura linear e pH linear em ambas as lipases. No entanto, a falta de ajuste, calculada através do erro puro, foi significativa também em ambos os casos. Dessa forma, não foi possível obter um modelo que se ajustasse ao fenômeno observado, impossibilitando a geração de uma superfície de resposta adequada. Diante disso, deveria ser feito um planejamento experimental para as lipases, possivelmente reajustando as faixas de temperatura e pH para obter um modelo com ajuste e determinar os valores ótimos.

Cavalcanti *et al.* [35] estudaram o preparado enzimático vegetal (PEV) a partir de sementes dormentes de mamona usando tributirina como substrato e obtiveram também melhores desempenhos de atividade hidrolítica em pH mais ácidos. No entanto, os maiores valores de atividade foram obtidos em uma temperatura de 30°C, abaixo da observada para as lipases RcATGL e RcOBL1. Li *et al.* [22] caracterizaram a RcLipase expressa em *P. pastoris*, determinando uma temperatura ótima de 40 °C e pH ótimo de 8 em p-nitrofenil palmitato, diferindo bastante em termos de acidez. Eastmond [21] realizou uma caracterização de pH da RcOBL1 expressa em *E. coli* e determinou que o valor ideal era entre 4 e 4,5 em emulsões de trioleína a 30 °C, valores mais ácidos do que os observados por DCCR.

A atividade das lipases produzidas foi verificada em ésteres de 4-metilumbeliferona com diferentes tamanhos de cadeia carbônica, inicialmente com o éster com cadeia de 7 carbonos e, posteriormente C2 e C4. Os resultados das lipases novamente foram similares, apresentando preferência por C7, sendo padronizado como 100% de atividade para comparação com ésteres de tamanho de cadeia diferentes. O teste apresentou redução da atividade de 80% e 95% para C2 e C4, respectivamente, como pode ser observado na figura 10. No entanto, Eastmond [21] verificou que para a RcOBL1 as maiores atividades foram observadas com os substratos tricaprina (C10) e p-nitrofenil butirato (C4). Cavalcanti [35] verificou que o extrato proteico da semente de mamona também apresentou uma maior afinidade por triglicerídeos de cadeias curtas e médias, como a tributirina (C4) e tricaprilina (C8), contrastando com os resultados do presente trabalho. No caso da RcOBL1 utilizada por Eastmond, um fator que

pode estar causando essas diferenças é uso de uma diferente plataforma de expressão, a bactéria *E. coli*, que não realiza modificações pós-traducionais como a glicosilação, o que pode alterar a especificidade pelo tamanho de cadeia. No caso do extrato proteico das sementes, há uma variedade muito grande de enzimas, podendo então alterar a afinidade. Outro fator para identificar as diferenças observadas é que os substratos usados nos trabalhos citados, ainda que tenham o mesmo tamanho de cadeia, são ésteres diferentes, o que difere na preferência por substrato.

Figura 10. Atividades relativas das lipases em MUF com diferentes tamanhos de cadeias carbônicas. A atividade em MUF-7 foi considerada como o valor de 100%.

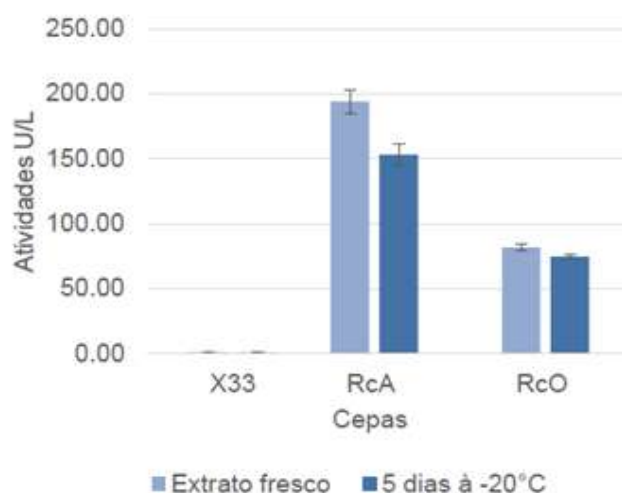


Li *et al.* [22] realizaram testes em diferentes tamanhos de cadeia carbônica em outra lipase de mamona, a RcLipase, que apresentou maior atividade à medida que os ácidos graxos aumentavam, demonstrando preferência da enzima por substratos com cadeias maiores, tanto em ésteres de p-nitrofenil quanto em triglicerídeos sintéticos e com valor máximo para o óleo de mamona. Tal fato pode ser justificado já que o substrato natural da mamona, o ácido ricinoleico, ser um ácido graxo com 18 carbonos. Contudo, para as lipases RcATGL e RcOBL1 não foi possível realizar ensaios com cadeias mais longas devido à dificuldade no preparo das soluções de ésteres de 4-metilumbeliferona.

As lipases foram também submetidas a testes de estabilidade ao congelamento, congelando-as à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os extratos brutos das cepas apresentaram estabilidade satisfatória em relação ao congelamento, em ambas houve perda de atividade, de 20,94% para a RcATGL e 8,76% para a RcOBL

após 5 dias de congelamento, como representado na figura 11. Tal resultado indica a possibilidade de congelamento dos extratos brutos após a fermentação e anteriormente à realização de experimentos. Além disso, a estabilidade ao congelamento indica que as cepas poderiam ser submetidas ao processo de liofilização, já que neste processo a amostra passa por uma etapa de congelamento.

Figura 11. Atividades dos extratos frescos e após 5 dias de congelamento. As amostras foram acondicionadas diretamente no sobrenadante do meio de cultura.

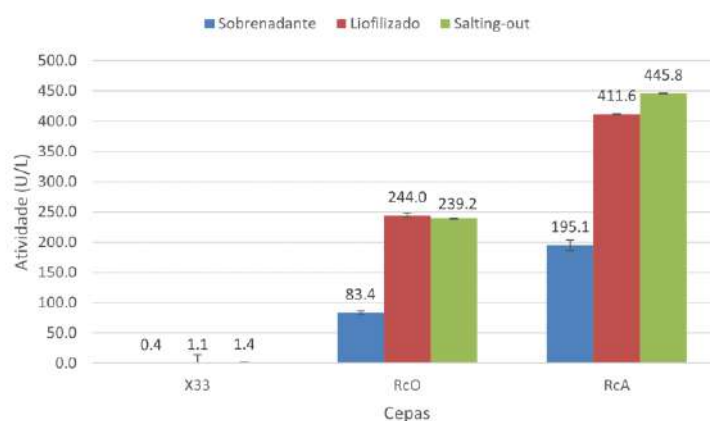


#### 4.5. Ensaios em novos substratos

A análise dos resultados de atividade em MUF-7 indicou que os extratos brutos de RcATGL e RcOBL1 apresentam um potencial de aplicação biotecnológica a ser explorado. Para explorar as possibilidades de aplicação dos substratos, foi realizada uma colaboração com o Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABiM), que realizou ensaios de atividade hidrolítica em tributirina e óleos vegetais, como óleo de soja e de oliva, porém, nenhuma conversão foi observada. Devido ao fato de ser uma análise menos sensível, a falta de conversão poderia se dever a uma baixa concentração das enzimas nos sobrenadantes. Então, os extratos obtidos ao final dos cultivos foram submetidos a dois métodos de concentração, sendo concentração por *salting out* e por liofilização.

Ambos os métodos resultaram em aumento de atividade em MUF-7, sendo o aumento usando *salting out* de 186,8% para RcOBL1 e 128,5% para RcATGL, e usando liofilização obteve-se aumentos de 192,5% para RcOBL1 e 111% para RcATGL, resultados encontrados na figura 12. Os dois métodos apresentaram resultados de atividades muito próximos, indicando estabilidade das enzimas aos métodos propostos, sem inativação dos extratos brutos.

Figura 12. Atividades dos sobrenadantes do cultivo, tanto em sua forma bruta quanto depois de *salting out* e liofilização.



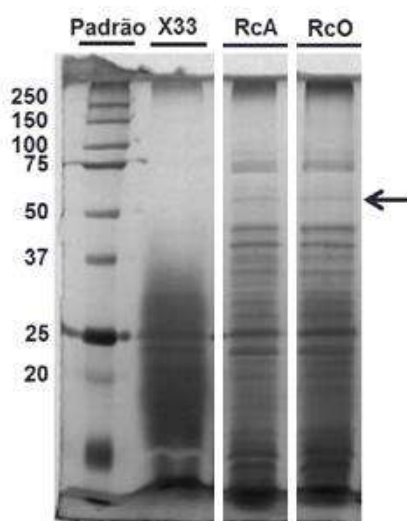
Verificada a estabilidade das enzimas aos métodos de concentração, as amostras liofilizadas foram submetidas a novos testes de hidrólise de tributirina e óleos vegetais por titulação. No entanto, os resultados obtidos mostraram que os extratos, mesmo concentrados, não apresentaram conversão nos diversos triglicerídeos testados, ainda indicando uma possível baixa concentração das enzimas nos sobrenadantes mesmo após os métodos de concentração.

Ao caracterizar a atividade da RcOBL1, Eastmond [21] fez testes com diversos triglicerídeos e obteve atividade, ao contrário do observado no presente trabalho. No entanto, vale ressaltar que os métodos utilizados por Eastmond foram com triglicerídeos marcados com carbono radioativo ou kit colorimétrico, ou seja, são métodos de detecção mais sensíveis que a titulação. Além disso, as atividades foram muito baixas, sendo expressas em termos de nmol de ácido graxo por mg de proteína por minuto. Mesmo assim, foi decidido investigar o nível de expressão das lipases no extrato bruto.

## 4.6. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

Com o intuito de estudar a expressão das lipases nos sobrenadantes, foi realizado uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) dos extratos concentrados por liofilização. A análise de sequência de aminoácidos indica que as massas moleculares das lipases de interesse se encontram próximas a 60 kDa. Como pode ser visto na figura 13, são encontradas bandas na região de 60 kDa que são um indicativo da presença das lipases RcATGL e RcOBL1. Embora a visualização das proteínas presentes no extrato proveniente da cepa controle X33 esteja comprometida pela maior concentração de sal presente nesta amostra, é possível observar que a banda em torno da região de 60 kDa não se encontra presente. Para confirmar a ausência desta banda pela cepa X33, que não produz as lipases de interesse, seria necessária a redução da concentração de sal na amostra e a realização de uma nova eletroforese.

Figura 13. Cortes do gel de poliacrilamida corados com prata. A seta indica a banda que se acredita pertencer às enzimas RcATGL e RcOBL1, em torno de 60 kDa.



Além disso, é possível perceber que as bandas correspondentes apresentam uma coloração muito fraca, o que poderia indicar uma baixa expressão das lipases de interesse no sobrenadante do cultivo e poderiam justificar os resultados negativos na hidrólise de óleos vegetais. Uma hipótese



para explicar a baixa expressão é o fato de que ambas as lipases na semente de mamona são expressas de forma nativa na membrana de corpúsculos lipídicos [21,23], que não existem em *P. pastoris* e, portanto, não há o maquinário celular adequado para expressá-las. Outra hipótese para a baixa detecção das lipases de interesse no sobrenadante é que elas estão sendo expressas, mas o sistema de secreção da levedura não consegue transportá-las para o meio extracelular, causando um acúmulo dentro da célula e, como foi analisado somente o sobrenadante bruto sem lise celular, parte das enzimas produzidas não estariam sendo detectadas.

## Capítulo V – Conclusões

A expressão de dois genes de lipases de mamona, RcATGL e RcOBL1, foi realizada na cepa X33 de *Pichia pastoris* apresentando atividade hidrolítica em ésteres de 4-metilumbeliferona no sobrenadante dos cultivos. A caracterização do extrato bruto resultou em temperaturas acima de 55 °C e pH em torno de 5 como melhores condições de reação testadas para ambas as lipases, além de preferência por substrato de cadeia intermediária, com 7 carbonos, quando comparado com substratos de cadeias mais curtas em ésteres de 4-metilumbeliferona. Foi possível concentrar os extratos brutos dos cultivos para obter valores de atividade maiores através de *salting out* e liofilização, alcançando aumentos entre 111 e 192%, demonstrando que ambas as lipases são resistentes a ambos os métodos de concentração. Ambas as lipases demonstraram serem resistentes a baixas temperaturas ao congelar o extrato bruto diretamente a -20 °C, perdendo entre 8 e 21% de atividade após 5 dias nessas condições. No entanto, foram detectados baixos níveis de expressão a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida, que mesmo utilizando os extratos concentrados em torno de 20x e corados com prata foram observadas as bandas esperadas em torno de 60 kDa, porém, com coloração muito fraca. Isso pode se dever a diversos fatores como o direcionamento das enzimas recombinantes para o sobrenadante ou a falta de maquinário celular adequado para expressá-las corretamente. Os resultados obtidos no presente trabalho se mostram

importantes no sentido de elucidar informações sobre duas lipases de origem vegetal pouco conhecidas pela literatura até o momento.

## Capítulo VI - Perspectivas

O trabalho tem como perspectivas a realização de um novo DCCR reajustando as faixas de temperatura e pH utilizadas, dessa forma, uma faixa de temperaturas mais altas e pH's mais baixos seria escolhida, uma vez que não foi encontrado um ponto de inflexão na superfície construída a partir do DCCR realizado, além do modelo criado não ser ajustado para o fenômeno. Novos testes de atividade deveriam ser realizados utilizando ésteres com cadeias maiores pois, como visto, substratos com cadeias curtas apresentaram atividade menor que substratos com cadeia intermediária, de 7 carbonos, e, além disso, o substrato natural dessas lipases é um ácido graxo com uma cadeia de 18 carbonos, indicando afinidade por cadeias maiores.

Quanto ao problema de baixa expressão no meio extracelular, poderá ser feito o rompimento celular e análise do conteúdo intracelular, confirmando se a secreção das lipases é um limitante ou se as enzimas recombinantes realmente não estão sendo expressas corretamente. Outra opção discutida com o grupo de pesquisa foi a possibilidade de clonar os genes das lipases em *Yarrowia lipolytica*, uma levedura oleaginosa, para expressão em corpúsculos lipídicos, região na qual é expressa a RcOBL1 na sua forma nativa, possivelmente tornando-a uma plataforma de expressão mais adequada.

## Referências Bibliográficas

1. MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: from production to applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143-158, 2020.
2. RAMOS-SANCHEZ, L. B. et al. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. **J Bioprocess Biotech**, v. 5, n. 2, 2015.
3. DODSON, G.; WLODAWER, A. Catalytic triads and their relatives. **Trends in biochemical sciences**, v. 23, n. 9, p. 347-352, 1998.
4. KHAN, F. I. et al. The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 5, p. 16, 2017.
5. OLLIS, D. L. et al. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.
6. CASAS-GODOY, L.; DUGUESNE, S.; BORDES, F. Lipases: An Overview. In: SANDOVAL, G. **Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols**. Totowa: Humana Press, 2012.
7. DWIVEDEE, B. P. et al. Promiscuity of lipase-catalyzed reactions for organic synthesis: a recent update. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 9, p. 2441-2466, 2018.
8. MEHTA, A. et al. The lipases and their applications with emphasis on food industry. In: \_\_\_\_\_ **Microbial biotechnology in food and health**. [S.l.]: [s.n.], 2021. p. 143-164.
9. MHETRAS, N.; MAPARE, V.; GOKHALE, D. Cold active lipases: biocatalytic tools for greener technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 7, p. 2245-2266, 2021.
10. CONTESINI, F. J. et al. Advances in recombinant lipases: Production, engineering, immobilization and application in the pharmaceutical industry. **Catalysts**, v. 10, n. 9, p. 1032, 2020.
11. VARGAS, M. et al. Lipases as biocatalyst for biodiesel production. **Lipases and Phospholipases**, p. 377-390, 2018.
12. CHANDRA, P.; SINGH, R.; ARORA, P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-42, 2020.
13. ANDERSON, E. M.; LARSSON, K. M.; KIRK, O. One biocatalyst-many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 16, n. 3, p. 181-204, 1998.

14. LUTZ, S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, n. 18, p. 2743-2748, 2004.
15. BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties-a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 15-29, 2010.
16. SETH, S. et al. An insight into plant lipase research--challenges encountered. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 13-21, 2014.
17. SANKAR, S.; PONNURAJ, K. Less explored plant lipases: Modeling and molecular dynamics simulations of plant lipases in different solvents and temperatures to understand structure-function relationship. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3546-3558, 2020.
18. AVELAR, M. H. M. et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial crops and products**, v. 44, p. 425-458, 2013.
19. CAVALCANTI, E. D. C. et al. Acetone powder from dormant seeds of *Ricinus communis* L. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, n. 1, p. 57-65, 2007.
20. TAVARES, F. et al. Use of castor bean seeds as lipase source for hydrolysis of crambe oil. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 254-264, 2018.
21. EASTMOND, P. J. Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45540-45545, 2004.
22. LI, Y. et al. Characterization of a novel sn1, 3 lipase from *Ricinus communis* L. suitable for production of oleic acid-palmitic acid-glycerol oleate. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.
23. NOGUEIRA, F. C. S. et al. Isotope labeling-based quantitative proteomics of developing seeds of castor oil seed (*Ricinus communis* L.). **Journal of proteome research**, v. 12, n. 11, p. 5012-5024, 2013.
24. KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803-822, 2018.
25. JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. **ChemBioChem**, v. 19, n. 1, p. 7-21, 2018.

26. CREGG, J. M. et al. Expression of recombinant genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 17, n. 1, p. 25, 2018.
27. FENG, K. et al. Construction of recombinant *Pichia pastoris* strains for ammonia reduction by the *gdhA* and *glnA* regulatory genes in laying hens. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 234, p. 113376, 2022.
28. POODEH, S. H. et al. Improving AOX1 promoter efficiency by overexpression of Mit1 transcription factor. **Molecular Biology Reports**, p. 1-8, 2022.
29. INVITROGEN. *Pichia* Expression Kit User Guide. **Thermofisher**. Disponível em: <[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf)>. Acesso em: 30 Janeiro 2023.
30. PRIM, N. et al. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 339-346, 2003.
31. FREIRE, D. M. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63, p. 409-421, 1997.
32. BRADFORD, N. J. A. B. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of a protein isolated from red cell membranes. **Anal. Biochem**, v. 72, n. 248, p. e254, 1976.
33. BRÊDA, G. C. **A levedura *Pichia pastoris* como plataforma para a obtenção de dois produtos de interesse biotecnológico: o ácido 3-hidroxi propiônico e uma nova lipase de *Ustilago hordei***. 2019. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.
34. SENA, R. O. et al. Application of *Rhizomucor miehei* lipase-displaying *Pichia pastoris* whole cell. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 189, p. 734-73, 2021.
35. CAVALCANTI, E. D. C. **Avaliação da atividade lipásica da semente dormente de *Ricinus communis***. 2006. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.