



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**ESCOLA DE QUÍMICA**



**ESTUDOS ESTRUTURAIS E  
COMPARATIVOS DOS MUTANTES  
RACIONAIS DA LIPASE Pf2001 $\Delta$ 60 DE  
*Pyrococcus furiosus***

Bianca Rizo Ventura Gusmão  
Janeiro 2017

Monografia em Engenharia Química

Orientador Responsável: Prof<sup>ª</sup>. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc  
Outros Orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Cristiane D. Ano Bom, D.Sc  
Dr. Rafael A. de Andrade, D.Sc

# **ESTUDOS ESTRUTURAIS E COMPARATIVOS DOS MUTANTES RACIONAIS DA LIPASE Pf2001Δ60 DE *Pyrococcus furiosus***

***Bianca Rizo Ventura Gusmão***

Monografia em Engenharia Química submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de Engenharia Química.

Aprovada por:

---

Prof. Ivaldo Itabaiana Junior (DEB/EQ/UFRJ)

---

Prof<sup>a</sup>. Lúcia Moreira Campos Paiva (IQ/UFRJ)

---

Prof<sup>a</sup>. Fabiana Pestana Albernaz (IBqM/UFRJ)

Orientado por:

---

Prof<sup>a</sup>. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra (DEB/EQ/UFRJ)

---

Prof<sup>a</sup>. Cristiane Dinis Ano Bom (IQ/UFRJ)

---

Doutor Rafael Alves de Andrade (IQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil  
Janeiro de 2017

Gusmão, Bianca Rizo Ventura.

**ESTUDOS ESTRUTURAIS E COMPARATIVOS DOS MUTANTES  
RACIONAIS DA LIPASE Pf2001Δ60 DE *Pyrococcus furiosus***

Estudos estruturais e comparativos dos mutantes racionais da lipase Pf2001Δ60 de *Pyrococcus furiosus* / Bianca Rizo Ventura Gusmão.

Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2017.

(XII), (123f): il. 29,7cm

Orientadores: Cristiane Dinis Ano Bom

Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

Rafael Alves de Andrade

Monografia – UFRJ/Escola de Química/Curso de Engenharia Química

Graduação em Engenharia Química, 2017.

Referências Bibliográficas: 137f.

1 – Lipases. 2 – Enzimas. 3 - Biocatalisadores

4 – Mutantes racionais. 5-Estrutura de proteínas. I. Gutarra, Melissa Limoeiro Estrada. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Curso de Graduação em Engenharia química. III. Título.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer imensamente minha orientadora professora Cristiane, que esteve ao meu lado desde o início ao final da graduação. Agradeço pelo incentivo constante e pelo acolhimento que ultrapassa a relação orientador/aluno.

Agradeço também ao Doutor Rafael por ter sempre me ajudado e ensinado quando preciso, pela paciência e por ter sido meu braço direito nos últimos meses.

À professora Melissa, meu muito obrigado, por ter abraçado o projeto e me orientado mesmo que a distância.

Agradeço também aos professores do Laboratório de Bioquímica Estrutural de Proteínas (LaBEP), professores Lúcia Paiva, Danielle de Oliveira e Anderson Pinheiro por todo apoio.

Não poderia deixar de mencionar meus amigos e companheiros de laboratório, Beatriz Penna, Camila Soares, Carolina Lixa, Carolina Mattos, Diogo Vivacqua, Gabrielle Sentieiro, Guilherme Caldas, Kleber Avila, Leonardo Bartkevihi, Luís Felipe Ramos, Luís Felipe da Silva, Márcia Dias e Pâmella Leite. Agradeço por todos os momentos que dividimos, sem vocês essa jornada não teria sido tão maravilhosa.

Agradeço a minha família. Aos meus avós, minha gratidão pela vigília constante, conselhos e exemplos de uma vida. Aos meus pais, obrigada pelo incentivo, proteção e críticas sempre construtivas. Aos meus padrinhos, Renato e Jalile, mesmo que longe, agradeço por nunca deixarem a distância ser decisiva na nossa relação. E as minhas primas, Sofia e Luiza, por serem sempre motivo alegria na minha vida.

Agradeço também a meu companheiro Renan, por ser um porto seguro. Obrigada pela calma e compreensão em momentos muitas vezes difíceis.

## RESUMO

Lipases são enzimas capazes de atuar em diferentes meios de reação e normalmente apresentam elevada régio e/ou estereoespecificidade. Devido a sua alta versatilidade frente aos meios reacionais e especificidade a substratos, as lipases são utilizadas como biocatalisadores em diversos setores industriais, entre eles, o setor do biodiesel. Entretanto, a utilização de enzimas neste setor ainda é restrita devido ao alto custo e condições específicas de reação, limitando sua utilização como biocatalisadores. A utilização de enzimas de microrganismos hipertermófilos em bioprocessos é uma possibilidade real, já que essas lipases são resistentes à grande parte das condições requeridas nos bioprocessos. A lipase Pf2001Δ60 da arquea hipertermofílica *Pyrococcus furiosus* apresenta alta termoestabilidade e termoatividade, características desejáveis para a produção de biodiesel e que justificam o seu grande potencial biotecnológico. Entretanto, essa enzima não apresenta afinidade por ácidos graxos de cadeia longa, propriedade essencial na indústria de biodiesel. Logo, estudos destinados ao melhoramento da lipase Pf2001Δ60 para fins de aplicabilidade industrial são de extrema importância. Através da estrutura cristalográfica e simulação de dinâmica molecular, uma região com características flexíveis foi identificada como um subdomínio tampa, que pode proteger ou expor o sítio ativo da lipase dependendo da conformação da proteína o que pode afetar a entrada do substrato. Nesse contexto, três mutantes racionais foram construídos com mutações específicas no subdomínio em tampa da lipase Pf2001Δ60: W194A, F198A e W194A/F198A com o propósito de avaliar possíveis mudanças nas características bioquímicas da enzima. Este trabalho tem como objetivo comparar a lipase Pf2001Δ60 selvagem com mutantes racionais W194A, F198A e W194A/F198A a fim de obter um biocatalisador otimizado para a produção de biodiesel. As mutações foram cedidas pelo colaborador David Reverter da Universitat Autònoma de Barcelona. As transformações e os testes de expressão foram realizados em diferentes condições visando definir um protocolo ideal para a produção das lipases selvagem e mutantes. O extrato bruto da lipase selvagem e dos mutantes foram purificados através das técnicas de cromatografia de afinidade e gel filtração e as frações obtidas foram monitoradas através de SDS-PAGE. Somente a purificação da lipase selvagem e o mutante W194A atingiram um alto grau de pureza e assim, apenas a lipase selvagem e o mutante W194A foram utilizadas para os ensaios de termoestabilidade e especificidade à diferentes substratos. Estudos anteriores revelaram que a enzima selvagem apresenta especificidade para ésteres de cadeia média com temperatura ótima a 80°C. Assim, as atividades da lipase Pf2001Δ60 selvagem e da mutante W194A foram medidas na presença de substratos de diversos tamanhos de cadeia carbônica. As lipases apresentaram maior atividade na presença de substratos de cadeia média (C8). Entretanto, a lipase mutante W194A apresentou maior atividade para substratos de cadeia longa (C16), um dado importante para a possível aplicação da enzima na produção de biodiesel. Os ensaios de termoestabilidade das lipases Pf2001Δ60 e W194A indicaram comportamento semelhante para ambas enzimas, com manutenção de sua atividade até a temperatura de 70°C e perda acentuada da atividade a 90°C. Contudo, a enzima mutante mostrou maior atividade a 90°C do que a enzima selvagem, indicando que a mutação W194A aumenta sua termoestabilidade. Os dados obtidos reforçam a importância dos estudos estruturais mostrando que mutações racionais podem levar ao melhoramento de enzimas para aplicação biotecnológica.

## ABSTRACT

Lipases are enzymes capable of acting on different reaction media and usually have high regio and / or stereospecificity. Due to their high versatility under reaction media and substrates specificity, lipases are used as biocatalysts in several industrial sectors, including biodiesel sector. However, the use of enzyme in this sector still is restricted, by their high cost and specific reaction conditions, which limit their use as biocatalysts. The use of enzymes from hyperthermophilic microorganisms is a possibility in biprocesses. A Pf2001 $\Delta$ 60 lipase from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* shows high thermostability and thermoactivity, desirable features for biodiesel production and that justify their biotechnological potential. However, this enzyme does not show interaction with long chain fatty acids, essential feature at biodiesel industry. Therefore, studies intended to improve Pf2001 $\Delta$ 60 lipase for industrial applicability purposes are extremely important. Through crystallographic structure and molecular dynamics simulation, a region with flexible features was identified as the lid subdomain, that can protect or expose the lipase active site depending on the protein conformation, and can affect the substrate inlet. In this context, three rational mutants were constructed with specific mutations at the lid subdomain from Pf2001 $\Delta$ 60 lipase: W194A, F198A e W194A/F198A with the purpose of evaluating possible changes at the enzyme biochemistry features. This work goal is to compare the wild-type Pf2001 $\Delta$ 60 lipase with rational mutants W194A, F198A e W194A/F198A in order to obtain an optimized biocatalyst to produce biodiesel. The mutations were given by the collaborator David Reverter da Universitat Autònoma from Barcelona. The transformation and the expression tests were performed in different conditions aiming to define an ideal protocol for the wild and mutants lipase production. The crude extract from the wild-type lipase and mutants were purified through affinity chromatography and gel filtration and the fractions obtained were monitored by SDS-PAGE. Only the purification of the wild-type lipase and the mutant W194A reached a high degree of purity, thereby only the wild-type lipase and the mutant W194A were used for thermostability and specificity assays using different substrates. Previous studies revealed that the wild-type lipase shows specificity for medium chain esters with optimum temperature at 80 ° C. Thereby, the wild-type Pf2001 $\Delta$ 60 lipase and the W194A mutant activities were measured in the presence of various chain sizes carbon substrates. The lipases presented greater activity in the presence of medium chain substrates (C8). However, the W194A mutant lipase presented higher activity for long chain (C16) substrates, an important data for the possible enzyme application in the production of biodiesel. The Pf2001 $\Delta$ 60 and W194A lipases thermostability assays indicated similar behavior for both enzymes, maintaining their activity up to 70 ° C and marked loss of activity at 90 ° C. However, the mutant enzyme showed higher activity at 90 ° C against the wild-type enzyme, indicating that the W194A mutation increases its thermostability. The data obtained reinforce the importance of the structural studies showing that rational mutations can lead to the enzymes improvement for biotechnological application.

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Reações catalisadas pelas lipases (PAQUES E MACEDO, 2006).....	3
<b>Figura 2:</b> Esquema do enovelamento $\alpha/\beta$ hidrolase característico das lipases e representado pela estrutura tridimensional da lipase B de <i>Candida antarctica</i> . ....	7
<b>Figura 3:</b> Mecanismo catalítico das serino hidrolases. ....	10
<b>Figura 4:</b> Subdomínio em tampa da lipase T1 de <i>Geobacillus zalihae</i> . ....	11
<b>Figura 5:</b> Ilustrações da <i>Arquea</i> hipertermofílica <i>Pyrococcus furiosus</i> . ....	15
<b>Figura 6:</b> Desnaturação térmica da lipase Pf2001 $\Delta$ 60. ....	17
<b>Figura 7:</b> Atividade enzimática da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 em diferentes concentrações de agentes desnaturantes. ....	17
<b>Figura 8:</b> Estrutura tridimensional da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 obtida por cristalografia e difração de raios-x (PDB ID 5G59).....	19
<b>Figura 9:</b> Figura 8: Estrutura cristalográfica da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 em sua forma monomérica, com as regiões que apresentam maior flutuação do RMS em destaque...	20
<b>Figura 10:</b> Localização das mutações W194A e F198A no provável subdomínio em tampa da lipase Pf2001 $\Delta$ 60. ....	21
<b>Figura 11:</b> Fluxograma da metodologia adotada para o estudo da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e mutantes racionais, W194A, F198A e W194A/F198A. ....	24
<b>Figura 12:</b> Sequências primárias das construções da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e dos mutantes racionais W194A, F198A e W194A/F198A. ....	26
<b>Figura 13:</b> Curva de calibração da cromatografia de Gel filtração. ....	29
<b>Figura 14:</b> Figura 12: Transformação em Rosetta (DE3) e DH5 $\alpha$ . ....	32
<b>Figura 15:</b> SDS-PAGE 15% da expressão e lise celular das lipases Pf2001 $\Delta$ 60 (selvagem) e dos mutantes W194A, F198A e W194A/F198A. ....	33
<b>Figura 16:</b> SDS-PAGE 15% da expressão do mutante F198A a 20°C (A) e 30°C (B) em meio LB. ....	34

<b>Figura 17:</b> SDS-PAGE 15% da expressão das lipases Pf2001 $\Delta$ 60 (A), W194A (B), - F198A (C) e W194A/F198A (D) em meio mínimo a 30°C. ....	36
<b>Figura 18:</b> SDS-PAGE 15% da lise celular da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 (A) e seus mutantes: W194A (B) e W194A/F198A (C). ....	38
<b>Figura 19:</b> SDS-PAGE 15% da purificação da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e dos mutantes F198A, W194A e W194A/F198A por cromatografia de afinidade a níquel.....	39
<b>Figura 20:</b> Cromatograma e SDS-PAGE 15% da purificação da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 (A) e do mutante W194A (B) através de cromatografia de exclusão molecular. ....	41
<b>Figura 21:</b> Atividades específicas das frações monoméricas das lipases Pf2001 $\Delta$ 60 (preto) e do mutante W194A (branco) na presença de substratos com variados tamanhos de cadeia carbônica.....	43
<b>Figura 22:</b> Avaliação de termoestabilidade das lipases Pf2001 $\Delta$ 60 e do mutante W194A. ....	44
<b>Figura 23:</b> A presença de cavidades na proteína Pf2001 $\Delta$ 60. ....	50



## Índice de Tabelas

**Tabela 1:** Principais reagentes utilizados no trabalho..... 23

**Tabela 2:** Proteínas utilizadas como padrão para o cálculo da curva de calibração da cromatografia de Gel filtração e a relação massa molecular vs. volume de eluição. .... 29

## Lista de abreviaturas

**BSA** – Albumina de soro bovino

**CD**- Dicroísmo Circular

**E. coli** – *Escherichia coli*

**IPTG** – Isopropiltiogalactosídeo

**LB** – Meio de cultivo Luria-Bertani

**MUF-hep** – 4-metil-umberil-heptanoato

***P. furiosus*** – *Pyrococcus furiosus*

**Pf2001Δ60** – Lipase Pf2001 de *Pyrococcus furiosus* sem os 20 primeiros aminoácidos da porção amino-terminal

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**TRX** – Cauda de fusão da tioredoxina A de *Escherichia Coli*

**TRX-Pf2001Δ60** – Lipase Pf2001 de *Pyrococcus furiosus* sem os 20 primeiros aminoácidos da porção amino-terminal fusionada a cauda de tioredoxina A de *Escherichia coli*.

# Sumário

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 – Enzimas e sua importância.....	1
1.2 – Lipases.....	3
1.3 – Aplicação industrial de lipases.....	4
1.3.1 - Detergentes .....	4
1.3.2 – Indústria alimentícia .....	4
1.3.3 – Química fina.....	5
1.3.4 – Indústria papelreira e couro.....	5
1.3.5 – Pré-tratamento de águas residuais .....	5
1.3.6 – Produção do biodiesel .....	6
1.3.7 – Outras aplicações .....	6
1.4 – Estrutura tridimensional das lipases.....	7
1.4.1 – Mecanismo catalítico .....	9
1.4.2 – Ativação interfacial e presença de tampa .....	11
1.5 – Organismos extremófilos .....	13
1.6 – <i>Pyrococcus furiosus</i> : organismo hipertermófilo.....	14
1.7 – Lipase Pf2001 $\Delta$ 60.....	15
1.8 – Estudos estruturais da lipase Pf2001 $\Delta$ 60.....	16
<b>2 - OBJETIVO .....</b>	<b>22</b>
2.1 - Objetivo geral .....	22
2.2 – Objetivos específicos .....	22
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>

3.1 – Material .....	23
3.1.1 – Cepas.....	23
3.1.2 – Reagentes .....	23
3.2 – Métodos.....	24
3.2.1 – Fluxograma da metodologia utilizada para o estudo da lipase selvagem e de seus mutantes W194A, F198A e W194A/F198A.....	24
3.2.2 – Construção das lipases Pf2001 $\Delta$ 60, W194A, F198A e W194A/F198A.....	25
3.2.3 – Transformação dos genes Pf2001 $\Delta$ 60-W194A, Pf2001 $\Delta$ 60-F198A e Pf2001 $\Delta$ 60-W194A/F198A .....	26
3.2.4 – Teste de expressão em meio LB para o mutante F198A .....	26
3.2.5 – Teste de expressão em meio M9 das lipases Pf2001 $\Delta$ 60, W194A, F198A e W194A/F198A .....	27
3.2.6 – Lise celular.....	28
3.2.7 – Purificação das Lipases selvagem e dos mutantes.....	28
3.2.8 – Dosagem de proteínas totais .....	29
3.2.9 - Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) .....	30
3.2.10 – Teste de atividade .....	30
3.2.11 – Ensaios de termoestabilidade.....	31
<b>4 – RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 – Transformação dos genes Pf2001 $\Delta$ 60-W194A, Pf2001 $\Delta$ 60-F198A e Pf2001 $\Delta$ 60-W194A/F198A em células competentes .....	32
4.2 – Expressão das lipases Pf2001 $\Delta$ 60 selvagem e dos mutantes: W194A, F198A e W194A/F198A .....	32

4.2.1 - Teste de expressão das lipases selvagem e mutantes em meio LB .....	33
4.2.2 – Expressão das lipases selvagem e mutantes em meio mínimo. ....	35
4.3 – Lise celular da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e dos mutantes W194A e W194A/ F198A.....	37
4.4 – Purificação da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e dos mutantes W194A, F198A e W194A/ F198A.....	38
4.5 – Atividade enzimática da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e do mutante W194A utilizando diferentes substratos.....	42
4.6 – Ensaio de termoestabilidade das lipases Pf2001 $\Delta$ 60 selvagem e do mutante W194A .....	43
<b>5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6 – CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

### *1.1 – Enzimas e sua importância*

Enzimas são macromoléculas que catalisam praticamente todas as reações químicas essenciais para os sistemas biológicos. Elas geralmente são proteínas, mas também podem ser compostas por moléculas de RNAs com atividade catalítica. Quando de origem proteica, as enzimas são compostas por resíduos de aminoácidos conectados através de ligações covalentes entre átomos de carbono e nitrogênio. O caráter planar dessas ligações restringe a mobilidade do esqueleto carbônico e as possíveis conformações de uma proteína, sendo estabilizadas por uma série de interações fracas que estabilizam a estrutura tridimensional. A estrutura terciária das enzimas varia enormemente, conforme a composição de aminoácidos, gerando enovelamentos característicos de cada classe enzimática e conferindo especificidade por diversos substratos. Embora ocorram diferenças na estrutura, todas as enzimas apresentam uma cavidade catalítica, o sítio ativo. Quando o substrato se liga a uma enzima, forma o complexo enzima-substrato, que após mudanças físico-químicas progressivas, é convertido em produto através de mecanismos enzimáticos. Além disso, várias interações não covalentes ocorrem no complexo enzima-substrato, liberando uma pequena quantidade de energia capaz de estabilizar o complexo, sendo esta, a principal fonte de energia livre utilizada pelas enzimas para diminuir a energia de ativação das reações (Gutterridge A, Thornton J. M., 2005).

As características da interação enzima-substrato são particulares para cada enzima. Algumas delas podem gerar modificações estruturais em regiões próximas, e até mesmo, distantes do sítio ativo que permitem que a enzima adquira a conformação específica para a formação do complexo. Dessa forma, as enzimas além de aumentarem a velocidade das reações enzimáticas, também possuem alta especificidade a substratos, atuando em condições de pH e temperatura ótima que variam de acordo com a sua estrutura e interação com o solvente. Na maioria dos organismos, as enzimas atuam em condições brandas de temperatura e pH, entretanto, em organismos extremófilos, elas atuam em condições extremas de acordo com o local onde o organismo está adaptado. Enzimas provenientes de organismos extremófilos possuem características de grande importância biotecnológica sendo amplamente utilizadas como biocatalisadores

industriais. Desde a antiguidade o homem utiliza enzimas em processos produtivos. Mesmo que de forma impura e não caracterizada, através de preparações animais ou vegetais e extratos de microrganismos, as enzimas foram utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas, queijos, couros e vinagre (Gurung *et al.*, 2013, Kirk *et al.*, 2002, Salihu *et al.*, 2012). O desenvolvimento dos processos de fermentação voltados para a produção de enzimas, durante a última metade do século XX, utilizando cepas selecionadas, tornou possível a obtenção de maiores quantidades de enzimas. Além disto, o surgimento das técnicas de purificação proporcionou a caracterização das enzimas. Esses avanços permitiram a introdução das enzimas em produtos e processos industriais, como na indústria de detergentes, têxtil e de amido. Posteriormente, a utilização da tecnologia do DNA recombinante aprimorou o processo de produção de enzimas e permitiu a utilização e a customização de enzimas que antes não poderiam ser produzidas em quantidade para determinado bioprocessos (Davids, 2013, Gurung *et al.*, 2013, Kirk *et al.*, 2002, Gurung *et al.*, 2013).

A utilização de enzimas como catalisadores de reações em processos produtivos conquistou rapidamente o interesse do setor industrial devido ao menor tempo de reação, alta especificidade, baixo custo energético necessário, além de menor toxicidade dos subprodutos e menor impacto ambiental gerado pelo processo (Choi *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2012).

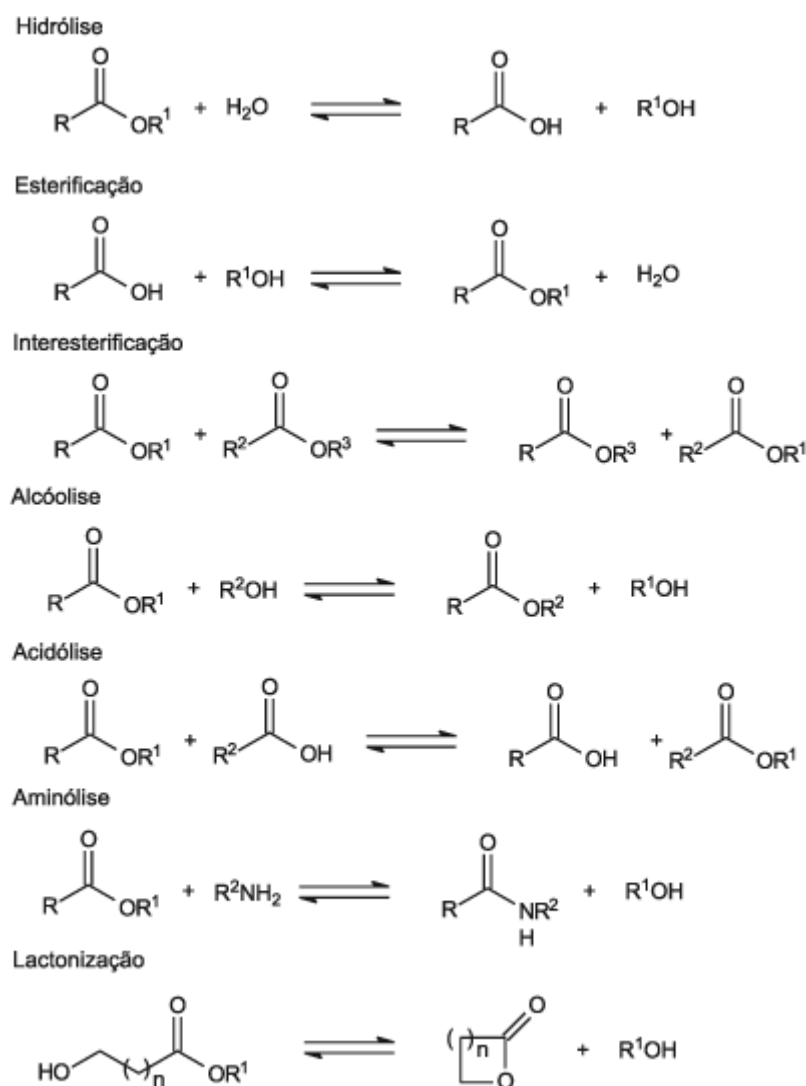
Desta forma, com características cada vez mais específicas e direcionadas, as enzimas vêm sendo utilizadas para diversos bioprocessos de diferentes setores industriais. Atualmente cerca de 4000 enzimas são descritas na literatura, entre as quais 200 são comercializadas na sua forma selvagem (Li *et al.*, 2012).

Em 2014, o mercado global de enzimas com aplicação industrial foi estimado no valor aproximado de US\$ 4, 2 bilhões com expectativa de taxa de crescimento anual de aproximadamente 7% nos próximos anos, atingindo o valor de US\$ 6.2 bilhões em 2020 (*Industrial Enzyme Market 2015*). A demanda do mercado de enzimas é suprida por 12 grandes produtores e 400 fornecedores de menor porte. Apenas três empresas (Novozymes, DuPont e Roche) dominam 75% das enzimas produzidas no mundo (Li *et al.*, 2012).

Enzimas hidrolíticas são maioria em termos de biocatalisadores industriais, dentre elas, as classes mais utilizadas são as carboidrases, proteases e lipases, que dominam o mercado com mais de 70% da representação de vendas (Li *et al.*, 2012).

## 1.2 – Lipases

Lipases (triacilglicerol ester hidrolases, EC 3.1.1.3) são uma classe de hidrolases presentes em todos os domínios da vida, cuja função natural é catalisar a hidrólise de ligações éster de óleos e gorduras para formar diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos em meio aquoso. Entretanto, em meio orgânico, esses polipeptídeos podem catalisar reações de síntese, como esterificação, transesterificação, acidólise, alcoólise, entre outras (Figura 1). As lipases podem atuar em condições brandas de reação, são estáveis em solventes orgânicos, possuem afinidade a uma gama de substratos, além de apresentarem régio e/ou estereoespecificidade como catalisadores (AnoBom *et al.*, 2014).



**Figura 1: Reações catalisadas pelas lipases (PAQUES E MACEDO, 2006).**



As lipases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e três moléculas de ácido graxo em solvente aquoso. Em solvente orgânico outras reações podem ser catalisadas como esterificação, transesterificação entre outras.

A capacidade das lipases em catalisar uma gama de reações com alta eficiência e estabilidade, associada à questão de não necessitarem de cofatores, e principalmente, possuírem atividade em meios orgânicos, são características atraentes para a indústria, fazendo com que estas enzimas, sejam utilizadas como biocatalisadores em diversos processos, possuindo assim, diversas aplicações industriais (Daiha *et al.*, 2015).

### *1.3 – Aplicação industrial de lipases*

Como descrito anteriormente, as lipases estão entre um dos maiores grupos de enzimas comercializadas com aplicação em bioprocessos industriais (Casas-godoy *et al.*, 2012). Diversas aplicações estão descritas abaixo:

#### *1.3.1 - Detergentes*

A indústria de detergentes é o setor onde ocorre a maior utilização de lipases como biocatalisadores (Anobom *et al.*, 2014). A maioria dos detergentes disponíveis em países desenvolvidos contém lipases, melhorando sua capacidade de remover manchas de óleos e gorduras, além de torná-los menos poluentes (Sharma e Kanwar, 2014).

As lipases destinadas a esse setor possuem atividade e estabilidade em pH alcalino e temperaturas acima de 40°C e compatibilidade com diferentes componentes presentes no detergente, como íons metálicos, oxidantes, surfactantes e proteases, assim como alta especificidade ao substrato (Anobom *et al.*, 2014).

#### *1.3.2 – Indústria alimentícia*

A aplicação na indústria de alimentos inclui a fabricação de laticínios, tais como queijos, modificações de óleos e gorduras, como na manufatura de manteigas e margarinas e produção de alimentos destinados a bebês e crianças, que necessitam de propriedades específicas. Lipases também são utilizadas nesse setor como emulsificantes para massas em geral, componentes flavorizantes e aromatizantes, assim como aditivos em ração animal (Casas-godoy *et al.*, 2012).

### 1.3.3 – Química fina

O uso de lipases na indústria de química fina vem apresentando crescimento considerável nos últimos anos. Além de catalisarem reações de hidrólise regioseletiva, acilação e transesterificação, uma variedade de processos enantiosseletivos vem sendo relatados, um aspecto interessante para o setor farmacêutico. Estas hidrolases catalisam reações sobre substratos pró-quirais e resolução cinética de misturas racêmicas (Jaeger, Dijkstra, Reetz, 1999, Jaeger, Eggert, 2002). Na área médica, as lipases têm função terapêutica, no controle das taxas de colesterol e auxiliar digestivo, além de funcionarem como ferramenta de diagnóstico para possíveis infecções ou doenças (Casas-godoy *et al.*, 2012).

### 1.3.4 – Indústria papaleira e couro

Outra aplicação para essas enzimas diz respeito à remoção de triglicerídeos e ceras da pasta de celulose produzida pelo setor de papel e celulose. Esse método, utilizado desde os anos 90, contribui para a otimização do processo, diminuição do impacto ambiental e aumenta a brancura do papel produzido (Andualema e Gessesse, 2012, Anobom *et al.*, 2014, Casas-Godoy *et al.*, 2012, , Sharma e Kanwar, 2014).

As lipases também podem ser utilizadas para remoção de gorduras e graxas de peles e couros, gerando um produto de alta qualidade (Andualema e Gessesse, 2012, Anobom *et al.*, 2014).

### 1.3.5 – Pré-tratamento de águas residuais

A aplicação de lipases no tratamento de águas residuais possibilita a redução do diâmetro de partículas de gordura e proteínas, contidas no efluente. A diminuição do tamanho de partícula aumenta a superfície de contato, permitindo maior eficiência e rapidez durante o tratamento biológico desses resíduos. Entretanto, é de extrema importância que as preparações enzimáticas possuam baixo custo a fim de viabilizar sua aplicação (Anobom *et al.*, 2014).

### 1.3.6 – Produção do biodiesel

Biodiesel é o termo comumente utilizado para designar os ésteres de ácidos graxos e álcoois de cadeia curta, produzidos a partir de fontes biológicas renováveis (Bautista *et al.*, 2015). As lipases são utilizadas tanto para catalisar a reação de transesterificação de triglicerídeos quanto a de esterificação de ácidos graxos com álcoois (Yan *et al.*, 2014). A produção de biodiesel catalisada por lipases é realizada por vários grupos de pesquisa utilizando como matéria prima gordura animal, óleo vegetal, óleo de cozinha usado e resíduos ácidos da produção de óleos vegetais, mostrando em geral, conversão na faixa de 90% (Anobom *et al.*, 2014). A produção enzimática do biodiesel permite a utilização de triglicerídeos com elevado teor de ácidos graxos livres, quantidades mais elevadas de água, e necessita de menos operações posteriores para recuperar o álcool que não reagiu e o subproduto glicerina (Yan *et al.*, 2014). Entretanto, a aplicação em larga escala de processos enzimáticos para a síntese de biodiesel é pouco frequente, devido ao maior tempo de reação requerido, ao elevado custo das lipases e a sua fácil inativação, o que impede sua reutilização (Aransiola *et al.*, 2014, Gog *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2011). Para resolver estes problemas, estratégias vêm sendo desenvolvidas para gerar lipases mais baratas e estáveis, tais como técnicas de imobilização, expressão heteróloga, utilização de lipases estáveis em álcoois de cadeia curta e engenharia de proteínas (Bisen *et al.*, 2010, De-Andrade, 2016, Robles-Medina, 2009).

### 1.3.7 – Outras aplicações

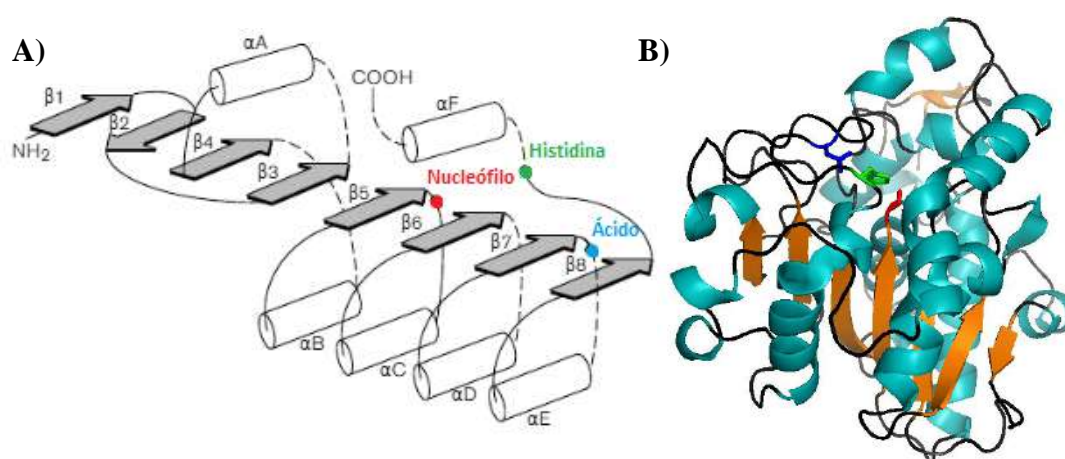
Existem ainda, diversas outras aplicações para lipases, que incluem a produção de biopolímeros, desenvolvimento de biosensores, na indústria têxtil para remoção de lubrificantes e lavagem de jeans e produção de biolubrificantes (Andualema e Gessesse, 2012, Anobom *et al.*, 2014, Casas-Godoy *et al.*, 2012).

Devido à importância das lipases nos mais variados bioprocessos descritos acima, muitos estudos têm como objetivo compreender, racionalmente, a forma como estas enzimas atuam a nível molecular e atômico. Sendo assim, desde o projeto BRIDGE-T (1990-1994) até hoje, diversas estruturas tridimensionais de lipases vêm sendo determinadas (Anobom *et al.*, 2014; De-Andrade, 2016).

## 1.4 – Estrutura tridimensional das lipases

Apesar de apresentarem baixa similaridade de sequência primária, as lipases possuem características estruturais muito semelhantes, pertencendo à família das  $\alpha/\beta$  hidrolases (Anobom *et al.*, 2014). Este enovelamento, descrito pela primeira vez por Ollis *et al.* em 1992, foi identificado através da comparação de diferentes enzimas hidrolíticas com funções catalíticas completamente distintas. Embora essas enzimas não apresentassem nenhuma similaridade de sequência relevante, não operassem com os mesmos substratos ou utilizassem o mesmo nucleófilo, a similaridade de sequência extrema associada ao arranjo de resíduos catalíticos preservados sugeriam que haviam evoluído de um ancestral em comum (Nardini e Dijkstra, 1999). Posteriormente, outras enzimas foram caracterizadas com o enovelamento  $\alpha/\beta$  hidrolase, como as lipases, esterases, proteases, desalogenases, epóxido hidrolases e peroxidases (AnoBom *et al.*, 2014, Lenfant *et al.*, 2012).

O enovelamento  $\alpha/\beta$  hidrolases canônico é caracterizado pela presença de uma folha  $\beta$  central contendo sete fitas  $\beta$  paralelas uma fita  $\beta$  antiparalela (fita  $\beta_2$ ). A folha  $\beta$  central apresenta uma torção à esquerda, formando um ângulo de  $90^\circ$  entre a primeira e última fita. As fitas  $\beta_3$  a  $\beta_8$  estão conectadas por um conjunto de  $\alpha$ -hélices, as hélices A e F empacotam a folha  $\beta$  pelo lado côncavo e as hélices B, C, D e E, pelo lado convexo (Figura 2) (Anobom *et al.*, 2014, De-Andrade, 2016, Jaeger *et al.*, 1999, Nardini e Dijkstra 1999,).



**Figura 2:** Esquema do enovelamento  $\alpha/\beta$  hidrolase característico das lipases e representado pela estrutura tridimensional da lipase B de *Candida antarctica*.

A) Representação do enovelamento  $\alpha/\beta$  hidrolase. As  $\alpha$ -hélices são indicadas por cilindros e as fitas  $\beta$  por setas. Os resíduos do sítio ativo estão indicados por círculos coloridos: o nucleófilo é o resíduo após a fita

$\beta$ 5 (em vermelho), o resíduo ácido está após a fita  $\beta$ 7 (em azul), e o resíduo de histidina está na alça entre a fita  $\beta$ 8 e a hélice  $\alpha$ F (em verde) (adaptado de Jaeger *et al.*, 1999). B) Estrutura tridimensional da lipase B de *Candida antarctica*, obtida por cristalografia de raio X. As  $\alpha$ -hélices podem ser observadas em ciano, as fitas- $\beta$  em laranja, as voltas em preto e a tríade catalítica está colorida como em A (PDB 1TCA) (De-Andrade, 2016, Uppenberg *et al.*, 1994).

O sítio ativo das  $\alpha/\beta$  hidrolases é composto por uma tríade catalítica altamente conservada: um resíduo nucleofílico, um resíduo ácido e uma histidina. Nas lipases o resíduo nucleofílico é sempre representado por uma serina (Figura 2 A) (Anobom *et al.*, 2014, Bornscheuer *et al.*, 2002, Jaeger *et al.*, 1999).

O resíduo nucleofílico está localizado na região conhecida como “cotovelo nucleofílico”, formada pelo pentapeptídeo conservado **Sm-X-Nu-X-Sm**, no qual:

**Sm** - Resíduo pequeno, geralmente uma glicina, podendo ocasionalmente ser substituída por alanina, valina, serina ou treonina

**X** - Qualquer resíduo

**Nu** – Resíduo nucleofílico

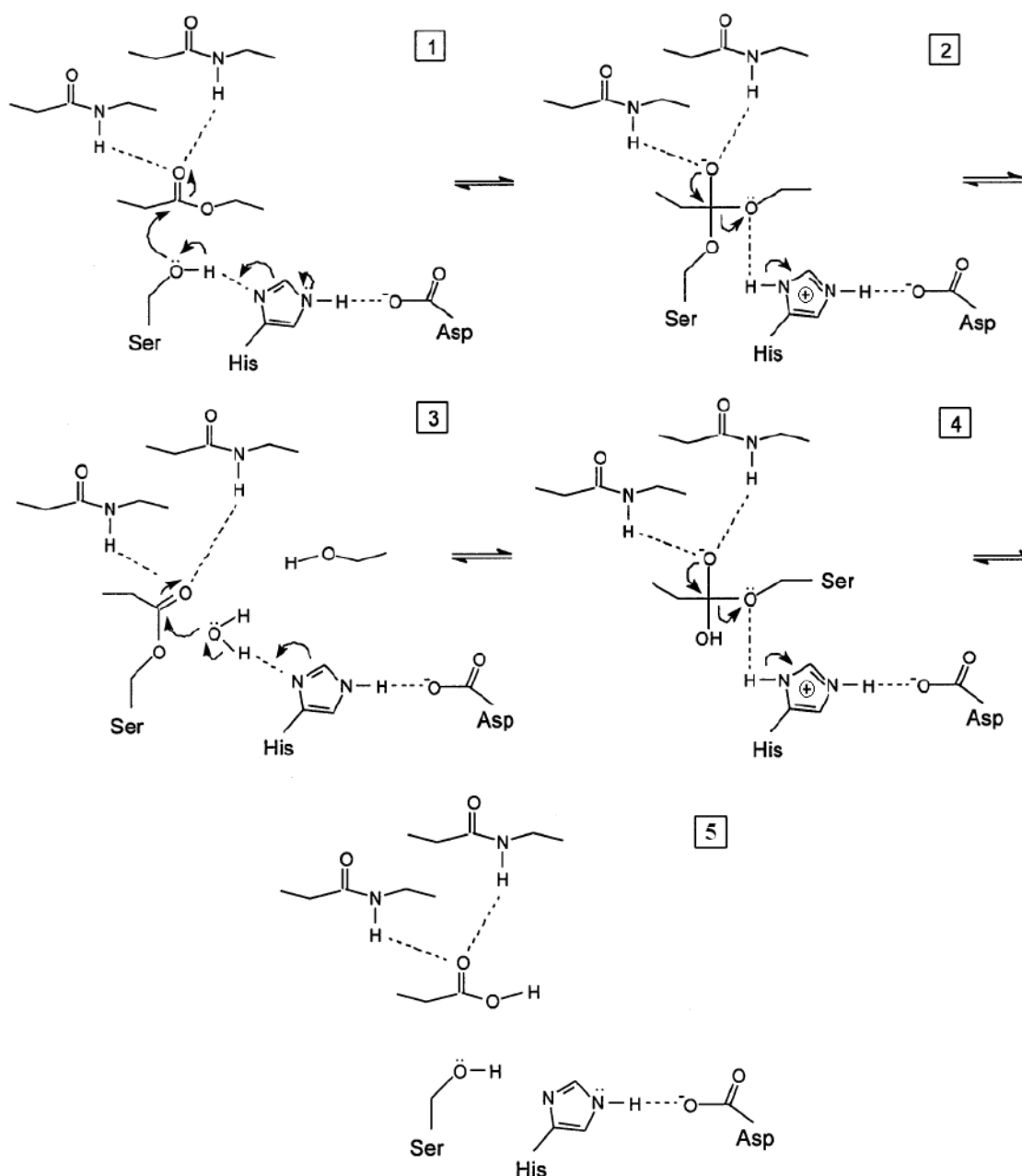
A conformação deste motivo de fita-alça-hélice leva o resíduo nucleofílico a adotar uma conformação energeticamente desfavorável segundo os ângulos de diedro da cadeia principal, o que acaba gerando impedimento estérico devido aos resíduos próximos a essa região (Anobom *et al.*, 2014, Jaeger *et al.*, 1999, Nardini e Dijkstra, 1999, Ollis *et al.*, 1992). Esse arranjo permite que o resíduo nucleofílico tenha acesso facilitado à histidina catalítica por um lado e ao substrato pelo outro (Jaeger *et al.*, 1999; Nardini e Dijkstra, 1999). O "cotovelo nucleofílico" é a característica estrutural mais conservada no enovelamento  $\alpha/\beta$  hidrolase, e pode ser usado como um ponto de fixação para sobreposição de estruturas com o mesmo tipo de enovelamento (Heikinheimo *et al.*, 1999).

O resíduo ácido do sítio catalítico geralmente é encontrado em uma alça reversa após a fita  $\beta$ 7 (Figura 2A), sendo capaz de interagir com a histidina catalítica através de uma ligação de hidrogênio. Entretanto, em algumas enzimas, é possível observar o resíduo ácido após a fita  $\beta$ 6 (Nardini e Dijkstra, 1999, Ollis *et al.*, 1992).

A histidina é o único resíduo absolutamente conservado da tríade catalítica, podendo ser encontrado no loop após a fita  $\beta 8$ , última fita do enovelamento. Esse loop possui tamanho e forma variados de acordo com cada proteína pertencente à família das  $\alpha/\beta$  hidrolases (Nardini e Dijkstra, 1999, Ollis et al., 1992) .

#### 1.4.1 – Mecanismo catalítico

As serino hidrolases, onde estão incluídas as lipases, esterases e serino-proteases, catalisam as reações de forma similar. O mecanismo é iniciado por uma reação de acilação. Nesta etapa, a nucleofilicidade da serina é reforçada pela histidina catalítica, a quem um próton do grupo hidroxila da serina é transferido. A transferência do próton é facilitada pela presença do ácido catalítico que orienta precisamente o anel imidazólico da histidina e neutraliza parcialmente a carga que se desenvolve sobre ele. Como consequência, o átomo de oxigênio do grupo hidroxila da serina catalítica realiza o ataque nucleofílico sobre o grupo carbonila do substrato (Figura 3 - 1). O primeiro intermediário tetraédrico é formado com uma carga negativa no átomo de oxigênio do grupo carbonila (oxiânion). A cavidade de oxiânion estabiliza a carga e reduz a energia do intermediário tetraédrico através da formação de, pelo menos, duas ligações de hidrogênio entre o oxiânion e grupos amino da cadeia principal da enzima (Figura 3 - 2). Em seguida, o próton é doado para o oxigênio do éster da ligação suscetível, que é então clivada. Nesta fase, o componente ácido do substrato é esterificado pela serina nucleofílica, formando-se assim o intermediário acil enzima, enquanto o componente álcool é difundido (Figura 3 - 3). Posteriormente, ocorre o passo de desacilação, em que a molécula de água (ou outro nucleófilo) hidrolisa o intermediário acil enzima. Ele inicia com a histidina catalítica ativando a molécula de água, através da extração de um próton. O íon hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico no átomo de carbono do grupamento acila ligado covalentemente à serina (Figura 3 - 3). Novamente, um intermediário tetraédrico com carga negativa é formado e estabilizado através de interações com a cavidade de oxiânion. Em seguida, a histidina catalítica doa um próton para o átomo de oxigênio do resíduo de serina ativa, que então libera o componente acila (Figura 3 - 4). Após a difusão do produto acila, a enzima está pronta para mais uma rodada de catálise (Figura 3 - 5) (Casas-Godoy *et al.*, 2012, Jaeger *et al.*, 1999).



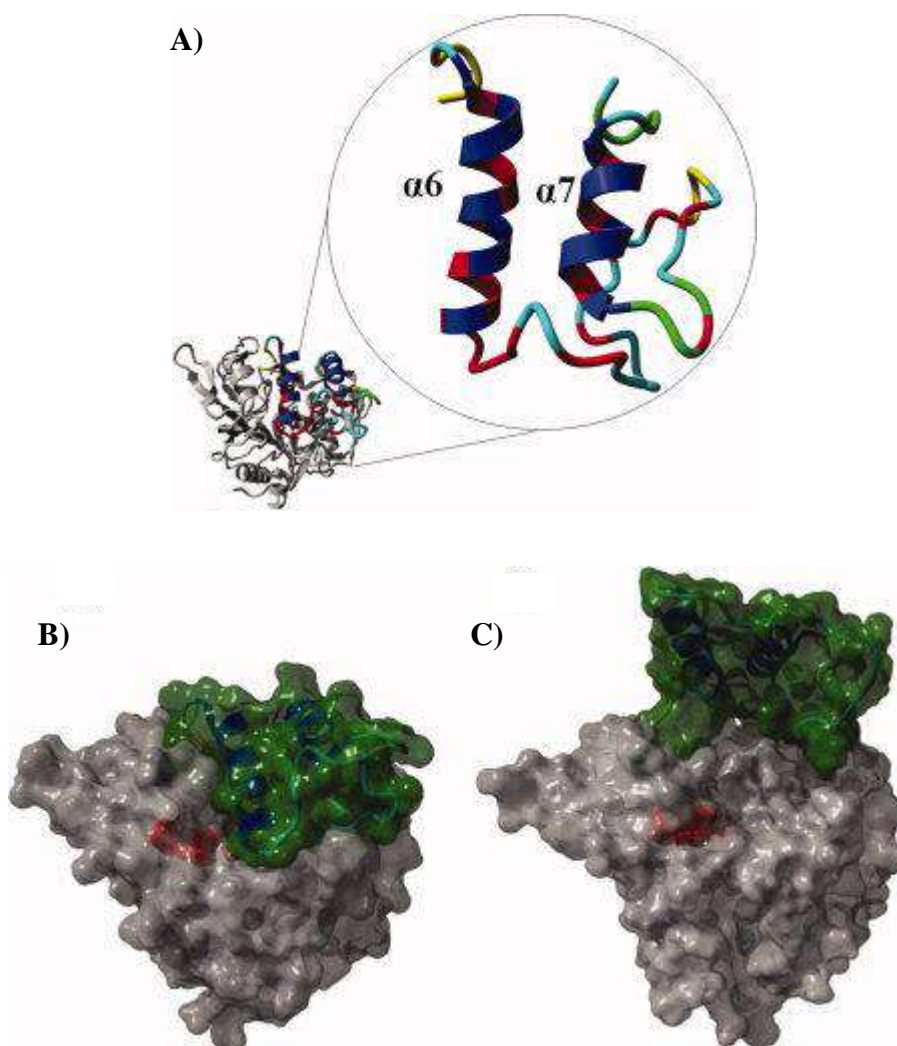
**Figura 3: Mecanismo catalítico das serino hidrolases.**

[1] Ligação do substrato, ativação do resíduo de serina nucleofílica pela histidina vizinha e ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila pela serina O<sup>-</sup>; [2] Intermediário tetraédrico transiente, com O<sup>-</sup> estabilizado por interações com os dois grupos NH da cavidade de oxianion. A histidina doa um próton para a saída do componente álcool do substrato; [3] O intermediário acil enzima em que o componente ácido do substrato é esterificado pelo resíduo de serina da enzima. A molécula de água que entra é ativada pelo resíduo de histidina vizinho, e o íon hidroxila resultante executa um ataque nucleofílico sobre o átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente. [4] O resíduo de histidina doa um próton para o átomo de oxigênio do resíduo de serina ativa, a ligação éster entre a

serina e o componente acila é quebrada. [5] O produto acil é liberado e a enzima está pronta para mais uma rodada de catálise (modificado de Jaeger *et al.*, 1999).

#### 1.4.2 – Ativação interfacial e presença de tampa

Muitas lipases apresentam um subdomínio móvel, também conhecido como “tampa”, capaz de controlar o acesso de moléculas de substrato ao sítio ativo. Estruturas cristalográficas mostram que existem duas conformações possíveis para esse subdomínio, aberta e fechada (Figura 4) (Anobom *et al.*, 2014). A conformação fechada é considerada predominante em meio aquoso, onde o sítio ativo permanece inacessível ao solvente e nesse estado a enzima exibe baixa atividade. A abertura da tampa normalmente expõe o sítio ativo, revelando uma superfície hidrofóbica, o que cria uma região de ancoramento para o substrato lipídico em torno do sítio ativo (Anobom *et al.* 2014, Bordes *et al.*, 2010).



**Figura 4:** Subdomínio em tampa da lipase T1 de *Geobacillus zalihae*.



Em (A) podemos observar que o domínio tampa é formado pelas alfa-hélice 6 e 7 concetadas por um *loop*, formando um motivo hélice-*loop*-hélice. Os resíduos hidrofóbicos do domínio tampa estão coloridos de vermelho. Em (B) temos a visão da conformação fechada do domínio tampa da lipase T1 e em (C), a conformação aberta do domínio tampa da lipase. A região da tampa pode ser observada em verde e a região do sítio ativo, em vermelho (adaptado de Rahman *et al.*, 2012).

A mudança conformacional da tampa fornece uma explicação estrutural para o fenômeno da ativação interfacial apresentado por algumas lipases (Nardini e Dijkstra, 1999). A ativação interfacial consiste em um aumento significativo da atividade enzimática quando a concentração de substrato ultrapassa o limite de solubilidade, ou seja, quando o substrato forma uma interface hidrofóbica (Jaeger *et al.*, 1999). Entretanto, os mecanismos de ativação que levam à movimentação da tampa e suas transições conformacionais ainda permanecem pouco compreendidos (Anobom *et al.*, 2014). Técnicas de cristalografia e difração de raio X permitem identificar a presença desses subdomínios móveis, entretanto pouco contribuem a respeito da dinâmica estrutural da enzima (Barbe *et al.*, 2011, Bordes *et al.*, 2010). Embora a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) seja capaz de determinar a estrutura e dinâmica de proteínas em solução, esta apresenta limitações para proteínas com elevada massa molecular e tendência à formação de oligômeros, a exemplo da maioria das lipases (Anobom *et al.*, 2014).

Neste caso, para entender o funcionamento das mudanças conformacionais em sistemas macromoleculares, ferramentas computacionais como simulação de dinâmica molecular têm sido cada vez mais utilizada em associação aos estudos experimentais (Anobom *et al.*, 2014, De- Andrade, 2016).

A conformação da tampa e seus estados de transição, associados ao comportamento anfipático dessa região e sua sequência específica exercem um papel essencial na atividade e especificidade das lipases (Barbe *et al.*, 2009). Estudos mostram que mutações realizadas na região da tampa podem aumentar a atividade enzimática, alterar a seletividade ao substrato e aumentar a termoestabilidade das lipases (Gao *et al.*, 2011, Karkhane *et al.*, 2009, , Santarossa *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2012).

## 1.5 – Organismos extremófilos

Extremófilos são organismos que apresentam um crescimento ótimo em condições extremas de temperatura, pH, pressão hidrostática ou salinidade. A maioria das espécies desse grupo pertence ao reino Archaea, entretanto, também existe um número considerável de membros no reino Bacteria. Em todo caso, independente da sua classificação filogenética, os extremófilos são organizados de acordo com o ambiente ao qual estão adaptados, sendo divididos em grupos como termófilos, hipertermófilos, psicrófilos, halófilos, acidófilos e alcalófilos. Cada vez mais os extremófilos têm sido estudados com o objetivo de se entender os mecanismos que permitem a vida em condições adversas.

Embora os extremófilos possuam diversas adaptações para manter a homeostase no ambiente em que vivem, o maior enfoque biotecnológico está nas enzimas de termófilos. Estas proteínas, geralmente, apresentam propriedades interessantes para a indústria, como: estabilidade a temperaturas elevadas e a desnaturantes químicos (detergentes, pHs extremos, agentes caotrópicos, solventes orgânicos). Além disso, aumentar a temperatura das reações enzimáticas permite uma maior concentração de substrato solúvel, diminuição da viscosidade do solvente, menor risco de contaminação por microrganismos, e frequentemente, aumenta as taxas de conversão enzimática via catálise (relação de Arrhenius) (Elleuche *et al.*, 2014). Sendo assim, as enzimas de extremófilos, também conhecidas como extremozimas, podem suprir a necessidade da indústria moderna por biocatalisadores mais robustos para substituir os antigos catalisadores químicos que não atendem a crescente preocupação com o meio-ambiente (Konazycka-Bessler, Jaeger, 2006).

Muitos biocatalisadores oriundos de organismos extremófilos já são utilizados na indústria e em biotecnologia, sendo os de termófilos e os psicrófilos os mais empregados. Enzimas como  $\alpha$ -amilases, xilanases e proteases de termófilos são bastante usadas em processos industriais como a hidrólise de amido para produção de dextrina, maltodextrinas e xaropes de milho, o branqueamento de papel, o processamento de alimentos e a produção de detergentes.

O uso dessas enzimas confere vantagens aos processos como maior estabilidade térmica e a meios ácidos, menor degradação ao longo do tempo e economia no uso de outros reagentes como branqueadores. Proteases, amilases e lipases de organismos

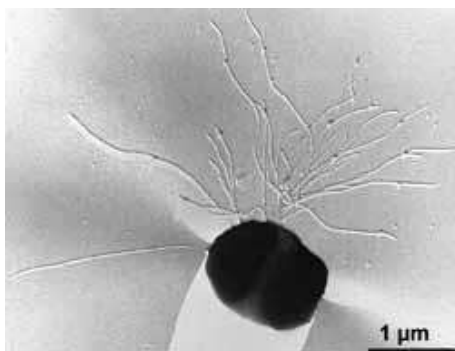
psicrófilos também são bastante empregadas na maturação de queijos, como biosensores e limpeza em baixas temperaturas, com destaque aos detergentes (Elleuche *et al.*, 2014, Siddiqui, 2015). Os organismos psicrotolerantes, que suportam baixas temperaturas, embora não possuam seu crescimento ótimo sob tais condições, também possuem enzimas bastante utilizadas. Podemos citar a lipase B de *Candida antarctica*, uma enzima com elevado grau de regioseletividade e enantioseletividade, tanto na hidrólise quando na síntese, que aceita uma ampla especificidade de substratos. Essa enzima se tornou um dos biocatalisadores mais utilizados em processos como resolução racêmica de álcoois, aminas e ácido ou na resolução de compostos opticamente ativos (Kirk, Wu, 2002).

### 1.6 – *Pyrococcus furiosus*: organismo hipertermófilo

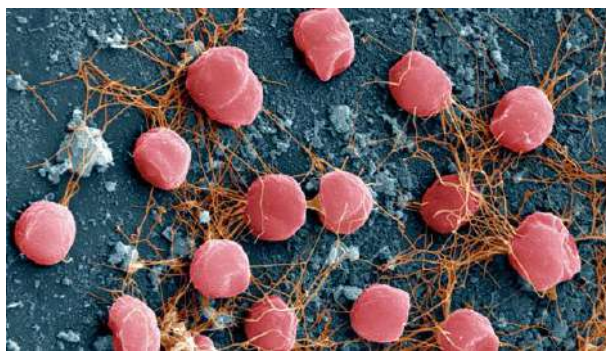
Como descrito, alguns ambientes apresentam condições muito além das consideradas ótimas para manutenção da vida. Entretanto, alguns microrganismos podem ser encontrados em condições extremas, por isso, classificados como extremófilos (Cavicchioli *et al.*, 2011). Normalmente, proteínas isoladas de organismos extremófilos apresentam alta estabilidade e resistência frente a agentes desnaturantes químicos, solventes orgânicos e condições extremas de pH e temperatura (Fujinami and Fujisawa, 2010, Fuciños *et al.*, 2012, Purohit e Singh, 2013, Sharma *et al.*, 2012, Wende *et al.*, 2010;), e consequentemente, possuem grande apelo biotecnológico.

A arquea hipertermofílica *Pyrococcus furiosus* foi isolada de sedimentos marinhos aquecidos geotermicamente na praia de *Porto di Levante*, Vulcano, Itália no ano de 1986 (Fiala e Stetter, 1986). Suas células são esféricas (0,8 a 2,5 µm de diâmetro), apresentam flagelos e possuem metabolismo heterotrófico e estritamente anaeróbico (Figura 5). A temperatura de crescimento pode variar de 70 a 103°C e o pH na faixa de 5,0 a 9,0. Além disso, o crescimento também é possível em concentrações de NaCl na faixa de 0,5 a 5% . Contudo a temperatura e pH ótimos de crescimento são descritos como 100°C e 7,0, respectivamente. Ao longo do crescimento, podemos observar a formação de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, entretanto, a presença de H<sub>2</sub> pode gerar inibição do crescimento celular. Dessa forma, o organismo reduz S<sub>0</sub> para H<sub>2</sub>S, como o que seria uma forma de desintoxicação. É um organismo Gram negativo, contendo duas glicoproteínas no envelope celular. (Fiala e Stetter, 1986).

A)



B)



**Figura 5: Ilustrações da Arquea hipertermofílica *Pyrococcus furiosus*.**

(A) Microscopia eletrônica de uma célula de *Pyrococcus furiosus* (<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pyrococcus> - acessado em 17/01/2017).

(B) Ilustração de uma célula de *Pyrococcus furiosus* (<https://www.novinky.cz/domaci/297514-archebakterie-je-schopna-produkovat-pohonne-hmoty-ze-vzduchu.htm> - acessado em 17/01/2017).

O *Pyrococcus furiosus* é uma das arqueas hipertermofílicas mais estudadas, já que as proteínas deste organismo são extremamente termoestáveis e altamente resistentes a desnaturantes químicos, solventes orgânicos e à digestão proteolítica (Lee *et al.*, 2008).

Desta forma, a prospecção de uma nova lipase foi realizada utilizando este organismo extremófilos (Almeida, 2006).

### 1.7 – Lipase Pf2001Δ60

Inicialmente, uma busca comparativa por bioinformática foi realizada e o gene Pf2001 de *Pyrococcus furiosus* foi identificado, conforme descrito por Almeida *et. al.*, 2006. O gene encontrado mostrou uma similaridade de 60% com a sequência da esterase hipotética, 2-acetil-1-alquilglicerofosfocolina de *Pyrococcus abyssi*, utilizada como base para a busca. Em seguida, as regiões promotoras e terminadoras do gene foram definidas, e este foi analisado *in silico*, onde foram encontrados domínios conservados da família das  $\alpha/\beta$  hidrolases, dipeptidil aminopeptidases, esterases e lipases. Análises de bioinformática revelaram que os 60 primeiros nucleotídeos da sequência primária codificavam aminoácidos apolares, sugerindo que esta região fazia parte do peptídeo sinal. Assim, para a clonagem da lipase, esses nucleotídeos foram deletados da sequência (Pf2001Δ60), com o objetivo de facilitar a expressão solúvel da

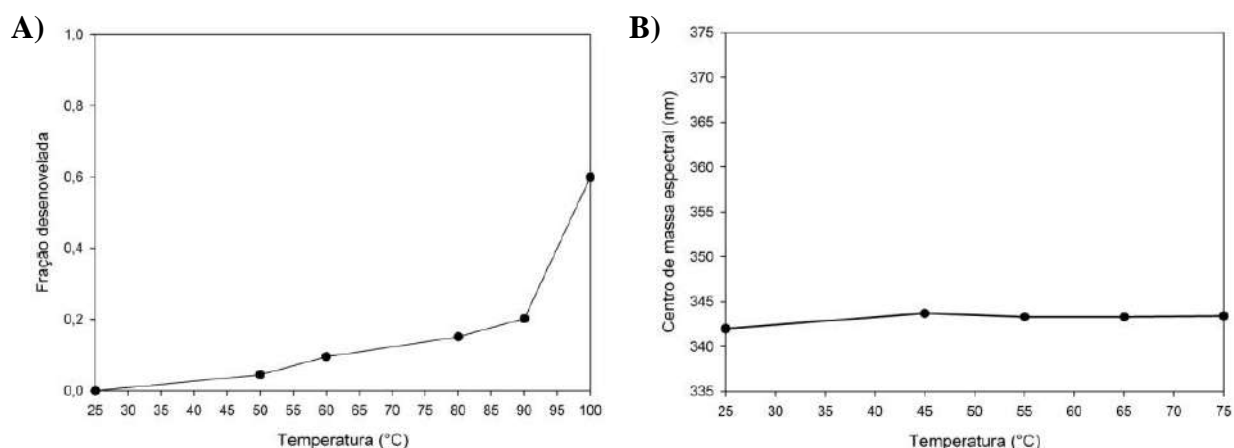
proteína (Almeida *et al.*, 2006). O gene resultante foi clonado no plasmídeo pET 32a fusionado à proteína tioredoxina, e também ao pET25b que fusiona somente a cauda de histidina a proteína. Após a etapa de purificação, a proteína foi caracterizada, mostrando pH ótimo em torno de 7,0 e atividade ótima na temperatura de 80°C (Alquéres *et al.*, 2011).

Os resíduos da tríade catalítica da lipase Pf2001Δ60 foram determinados através de técnicas de modelagem, utilizando como molde o domínio catalítico da proliloligo peptidase muscular de *Sus scrofa* (Fülöp *et al.*, 1998), como sendo a serina 149, o ácido aspártico 233 e a histidina 264 (Almeida *et al.*, 2006).

### *1.8 – Estudos estruturais da lipase Pf2001Δ60*

A determinação estrutural é de grande interesse em termos de desenvolvimento de novos biocatalisadores. Sendo assim, proteínas com estruturas determinadas podem ter suas características melhoradas para exibir maior estabilidade, atividade catalítica, ou até mesmo, novas funções (De Andrade, 2016, Floudas *et al.*, 2005). Nesse contexto, estudos estruturais e de dinâmica foram realizados pelo nosso grupo, para entender a estabilidade e o mecanismo adotado pela lipase Pf2001Δ60 durante sua função biológica em elevadas temperaturas (De Andrade, 2016).

Ao final da etapa de clonagem, expressão e purificação, estudos de caracterização da estrutura secundária e terciária da enzima frente à desnaturantes químicos e físicos foram realizados, por meio das técnicas de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência. Os estudos de termoestabilidade revelaram que os conteúdos de estrutura secundária e terciária não sofrem variação significativa na faixa de temperatura de 25 a 75°C (Figura 6) (Varejão, 2010, De Andrade, 2016).

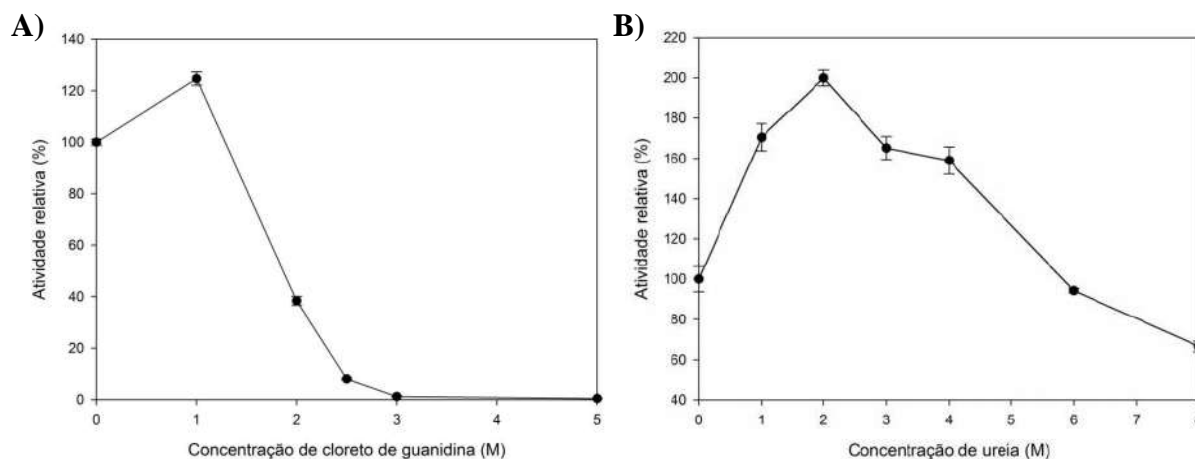


**Figura 6: Desnaturação térmica da lipase Pf2001Δ60.**

A) Gráfico mostrando a fração desenovelada da lipase Pf2001Δ60 por dicroísmo circular em 221 nm.

B) Centro de massa espectral de emissão da fluorescência intrínseca da lipase Pf2001Δ60 ( $\lambda_{Exc} = 280$  nm;  $\lambda_{Em} = 300-420$  nm). Os experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH = 7. As concentrações de proteína utilizadas foram de 3  $\mu$ M para a espectroscopia de dicroísmo circular e de 1  $\mu$ M para a espectroscopia de fluorescência. O tempo de incubação em cada temperatura foi de 10 minutos (De Andrade, 2016).

Os estudos de estabilidade estrutural da enzima frente a agentes desnaturantes revelaram que a lipase Pf2001Δ60 apresenta elevada estabilidade na presença destes agentes caotrópicos. Os resultados obtidos mostraram que a proteína possui elevada estabilidade a ureia  $[U]_{1/2} = 7,1$  M (concentração de ureia capaz de gerar metade da transição) e uma estabilidade menor frente a guanidina  $[G]_{1/2} = 2,3$  M (dados não mostrados) (Varejão, 2010). Os ensaios de atividade enzimática nas mesmas condições evidenciaram ativação em concentrações de 1 a 4 M de ureia, enquanto, que em cloreto de guanidina, apesar de também apresentar ativação em 1 M deste agente, a estabilidade da enzima mostrou-se significativamente menor (Figura 7) (De Andrade, 2016).

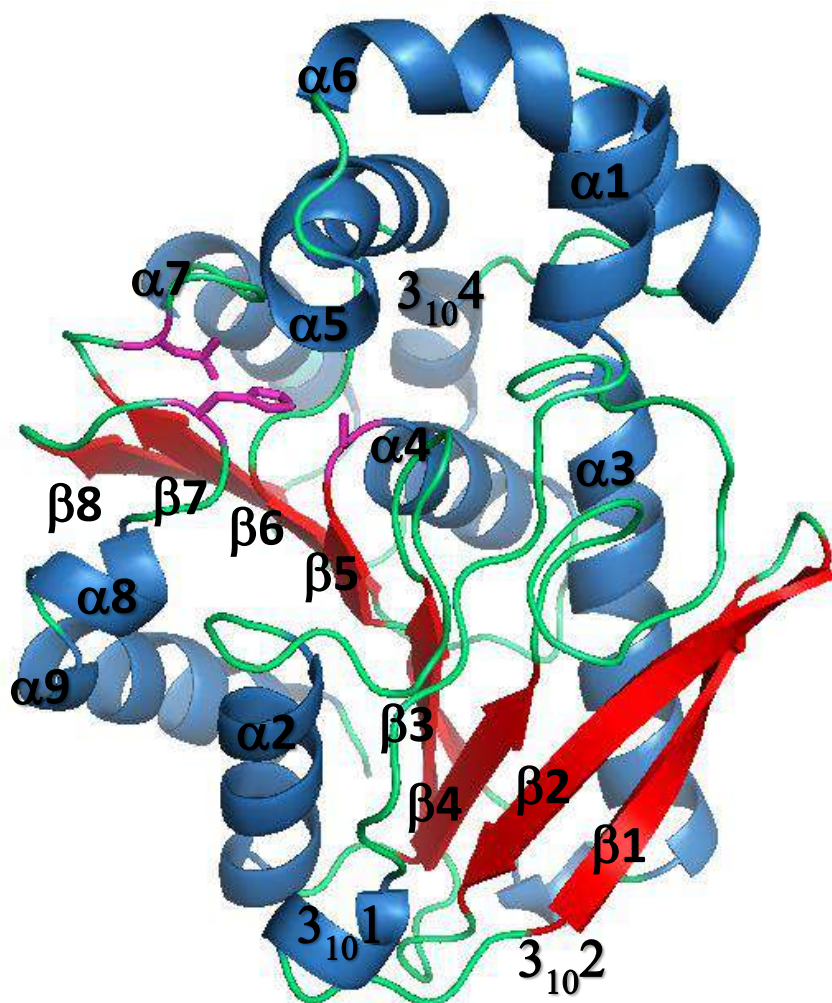


**Figura 7: Atividade enzimática da lipase Pf2001Δ60 em diferentes concentrações de agentes desnaturantes.**

(A) Atividade enzimática relativa da lipase Pf2001Δ60 na presença de ureia. A enzima permanece ativa mesmo em altas concentrações de uréia, ocorrendo um pico máximo em 2 M. (B) Atividade da lipase Pf2001Δ60 na presença de guanidina. A enzima perde rapidamente sua atividade na presença, sendo bem menos estável do que em uréia, apesar de apresentar um pico de ativação em 1 M. A concentração de enzima neste ensaio foi de 3,33 μM. Todos os ensaios foram feitos em triplicata. Os resultados estão expressos como a média dos valores obtidos e as barras indicam os desvios calculados entre as triplicatas (adaptado de De Andrade, 2016).

Um dos maiores problemas da biocatálise é a instabilidade apresentada pelas enzimas nas condições reacionais utilizadas na indústria, o que inviabiliza a sua utilização em muitos processos. Uma alternativa, como já descrito, é o emprego de enzimas de organismos extremófilos que são intrinsecamente mais estáveis nessas condições. As características estruturais e dinâmicas dessas enzimas são de grande interesse biotecnológico, pois podem ser utilizadas como modelo para desenvolver enzimas mais estáveis e ativas para estes processos. Dessa forma, nossos estudos seguiram na elucidação da estrutura tridimensional da lipase Pf2001Δ60 de *Pyrococcus furiosus* através da técnica de cristalografia e difração de raios x (De Andrade, 2016, Varejão *et al.*, 2017).

A lipase Pf2001Δ60 foi obtida na forma monomérica e dimérica no mesmo cristal, indicando que esses dois estados oligoméricos se encontravam em equilíbrio em solução. A lipase Pf2001Δ60 possui um único domínio, o domínio α/β-hidrolase canônico, sendo composta por uma folha-β central contendo 8 fitas-β paralelas, com exceção da segunda fita. Em torno da folha-β central estão dispostas 9 α-hélices e 4 hélices 3-10. A tríade catalítica se encontra em sua posição consenso: a serina está localizada no cotovelo nucleofílico (motivo fita-volta-hélice) após a fita β5, o ácido aspártico se localiza após a fita β7 e a histidina se localiza após a fita β8 (Figura 8). Além disto, existe uma região de dimerização que envolve a α-hélice N-terminal (α-hélice 1), a α-hélice 5 e a α-hélice 6. A α-hélice 1 tem a sua conformação alterada no dímero cristalográfico, formando uma fita-β (fita β1') (De Andrade, 2016).



**Figura 8:** Estrutura tridimensional da lipase Pf2001Δ60 obtida por cristalografia e difração de raios-x (PDB ID 5G59).

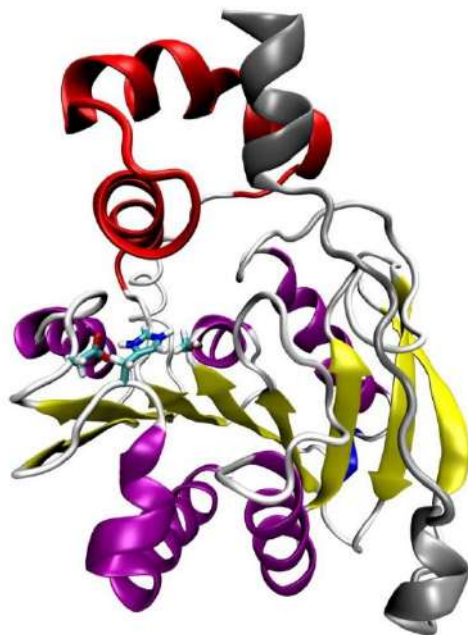
As fitas- $\beta$  estão representadas em vermelho, as  $\alpha$ -hélices e as hélices 3-10 estão representadas em azul, os *loops* estão representados em verde, a tríade catalítica é representada em magenta (De Andrade, 2016, Varejão, 2017). A lipase Pf2001Δ60 possui um único domínio, o domínio  $\alpha/\beta$ -hidrolase canônico, sendo composta por uma folha- $\beta$  central contendo 8 fitas- $\beta$  paralelas, com exceção da segunda fita. Em torno da folha- $\beta$  central estão dispostas 9  $\alpha$ -hélices e 4 hélices 3-10. A tríade catalítica se encontra em sua posição convencional para este tipo de enovelamento (De Andrade, 2016).

Associado à estrutura cristalográfica, técnicas de simulação de dinâmica molecular foram utilizadas para investigar o comportamento dinâmico da proteína em diferentes condições (De Andrade, 2016).

A enzima apresentou elevada estabilidade global, exibindo flutuações locais do RMS (root mean square) nas simulações realizadas a 25°C. Estas flutuações foram observadas na porção N-terminal (resíduos 17 a 25) e na porção C-terminal da proteína,



regiões normalmente mais flexíveis e dinâmicas. Também se pôde observar uma flutuação significativa do RMS para as hélices  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  (resíduos 182 a 214), localizadas próximas a cavidade do sítio ativo, e que podem participar da interação da enzima com o substrato. Uma vez que o subdomínio em tampa é descrito como uma das regiões mais dinâmicas das lipases, este conjunto de dados permitiu sugerir que as hélices  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  constituem o subdomínio em tampa da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 (Figura 9) (De Andrade, 2016).

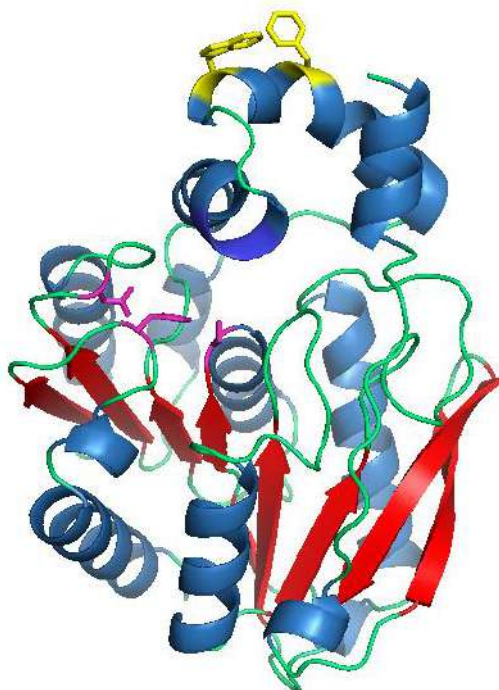


**Figura 9: Estrutura cristalográfica da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 em sua forma monomérica, com as regiões que apresentam maior flutuação do RMS em destaque.**

A porção N-terminal da proteína (resíduos 17 a 42) é representada em cinza (resíduos 17 a 42), a hélice  $\alpha 5$  e a hélices  $\alpha 6$  (resíduos 182 a 210) sobre o sítio ativo são representadas em vermelho, as demais  $\alpha$ -hélices são representadas em púrpura e as fitas  $\beta$  são representadas em amarelo. A tríade catalítica (Ser-149, Asp-233 e His-264) é representada por linhas grossas coloridas de acordo com o átomo (Retirado de De Andrade, 2016).

Mutações no subdomínio em tampa de lipases têm alterado diversas características dessas enzimas, tais como atividade enzimática, seletividade a substrato e termoestabilidade (Gao *et al.*, 2011, Karkhane *et al.*, 2009, Santarossa *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2012). Desta maneira, com o suporte da estrutura cristalográfica e dos dados de simulação de dinâmica molecular, as mutações racionais W194A, F198A e W194A/F198A foram propostas no provável subdomínio em tampa da lipase Pf2001 $\Delta$ 60, a fim de modificar algumas de suas características bioquímicas, em

especial, o aumento de sua afinidade por substratos de cadeia carbônica longa devido à sua possível aplicabilidade na indústria do biodiesel (Figura 10).



**Figura 9: Localização das mutações W194A e F198A no provável subdomínio em tampa da lipase Pf2001Δ60.**

As fitas- $\beta$  estão representadas em vermelho, as  $\alpha$ -hélices e as hélices 3-10 estão representadas em azul, os loops estão representados em verde, a tríade catalítica é representada em magenta e os dois resíduos aromáticos mutados expostos ao solvente na provável tampa da lipase Pf2001Δ60, W194 e F198A são representados em amarelo (adaptado de De Andrade, 2016).

## 2 - OBJETIVO

### 2.1 - *Objetivo geral*

O objetivo geral deste trabalho consiste na caracterização dos mutantes racionais W194A, F198A e W194A/F198A da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 de *Pyrococcus furiosus*, a fim de comparar e avaliar possíveis alterações nas características bioquímicas da lipase selvagem, após as mutações realizadas no seu subdomínio tampa.

### 2.2 – *Objetivos específicos*

- Transformar células competentes de *E.coli Rosetta* DE3 com os plasmídeos dos mutantes: pET25b-Pf2001 $\Delta$ 60-W194A (W194A), pET25b-Pf2001 $\Delta$ 60-F198A (F198A) e pET25b- Pf2001 $\Delta$ 60-W194A/F198A (W194A/F198A).

- Expressar a lipase selvagem Pf2001 $\Delta$ 60 em *Escherichia coli* utilizando meio Luria-Bertani (LB) e meio mínimo (M9).

- Expressar os mutantes W194A, F198A e F198A/W194A da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 em *E. coli* utilizando meio LB e meio mínimo.

- Purificar as lipases selvagem e mutantes com alto grau de pureza utilizando as técnicas de cromatografia de afinidade a níquel e cromatografia de gel exclusão.

- Avaliar e comparar a atividade específica da lipase selvagem e seu mutante W194A frente a ésteres derivados de p-nitrofenol com diferentes tamanhos de cadeia.

- Avaliar e comparar a termoestabilidade da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e de seu mutante W194A em diversas temperaturas, através de medidas de atividade enzimática.

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – Material

##### 3.1.1 – Cepas

As células de *Escherichia coli* Rosetta (DE3) contendo o plasmídeo pET25b-PF2001Δ60 foram obtidas no banco de cultura do Laboratório de Bioquímica Estrutural de Proteínas (LaBEP) da UFRJ. As células competentes de *Escherichia coli* Rosetta (DE3) utilizadas no processo de transformação foram adquiridas no mesmo banco de cultura. Os plasmídeos contendo os genes Pf2001Δ60-W194A, Pf2001Δ60-F198A e Pf2001Δ60-W194A/F198A foram gentilmente cedidos pelo Dr. David Reverter da Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha.

##### 3.1.2 – Reagentes

**Tabela 1: Principais reagentes utilizados no trabalho.**

Reagentes	Fornecedores
Acrilamida	Biorad
Ágar	Sigma
Ampicilina	Sigma
Bisacrilamida	Biorad
Cloranfenicol	Sigma
Cloreto de Amônio	Sigma
Cloreto de Cálcio	Sigma-Aldrich
Cloreto de Sódio	Sigma
Comassie blue G250	Sigma
Etanol	Sigma
Fosfato de sódio dibásico	Sigma
Fosfato de sódio monobásico	Sigma
Glicose	Sigma
Imidazol	Sigma
Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG)	Sigma
Meio de cultura Luria-Bertani (LB)	Sigma
Metanol	Vetec
4-metil umbeliferil heptanoato	Sigma
Padrão de Albumina de soro bovino (BSA)	Biorad

ρ- nitrofenil butirato	Sigma
ρ - nitrofenil laurato	Sigma
ρ - nitrofenil octanoato	Sigma
ρ - nitrofenil palmitato	Sigma
Reagente de Bradford	Sigma
Resina de Níquel - Sepharose	GE
Sulfato de Magnésio	Sigma
Tiamina	Sigma
Tris Base	Sigma

### 3.2 – Métodos

#### 3.2.1 – Fluxograma da metodologia utilizada para o estudo da lipase selvagem e de seus mutantes W194A, F198A e W194A/F198A

O fluxograma abaixo tem como objetivo resumir a metodologia empregada neste trabalho para as lipases estudadas.

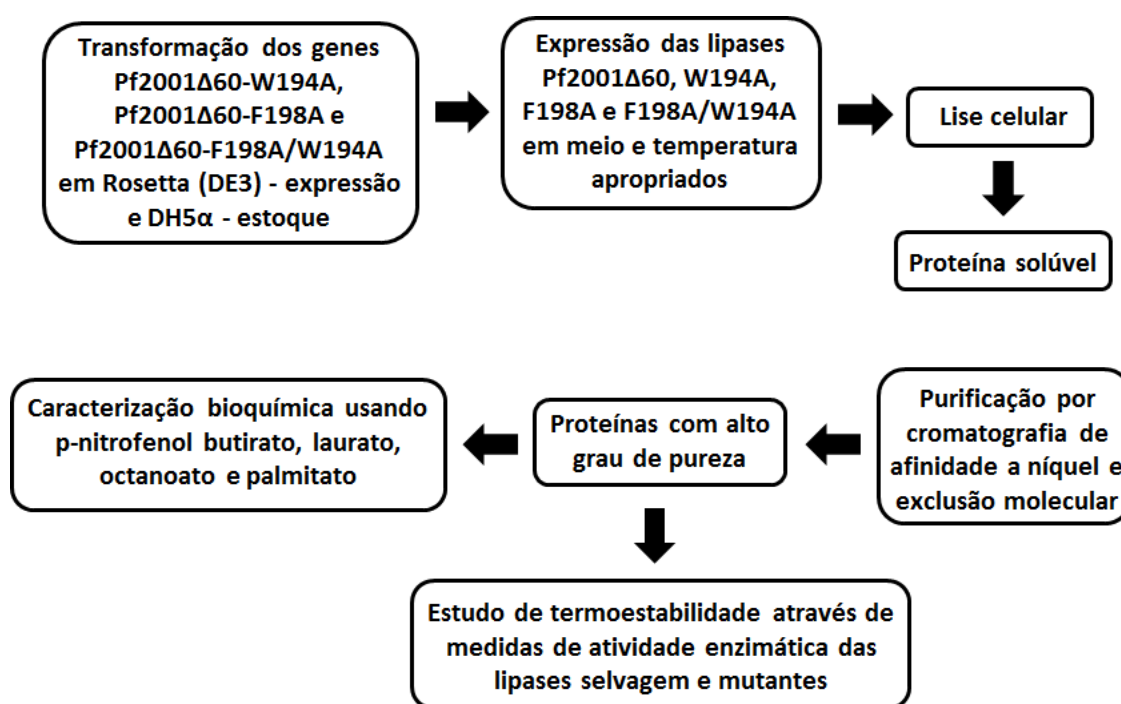


Figura 10: Fluxograma da metodologia adotada para o estudo da lipase Pf2001Δ60 e mutantes racionais, W194A, F198A e W194A/F198A.

### 3.2.2 – Construção das lipases Pf2001Δ60, W194A, F198A e W194A/F198A

O gene que codifica a lipase Pf2001Δ60 foi expresso sem os 20 primeiros aminoácidos que codificam o peptídeo sinal e contendo a fusão de um tag de histidina, com o objetivo de facilitar a etapa de purificação (Figura 12A). As construções dos mutantes W194A, F198A e W194A/F198A seguiram os mesmos padrões da construção usada para a lipase selvagem, contendo a substituição do triptofano e fenilalanina por uma alanina localizados nas posições 194 e 198, respectivamente (Figura 12 B, 12 C e 12 D).

#### A) Pf2001Δ60

**MHHHHHH**GYKMVNPPRVVGNWTPKDLSFEYKDVEITTEDNVKLSGWWIDNGSDKTVIPL  
HGYTSSRWAEHYMRPVIEFLLKEGYNVLAFFRAHGKSGGKYTTVGDKEILDLKAGVKW  
LKDNYPEKSKRIGVIGFSMGALVAIRGLSEVKEICCGVADSPPIYLDKTGARGMKYFAK  
LPEWLYSFVKPFSELSGGRPINVLNYTNSIKKPLFLIIGRRDTLVKVEEVQEFYERNK  
HVNPNVELWVTDAPHVRTIQVFPEEWKSRVGEFLKRWMG

#### B) W194A

**MHHHHHH**GYKMVNPPRVVGNWTPKDLSFEYKDVEITTEDNVKLSGWWIDNGSDKTVIPL  
HGYTSSRWAEHYMRPVIEFLLKEGYNVLAFFRAHGKSGGKYTTVGDKEILDLKAGVKW  
LKDNYPEKSKRIGVIGFSMGALVAIRGLSEVKEICCGVADSPPIYLDKTGARGMKYFAK  
LPEALYSFVKPFSELSGGRPINVLNYTNSIKKPLFLIIGRRDTLVKVEEVQEFYERNK  
HVNPNVELWVTDAPHVRTIQVFPEEWKSRVGEFLKRWMG

#### C) F198A

**MHHHHHH**GYKMVNPPRVVGNWTPKDLSFEYKDVEITTEDNVKLSGWWIDNGSDKTVIPL  
HGYTSSRWAEHYMRPVIEFLLKEGYNVLAFFRAHGKSGGKYTTVGDKEILDLKAGVKW  
LKDNYPEKSKRIGVIGFSMGALVAIRGLSEVKEICCGVADSPPIYLDKTGARGMKYFAK  
LPEWLYSAVKPFSELSGGRPINVLNYTNSIKKPLFLIIGRRDTLVKVEEVQEFYERNK  
HVNPNVELWVTDAPHVRTIQVFPEEWKSRVGEFLKRWMG

#### D) W194A/F198A

**MHHHHHH**GYKMVNPPRVVGNWTPKDLSFEYKDVEITTEDNVKLSGWWIDNGSDKTVIPL  
HGYTSSRWAEHYMRPVIEFLLKEGYNVLAFFRAHGKSGGKYTTVGDKEILDLKAGVKW  
LKDNYPEKSKRIGVIGFSMGALVAIRGLSEVKEICCGVADSPPIYLDKTGRGMKYFAKL  
PEALYSAVKPFSELSGGRPINVLNYTNSIKKPLFLIIGRRDTLVKVEEVQEFYERNK  
HVNPNVELWVTDAPHVRTIQVFPEEWKSRVGEFLKRWMG

**Figura 11: Sequências primárias das construções da lipase Pf2001Δ60 e dos mutantes racionais W194A, F198A e W194A/F198A.**

Em (A) observamos a sequência primária da construção da lipase Pf2001Δ60 que foi inserida no plasmídeo pET 25b. Em azul é mostrada a sequência primária da lipase contendo 268 aminoácidos e em vermelho está destacada a cauda de histidina. Em (B), (C) e (D) observamos as sequências primárias dos mutantes W194A (B), F198A (C) e W194A/F198A (D), respectivamente, que foram inseridos no plasmídeo pET 25b. Para todos os mutantes podemos observar a sequência de 268 aminoácidos em azul, a cauda de histidina em vermelho e a substituição do aminoácido original em rosa. Em (B) a substituição do triptofano original na posição 194 por alanina (B), em (C) a substituição da fenilalanina original na posição 198 por alanina e em (D) as substituições do triptofano (194) e da fenilalanina (198) por alanina, respectivamente.

**3.2.3 – Transformação dos genes *Pf2001Δ60-W194A*, *Pf2001Δ60-F198A* e *Pf2001Δ60-W194A/F198A***

As células competentes Rosetta (DE3) e DH5α foram transformadas através de choque térmico pela inserção dos plasmídeos pET25b contendo os genes Pf2001Δ60-W194A, Pf2001Δ60-F198A e Pf2001Δ60-W194A/F198A. Inicialmente, 1 µL de DNA foi adicionado a 200 µL de célula competente e levado a banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, a célula foi mantida em banho maria a 42°C por 90 segundos, passando novamente por 10 minutos em banho de gelo. Ao final dessa etapa, 800 µL de meio LB foram acrescentados à alíquota, que foi incubada a 37°C em agitador rotatório a 200 rpm por 1 hora. O inóculo foi plaqueado em meio LB ágar contendo os antibióticos específicos (ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL) e a placa incubada a 37°C por aproximadamente 16 h. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar.

**3.2.4 – Teste de expressão em meio LB para o mutante F198A**

Inicialmente, o mutante F198A foi expresso em meio LB (0,5% de extrato de lêvedo, 1% de triptona e 0,5% NaCl) pelo mesmo método realizado para a lipase Pf2001Δ60 selvagem, descrito por Almeida (2006), com algumas alterações (De-Andrade, 2012). Uma alíquota do estoque de glicerol da cepa de *E. coli Rosetta* (DE3) contendo a construção de interesse, F198A, foi plaqueada em meio LB-Ágar na presença dos antibióticos específicos (ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL). Após 18 horas de incubação a 37°C, uma colônia isolada foi inoculada em 2 mL de

meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos, e incubada a 37°C por 16 horas em agitador rotatório a 200 rpm. Em seguida, o inóculo foi repicado em 50 mL de meio LB na presença dos antibióticos, permanecendo a 37°C em agitador rotatório a 200 rpm até alcançar D.O<sub>600nm</sub> de 0,4. Nesta fase, o indutor isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração de 0,5 mM foi adicionado em duas temperaturas de crescimento, 20°C e 30°C. Alíquotas de 2 mL foram retiradas antes da indução e a cada hora depois da indução por 4 h. Essas alíquotas foram centrifugadas a 8500 rpm, 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células armazenadas a – 20°C.

### 3.2.5 – *Teste de expressão em meio M9 das lipases Pf2001Δ60, W194A, F198A e W194A/F198A*

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa apresentaram resultados satisfatórios para a expressão da lipase selvagem Pf2001Δ60 em meio mínimo (De-Andrade, 2016). Dessa forma, os testes de expressão da lipase Pf2001Δ60 e seus mutantes foram realizados em meio mínimo para definir as melhores condições de expressão das enzimas de interesse.

A cepa de *E. coli Rosetta* (DE3) transformada com cada uma das construções de interesse foi plaqueada em meio LB-ágar na presença dos antibióticos específicos (ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL). Após 18 horas de incubação a 37°C, uma colônia isolada de cada construção foi inoculada em 2 mL de meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos, em três falcons diferentes, e incubada a 37°C por 6 horas em agitador rotatório a 200 rpm. Posteriormente, 200 µL de cada cultura foi inoculado em 5 mL de meio mínimo e antibióticos, e incubado a 37°C em agitador rotatório a 200 rpm por 16 horas. Em seguida, parte deste inóculo foi vertido para 50 mL de meio mínimo tendo o cuidado de manter a D.O<sub>600nm</sub> deste novo inóculo em 0,17. Após o crescimento nas condições já descritas, quando a densidade óptica atingiu o valor de 1,0, o indutor IPTG foi adicionado ao meio de cultura na concentração de 1 mM e esta foi mantida a 30°C em agitador rotatório a 200 rpm. Alíquotas de 2 mL da amostra antes da indução e a cada 1 hora após a indução por 4 horas foram retiradas para o monitoramento da expressão através de SDS-PAGE. Ao final do tempo de expressão estipulado, o inóculo foi centrifugado a 8500 rpm, 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células armazenadas a – 20°C.



Com a melhor condição de expressão determinada foi possível aumentar o volume de meio mínimo (500 mL), utilizando de forma proporcional, o protocolo descrito acima.

### *3.2.6 – Lise celular*

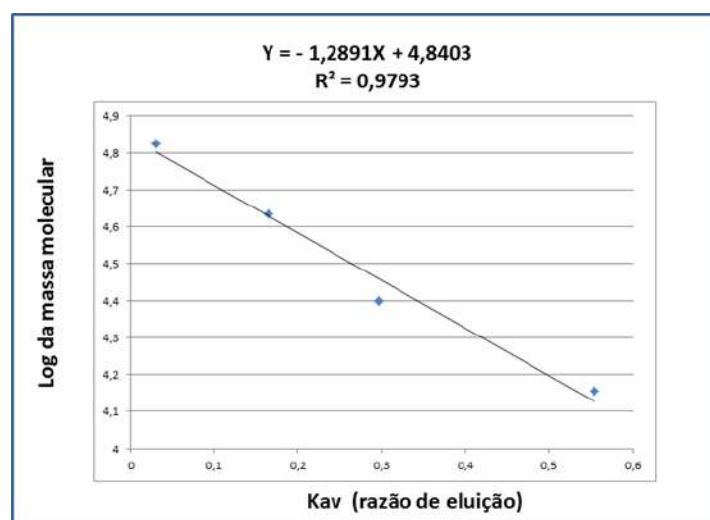
As células obtidas na etapa de expressão foram ressuspensas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, na proporção de 1g de massa úmida para 20 mL de tampão. A lise celular foi realizada por sonicação (90 ciclos de 10 segundos a 225 W com 10 segundos de resfriamento) em banho de gelo. O extrato obtido foi centrifugado a 8500 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi utilizado na etapa de purificação e o pellet, descartado.

### *3.2.7 – Purificação das Lipases selvagem e dos mutantes*

Com o objetivo de obter as lipases com elevado grau de pureza, o protocolo de purificação contém dois passos cromatográficos. O primeiro passo consiste em uma cromatografia de afinidade a níquel realizada em duas etapas. Inicialmente 20 mL do extrato solúvel de bactéria foram vertidos em 5 mL de resina de níquel sepharose (GE healthcare-17-5268-02) previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. O sistema foi mantido sob agitação branda e constante por 1 h. Em seguida, a resina e o extrato bruto foram transferidos para uma coluna cromatográfica e a resina foi empacotada com o auxílio de uma bomba peristáltica. A resina foi lavada com 25 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 com 300 mM de NaCl (tampão de lavagem) e a eluição foi realizada, aplicando-se à coluna concentrações crescentes de imidazol (5 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM e 2 M), a um fluxo de 1 mL por minuto. As frações contendo as lipases Pf2001 $\Delta$ 60 ou o mutante W194A (100, 150, e 200 mM de imidazol) foram reunidas e concentradas em centricon de 10 kDa (Milipore).

O segundo passo para a purificação da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e dos mutantes W194A e W194A/F198A foi realizado através de cromatografia de gel filtração. Esta foi efetuada em coluna HiLoad 16/600 superdex 75 (GE) equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. A corrida foi realizada a um fluxo de 1 mL por minuto em sistema de purificação ÄKTA Explorer (GE/Pharmacia). A curva de calibração da

coluna foi utilizada como referência para analisar o volume de eluição esperado para as proteínas de interesse (Figura 13 e Tabela 2).



**Figura 12:** Curva de calibração da cromatografia de Gel filtração.

O gráfico correlaciona a massa das proteínas, previamente conhecidas, com o volume de eluição das mesmas para a coluna de gel filtração Superdex 75. As proteínas utilizadas como padrão foram albumina de soro bovino (BSA) (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), quimiotripsinogênio (25 kDa) e a Lisozima (14,3 kDa).

**Tabela 2:** Proteínas utilizadas como padrão para o cálculo da curva de calibração da cromatografia de Gel filtração e a relação massa molecular vs. volume de eluição.

Proteína	Massa molecular (Da)	Log da massa molecular	Volume de eluição (mL)	Kav (razão de eluição)
Lisozima	14300	4,155336037	81,97	0,554057223
Quimotripsinogênio A	25000	4,397940009	59,96	0,295966229
Ovoalbumina	43000	4,633468456	48,8	0,165103189
BSA	67000	4,826074803	37,35	0,030839587

### 3.2.8 – Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada através do método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão e todas as medições foram feitas em triplicata.

### 3.2.9 - Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)

As análises qualitativas das técnicas cromatográficas utilizadas para obtenção da fração purificada das lipases foram realizadas através da eletroforese desnaturante, utilizando gel de poliacrilamida 15 % (p/v). A eletroforese foi executada em temperatura ambiente com intensidade de corrente elétrica de 30 mA por gel de poliacrilamida de acordo com o método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). A eletroforese foi realizada em sistema miniprotean da Bio-Rad utilizando o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; Glicina 150 mM e 0,1% (p/v) SDS (tampão de corrida). Os géis foram corados com solução de *Coomassie brilliant blue* 0,1% em metanol/ácido acético/água (45/10/45, v/v/v) e descorados utilizando solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). O padrão de peso molecular utilizado foi o padrão *Pierce Unstained Protein MW Marker* (Thermo Scientific).

### 3.2.10 – Teste de atividade

A atividade lipásica foi medida através de método espectrofotométrico, utilizando o modelo do espectrofotômetro *Shimadzu UV 1800*. Dessa forma, é possível medir a formação de um produto cromóforo (*p*-nitrofenol) a partir da reação de hidrólise de ésteres derivados de *p*-nitrofenil. Diferentes substratos foram utilizados: *p*-nitrofenil butirato, octanoato, laurato e palmitato.

Para o cálculo da atividade, foi feita uma curva padrão de absorbância x concentração do *p*-nitrofenol, a 412 nm. O fator da curva padrão foi extraído utilizando as mesmas condições do ensaio enzimático (412 nm, pH 7,0 e temperatura de 30°C). A solução de substrato foi preparada utilizando-se 0,25 mL de *p*-nitrofenil 2,5 mM (solubilizado em mistura 1:1 de dimetilsulfóxido e acetonitrila) em 2,2 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato enzimático e a formação do *p*-nitrofenol foi acompanhada, em condições de velocidade inicial, durante os três primeiros minutos. Uma unidade de atividade lipásica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1,0 µmol do éster derivado de *p*-nitrofenil por minuto nas condições de ensaio.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado de acordo com a Equação 1. (Cunha, 2013)

$$A_L = \frac{(\alpha \cdot F \cdot V_f)}{V_a} \cdot F_d \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde:  $A_L$  = atividade (U/mL ou U/L)

$\alpha$  = coeficiente angular da reta (Abs x tempo)

$F$  = fator da curva padrão (Abs x concentração de *p*-nitrofenol)

$V_f$  = volume final (mL)

$V_a$  = volume de amostra (mL)

$F_d$  = fator de diluição

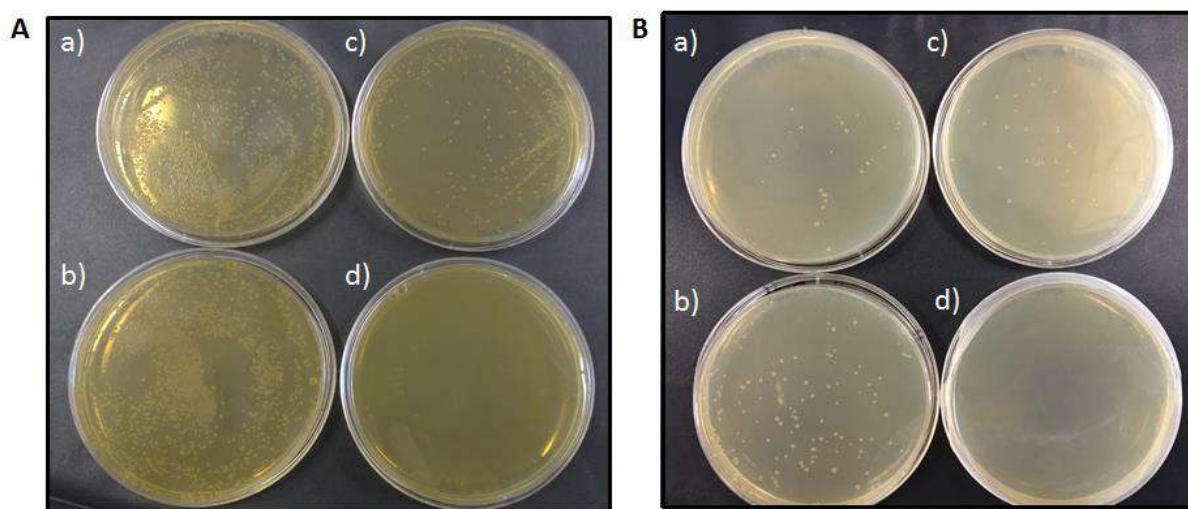
### 3.2.11 – Ensaios de termoestabilidade

A estabilidade das lipases Pf2001Δ60 e W194A em diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C) foi monitorada através de medidas de atividade enzimática após incubação por 2 h. Ao final desse tempo, as amostras foram utilizadas para o ensaio de atividade a 40 °C com 4-metil-umbeliferil-heptanoato (MUF-hep) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1 μmol de MUF por minuto nas condições do ensaio. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – Transformação dos genes *Pf2001Δ60-W194A*, *Pf2001Δ60-F198A* e *Pf2001Δ60-W194A/F198A* em células competentes

As construções dos mutantes, pET25b-Pf2001Δ60-W194A, Pf2001Δ60-F198A e Pf2001Δ60-W194A/F198 foram gentilmente cedidas pelo professor David Reverter da Universitat autonoma de Barcelona. As transformações das cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) e DH5α foram realizadas através de choque térmico (Figura 14 A e B).



**Figura 13: Transformação em Rosetta (DE3) e DH5α.**

Neste ensaio podemos observar os resultados referentes das transformações em cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) (A) e DH5α(B): em a) pET25b- Pf2001Δ60-W194A, em (b) pET25b- Pf2001Δ60- F198A, em (c) pET25b-Pf2001Δ60-W194A/F198A e em (d) controle negativo.

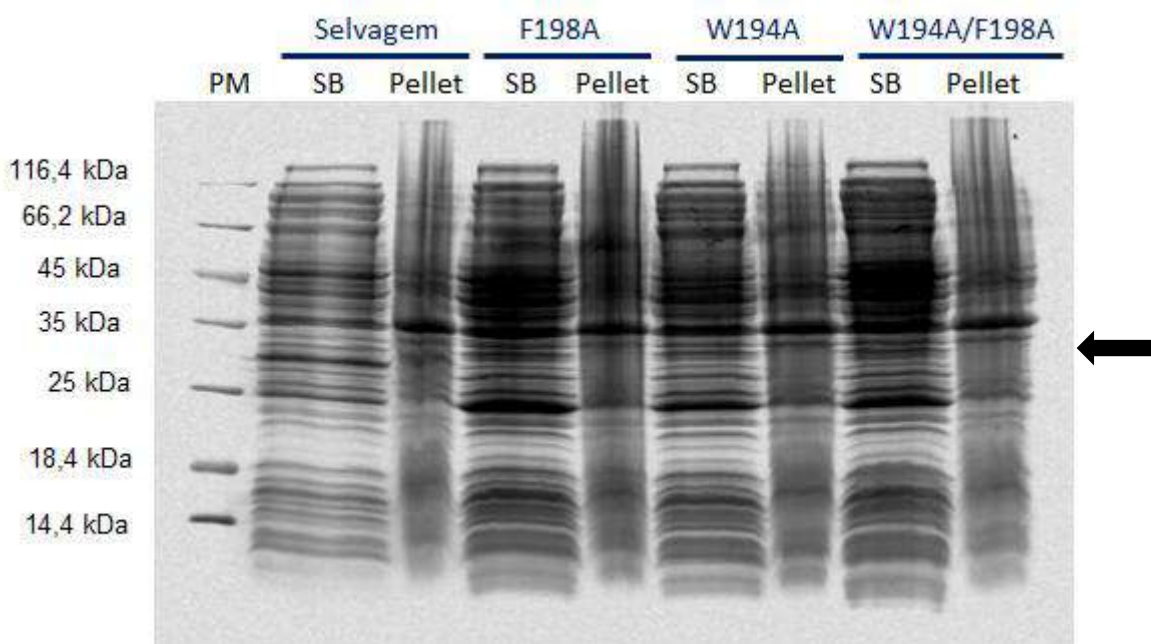
### 4.2 – Expressão das lipases *Pf2001Δ60* selvagem e dos mutantes: *W194A*, *F198A* e *W194A/F198A*

Nosso grupo vem trabalhando com a lipase Pf2001Δ60 desde 2001, e desde então, várias condições de cultivo já foram testadas para esta lipase (Almeida, 2005, 2006 e 2008, De-Andrade, 2012 e De-Andrade, 2016). Dentre estas condições podemos destacar mudanças nos meios de cultura, temperatura de expressão e tempo de indução. Desta forma, no intuito de encontrarmos a melhor condição de expressão para os

mutantes, fizemos ensaios em dois diferentes meios de cultura, em LB e meio mínimo, modificando a temperatura de expressão e a concentração do indutor.

#### 4.2.1 - Teste de expressão das lipases selvagem e mutantes em meio LB

Inicialmente a expressão da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e dos mutantes W194A, F198A e W194A/F198A foi realizada em meio LB a 37°C conforme descrito anteriormente para a lipase selvagem (De-Andrade, 2012). Ao atingir a DO<sub>600nm</sub> de 0,4, o meio de cultura foi induzido com 0,5 mM de IPTG e a temperatura de expressão modificada para 30°C. Após 4h de expressão as alíquotas foram retiradas e centrifugadas para prosseguir com a lise celular. Em seguida, a fração insolúvel foi lisada e novamente centrifugada. Para o monitoramento da expressão e da lise celular, as alíquotas da fração solúvel e insolúvel foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% (Figura 15).



**Figura 14: SDS-PAGE 15% da expressão e lise celular das lipases Pf2001 $\Delta$ 60 (selvagem) e dos mutantes W194A, F198A e W194A/F198A.**

Neste ensaio, podemos observar a fração solúvel (SB) e insolúvel (pellet) obtidos após a lise celular para cada uma das lipases. A seta indica a localização da banda de peso molecular esperada para as lipases de interesse (29 kDa). Estes resultados indicaram que apenas a proteína selvagem foi expressa nestas condições.

Os resultados referentes aos ensaios de expressão e lise celular da lipase selvagem e dos mutantes em meio LB a 30°C mostraram que apenas a lipase selvagem foi expressa nestas condições enquanto que os mutantes não foram identificados no peso molecular esperado.

Sendo assim, os estudos de expressão dos mutantes da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 em LB foram aprofundados, explorando diferentes temperaturas de expressão e tempos de indução. Tendo em vista o comportamento muito semelhante para os três mutantes, optamos por utilizar apenas o mutante F198A para os testes de expressão em LB.

A expressão do mutante F198A foi realizada em meio LB utilizando as temperaturas de 20°C e 30°C em diferentes tempos de indução (1 a 4 h). A análise deste resultado foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% (Figura 16).

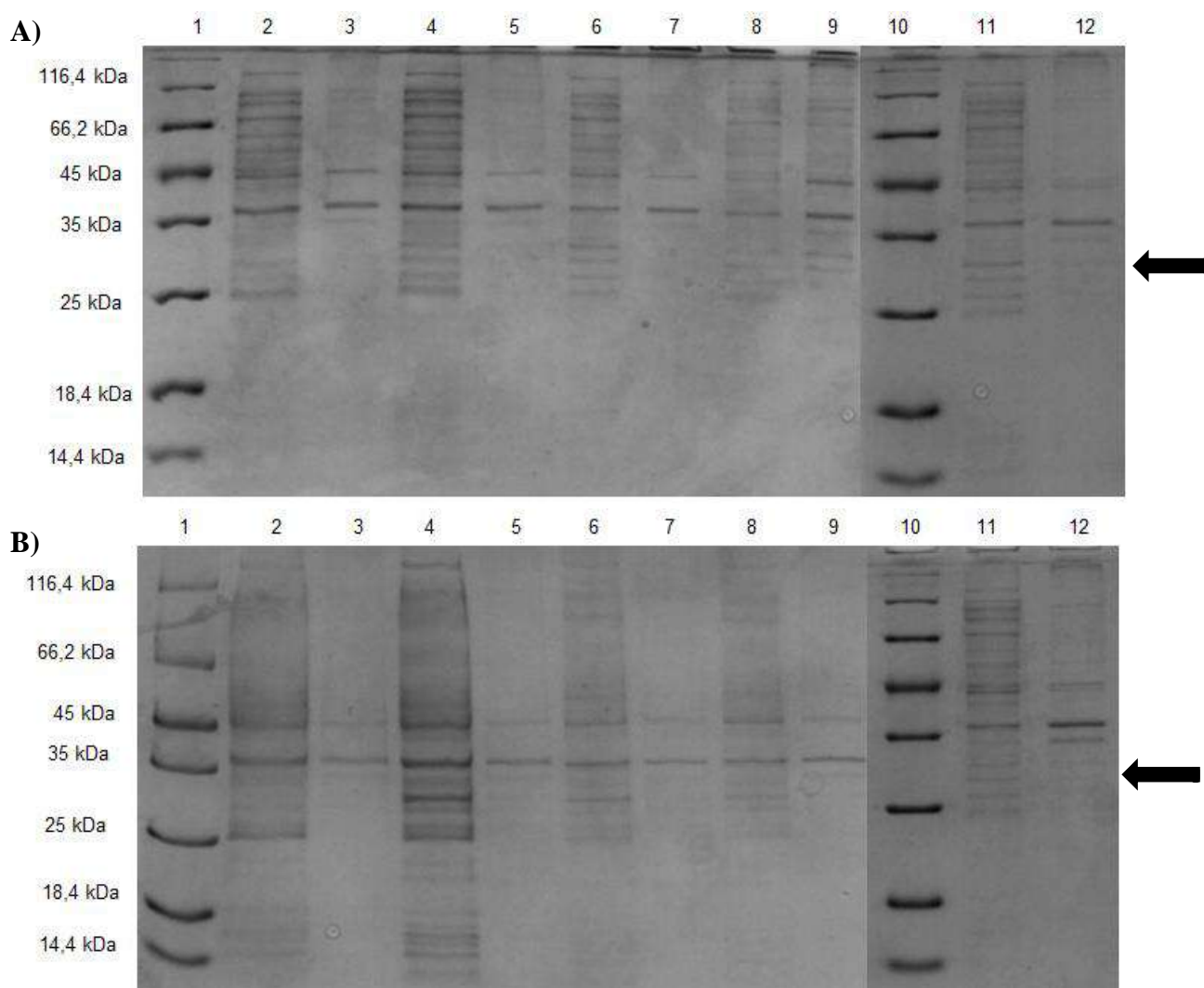


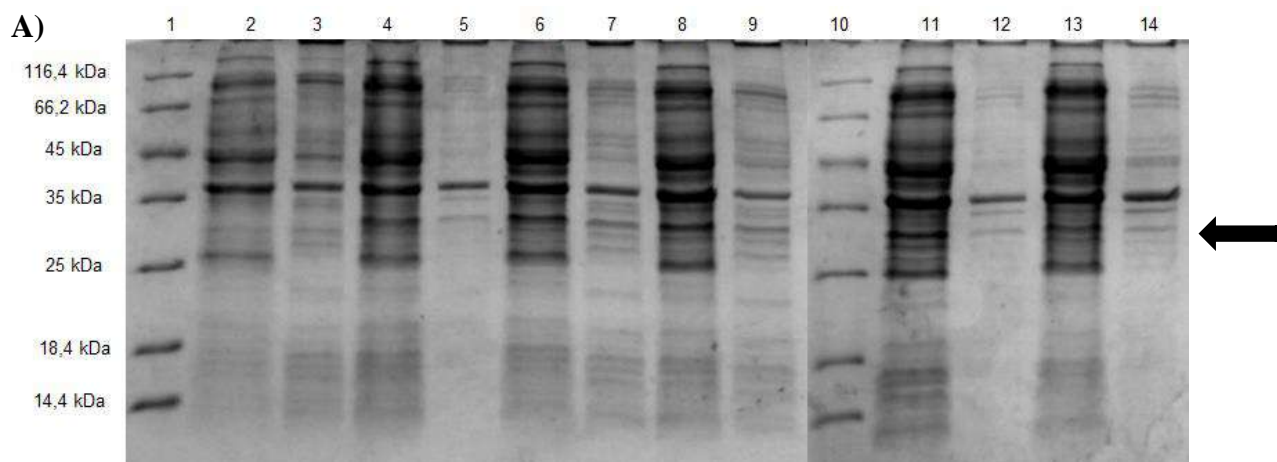
Figura 15: SDS-PAGE 15% da expressão do mutante F198A a 20°C (A) e 30°C (B) em meio LB.

Podemos observar em (A) e em (B): o padrão de baixa massa molecular (1 e 10) e as frações solúveis e insolúveis, respectivamente, das amostras antes de induzir (2 e 3) e depois de induzir com 0,5 mM de IPTG por 1h (4 e 5), 2h (6 e 7), 3h (8 e 9) e 4h (11 e 12). As setas mostram a região no peso molecular esperado para o mutante F198A.

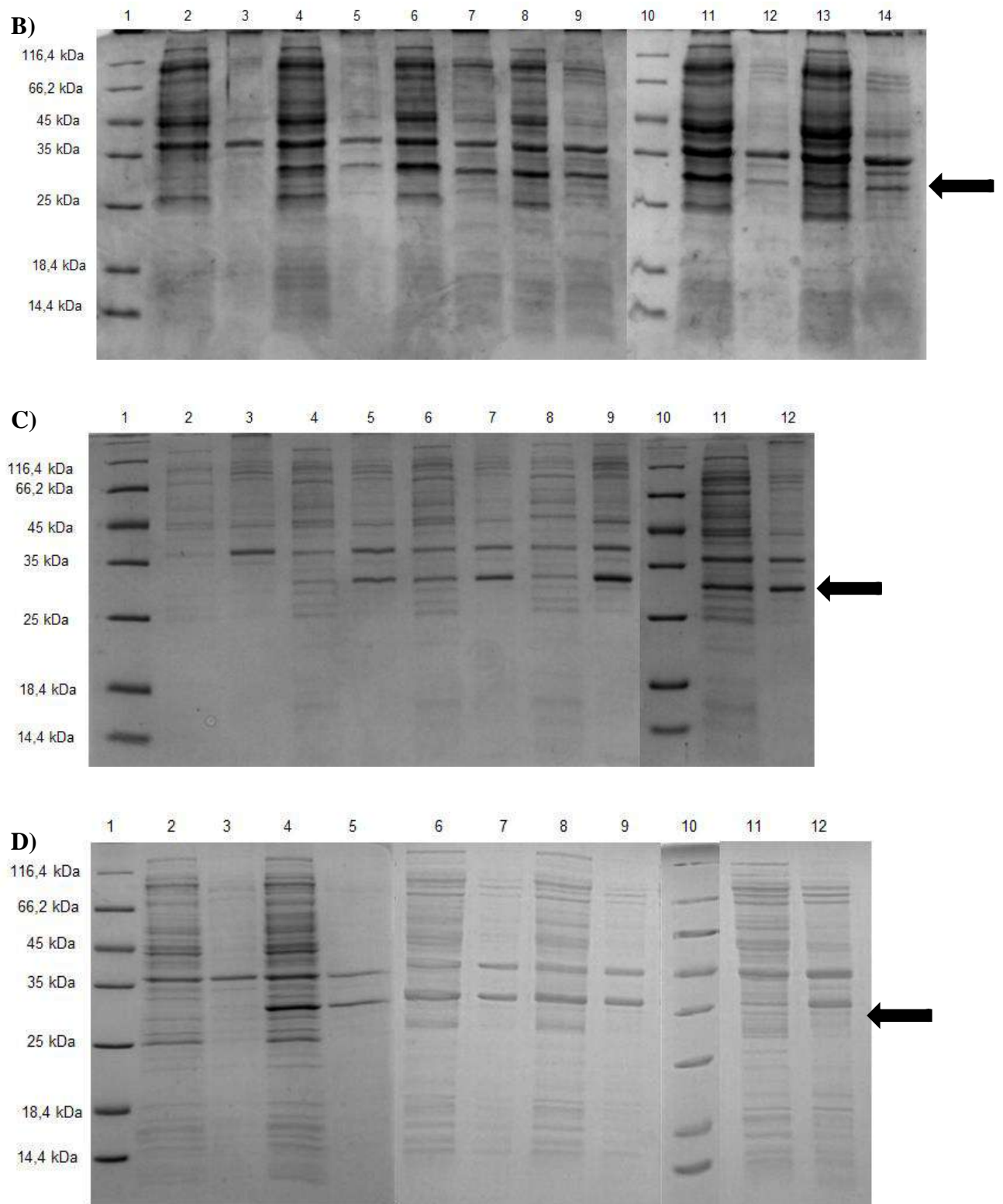
Os resultados indicaram que houve uma pequena expressão da lipase mutante F198A após 1 hora de indução a 30°C, entretanto, foi observado que a expressão do mutante ia diminuindo ao longo do tempo (Figura 16 B), sendo necessário outro protocolo de expressão (Figura 16).

#### 4.2.2 – Expressão das lipases selvagem e mutantes em meio mínimo

Estudos anteriores descrevem protocolos de expressão da lipase selvagem Pf2001Δ60 em meio mínimo a 30°C (De Andrade, 2016). Dessa forma, foram efetuados testes de expressão da lipase Pf2001Δ60 e dos mutantes W194A, F198A e W194A/F198A em meio mínimo utilizando 1 mM de IPTG para indução em  $DO_{600nm}$  de 1,0 em diferentes tempos de indução (1 a 4 h e 16 h). O monitoramento do teste de expressão foi realizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% (Figura 17).







**Figura 16: SDS-PAGE 15% da expressão das lipases Pf2001 $\Delta$ 60 (A), W194A (B), F198A (C) e W194A/F198A (D) em meio mínimo a 30°C.**

Podemos observar em (A), (B), (C) e em (D): o padrão de baixa massa molecular (1 e 10) e as frações solúveis e insolúveis, respectivamente, das amostras antes de induzir (2 e 3) e depois de induzir com 1

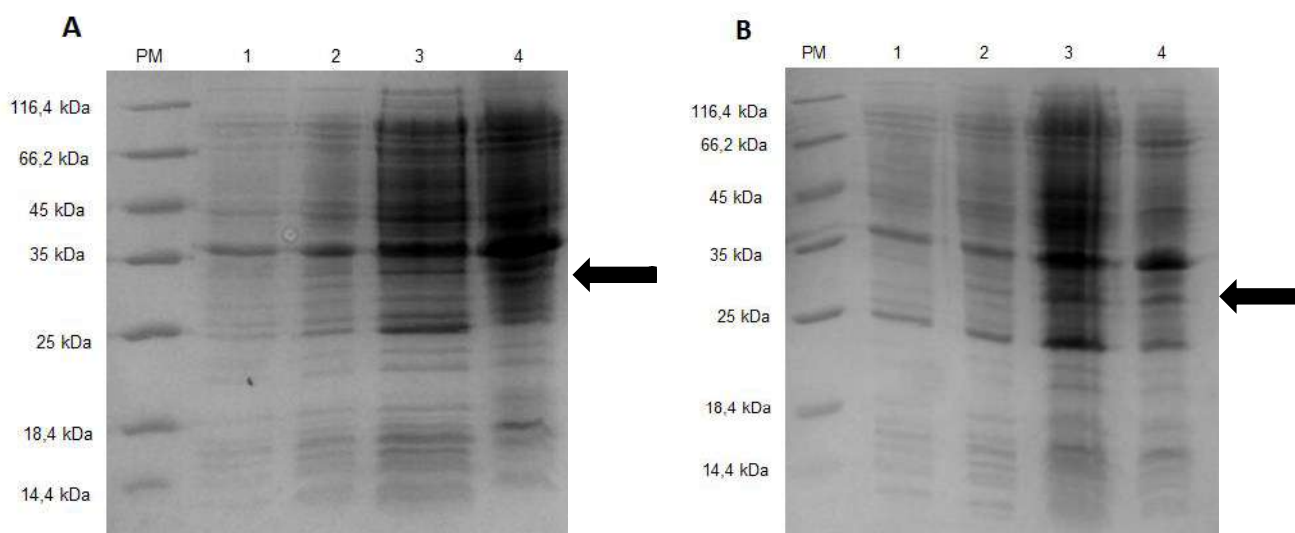
mM de IPTG por 1h (4 e 5), 2h (6 e 7), 3h (8 e 9), 4h (11 e 12) e 16 h (13 e 14). As setas mostram a região no peso molecular esperado para lipase e seus mutantes.

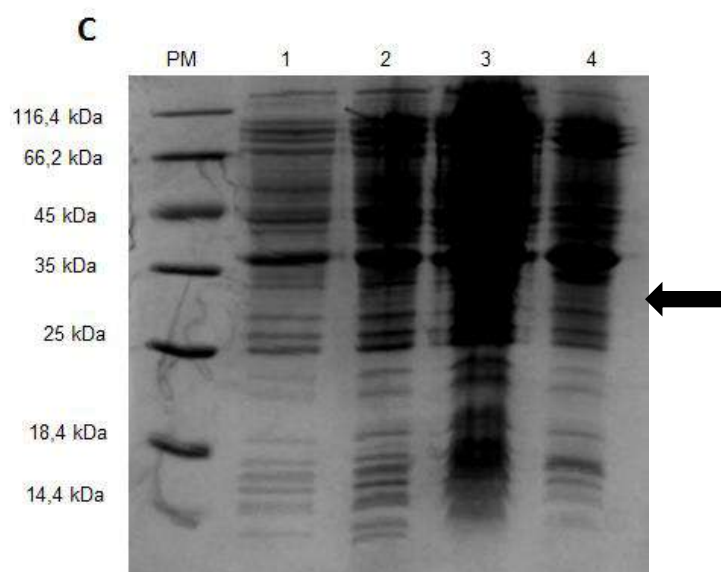
Os resultados indicaram que a expressão da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e dos mutantes pôde ser observada na fração solúvel, entretanto, uma fração considerável das proteínas estão presentes na fração insolúvel (Figura 17), sendo necessário uma otimização da lise celular.

Logo, as melhores condições de expressão para as lipases selvagem e mutantes foram definidas com crescimento em meio mínimo a 30°C utilizando 1 mM de IPTG para indução em DO<sub>600nm</sub> 1,0 por 4 h de expressão.

#### 4.3 – Lise celular da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e dos mutantes W194A e W194A/F198A

Os testes de expressão da lipase e os mutantes W194A, F198A e W194A/F198A foram realizados com o monitoramento prévio da melhor condição de lise celular durante a expressão das proteínas de interesse. Para aumentar a concentração de proteínas para os estudos posteriores, estas condições previamente definidas foram obtidas em maior volume de meio mínimo (500 mL) e após 4 h de expressão, as células foram lisadas e tiveram suas porções solúvel e insolúvel separadas por centrifugação. Estas amostras foram aplicadas em SDS-PAGE 15% (Figura 18).





**Figura 17: SDS-PAGE 15% da lise celular da lipase Pf2001Δ60 (A) e seus mutantes: W194A (B) e W194A/F198A (C).**

Podemos observar as frações referentes ao peso molecular (PM), antes da indução (1), depois de 4h de indução (2), a fração solúvel (3) e insolúvel da lise celular (4). As setas indicam a localização da banda de interesse no peso molecular esperado para essas proteínas.

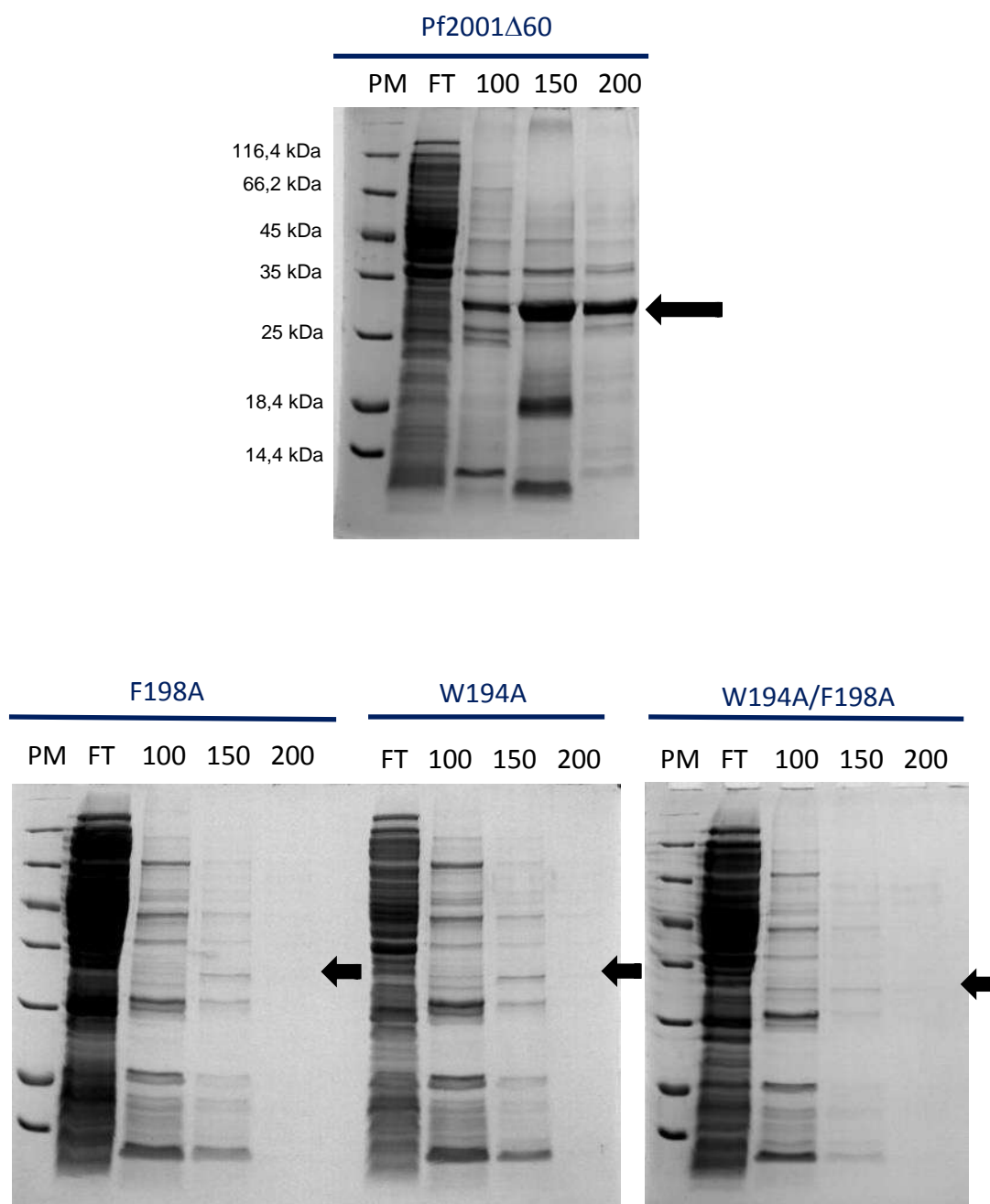
Os resultados da lise celular mostram que parte das proteínas de interesse, cerca de 50 %, encontram-se na fração solúvel indicando que as proteínas podem ser diretamente purificadas desta fração. Entretanto, os dados indicam também que parte destas proteínas se encontram na fração insolúvel, o que pode levar a uma menor concentração de enzimas purificadas.

Cabe ressaltar que este mesmo resultado foi verificado para a lipase selvagem e todos os mutantes, incluindo o F198A (dado não mostrado).

#### *4.4 – Purificação da lipase Pf2001D60 e dos mutantes W194A, F198A e W194A/F198A*

Após a expressão em meio mínimo e lise celular da lipase Pf2001Δ60 e dos mutantes W194A, F198A e W194A/F198A, as amostras foram submetidas a duas etapas de purificação: a cromatografia de afinidade a níquel e gel filtração, para alcançar os níveis de pureza necessários para os estudos bioquímicos e estruturais subsequentes.

Na cromatografia de afinidade as lipases foram eluídas nas frações contendo 100, 150 e 200 mM de imidazol junto com alguns contaminantes em baixa concentração (Figura 19).



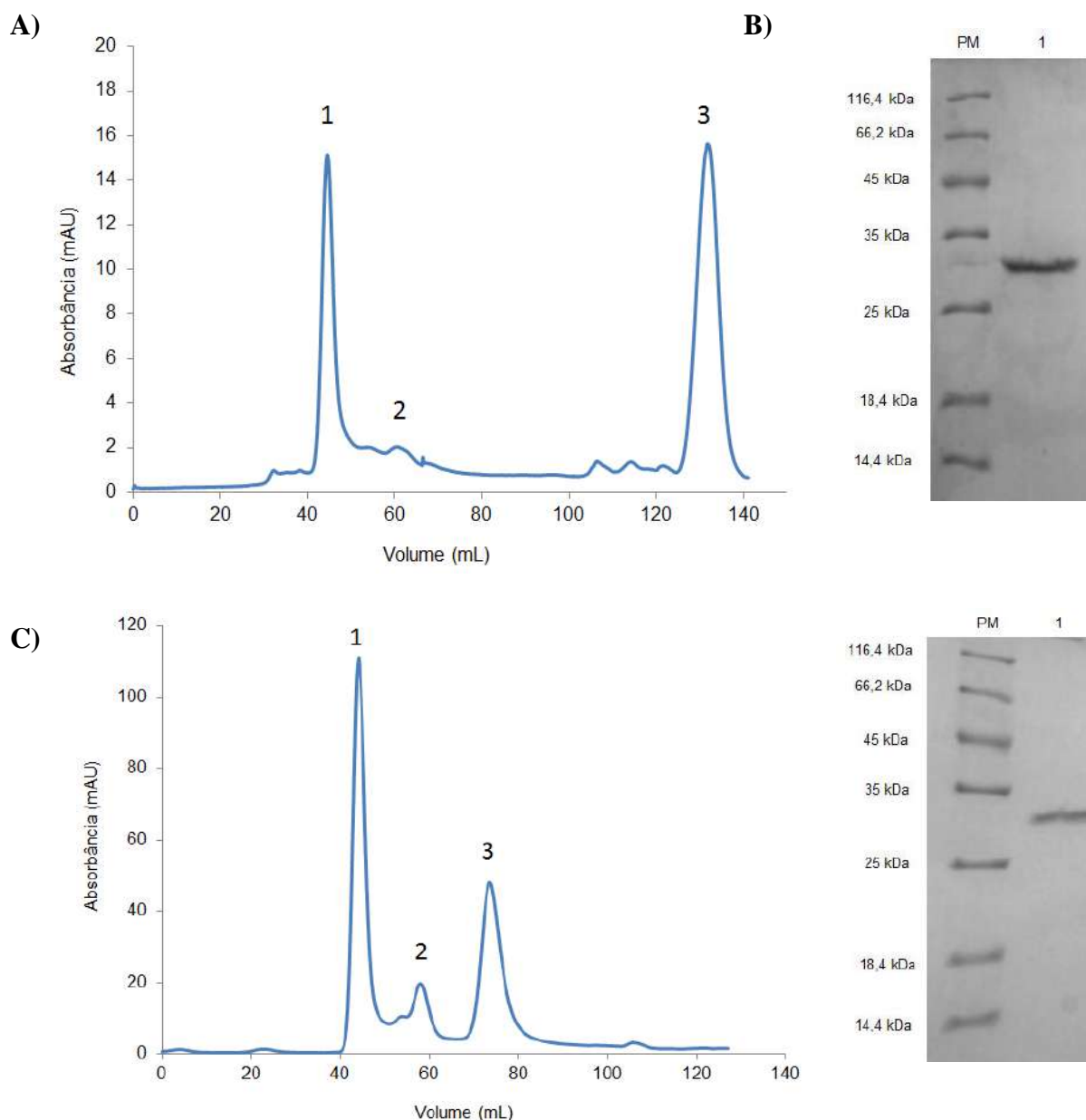
**Figura 18: SDS-PAGE 15% da purificação da lipase Pf2001Δ60 e dos mutantes F198A, W194A e W194A/F198A por cromatografia de afinidade a níquel.**

Podemos observar o padrão de massa molecular (PM), a fração não adsorvida (FT) e as frações eluídas nas concentrações de 100 mM, 150 mM e 200 mM de imidazol. A banda referente à massa molecular esperada para a lipase Pf2001Δ60 e seus mutantes (29 kDa) está indicada pela seta preta.

O monitoramento por SDS-PAGE 15% mostra que a banda referente à lipase Pf2001Δ60 selvagem está mais concentrada do que a dos três mutantes. Isto pode ser observado pela espessura da banda observada no gel (Figura 19 A). Desta forma, a baixa concentração das lipases mutantes pode levar ao desaparecimento da proteína ao longo da segunda etapa cromatográfica devido a eventuais perdas durante a purificação.

No intuito de obter as lipases de interesse com alta homogeneidade, começamos a segunda etapa cromatográfica que consistiu na cromatografia de exclusão molecular. Para isto, as frações referentes a cada proteína foram reunidas e concentradas em centricon de 10 kDa em um volume final de 5 mL de amostra para a próxima etapa de purificação. A cromatografia de gel filtração foi realizada utilizando-se a coluna HiLoad 16/600 superdex 75 (GE). No cromatograma da lipase Pf2001Δ60 foram observados três picos: um pico mais intenso referente à lipase Pf2001Δ60 em sua forma oligomérica, que saiu no volume de exclusão da coluna e, portanto, apresenta massa molecular superior a 49 kDa, um segundo pico, mais alargado, com massa molecular estimada em 28,2 kDa, correspondendo aproximadamente a massa molecular da lipase Pf2001Δ60 em sua forma monomérica (29 kDa), e um terceiro pico com massa molecular estimada menor que 4 kDa (Figura 20 A). O monitoramento das frações referentes aos picos presentes no cromatograma foram efetuados através de SDS-PAGE 15%. Neste gel podemos observar o pico 2 referente a lipase Pf2001Δ60 (Figura 20 B).

No cromatograma referente à purificação do mutante W194A foram observados os mesmos três picos evidenciados para a lipase selvagem, mostrando um perfil bem semelhante (Figura 20 C). O primeiro pico saiu no volume de exclusão da coluna, caracterizando uma amostra oligomérica, com massa superior a 49 kDa. Um segundo pico na região do volume de eluição esperado para uma amostra de 29 kDa (valor estimado 30,8 KDa), ou seja, da lipase mutante W194A, e um terceiro pico, neste caso, diferente do observado para a lipase selvagem que se refere ao imidazol livre (Figura 19 C). O monitoramento das frações referentes aos picos presentes no cromatograma foi realizado através de SDS-PAGE 15%. Neste gel podemos observar o pico 2 referente a lipase Pf2001Δ60 (Figura 20 D).



**Figura 19: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da purificação da lipase Pf2001Δ60 (A) e do mutante W194A (B) através de cromatografia de exclusão molecular.**

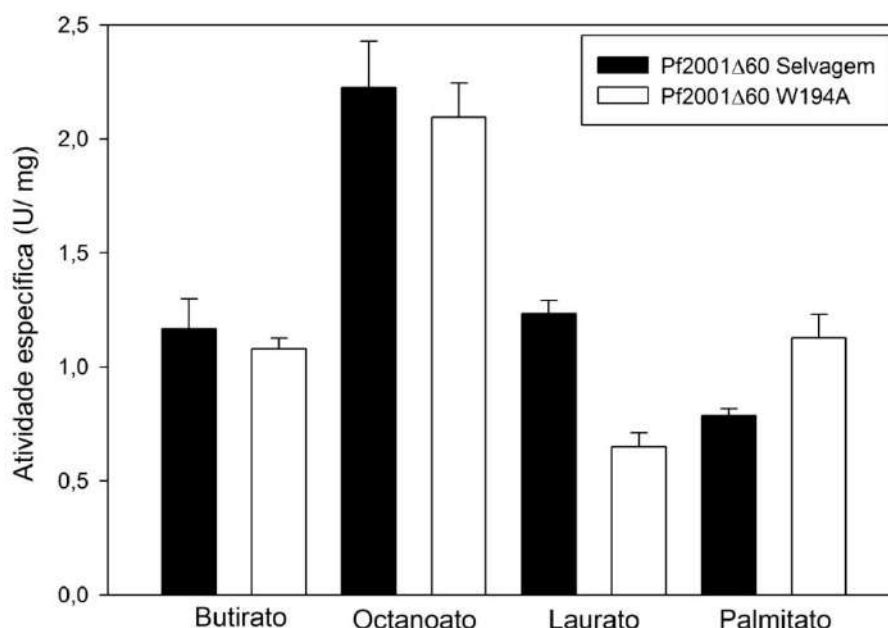
Em (A) podemos observar três picos: o primeiro pico corresponde a forma oligomérica da lipase Pf2001Δ60 saindo no volume de exclusão da coluna, um segundo pico com massa molecular aproximada de 28,2 kDa, referente à lipase em seu estado monomérico e um terceiro pico com massa molecular abaixo de 4 kDa. Em (B) monitoramento da purificação da lipase selvagem através de SDS-PAGE 15%, onde podemos observar o padrão de peso molecular e a amostra eluída no segundo pico (1). Em (C) podemos observar três picos, o primeiro referente à forma oligomérica do mutante W194A, eluído no volume de exclusão da coluna, o segundo pico referente ao mutante no estado monomérico (30,8 kDa) e o terceiro pico com massa molecular de aproximadamente 17,9 kDa. Em (D) monitoramento da purificação do mutante através de SDS-PAGE 15%, onde podemos observar o padrão de peso molecular e a amostra eluída no segundo pico (1). As setas pretas indicam a banda referente à proteína de interesse na massa molecular esperada.

Os cromatogramas referentes aos mutantes F198A e W194A/F198A mostraram baixa resolução impossibilitando a purificação destas enzimas (dados não mostrados). Dessa forma, não foi possível obter uma fração purificada destes mutantes para a continuidade do trabalho. Assim, os ensaios de caracterização foram realizados apenas para a lipase selvagem Pf2001 $\Delta$ 60 e o mutante W194A.

As frações referentes aos picos de interesse contendo a lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e o mutante W194A foram reunidas em amostras únicas com alto grau de pureza. Em seguida, as concentrações de proteína por amostra foram medidas e diluídas para uma concentração final de 3  $\mu$ M (0,087 mg/ mL) tanto para lipase selvagem quanto para o mutante W194A, no intuito de mantê-las diluídas para evitar a oligomerização. As amostras foram então separadas em frações de 1mL e congeladas para posterior utilização para os ensaios de atividade e termoestabilidade.

#### *4.5 – Atividade enzimática da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 e do mutante W194A utilizando diferentes substratos*

Ensaio de atividade enzimática utilizando substratos com diferentes tamanhos de cadeia carbônica foram realizados para avaliar o efeito da mutação W194A na especificidade à substratos da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 (Figura 20). É possível observar que em todos os substratos testados a lipase selvagem e o mutante apresentam comportamento semelhante, mantendo uma maior afinidade por substratos de cadeia média (C8). Cabe ressaltar, que o mutante W194A mostrou um comportamento muito interessante, com aumento da atividade enzimática na presença de substratos de cadeia longa quando comparado à lipase selvagem (Figura 21). Esta mutação é de grande importância biotecnológica para o nosso grupo, pois nos direciona ao nosso objetivo principal que é a construção de novos biocatalisadores racionais para a produção de biodiesel.



**Figura 20: Atividades específicas das frações monoméricas das lipases Pf2001Δ60 (preto) e do mutante W194A (branco) na presença de substratos com variados tamanhos de cadeia carbônica**

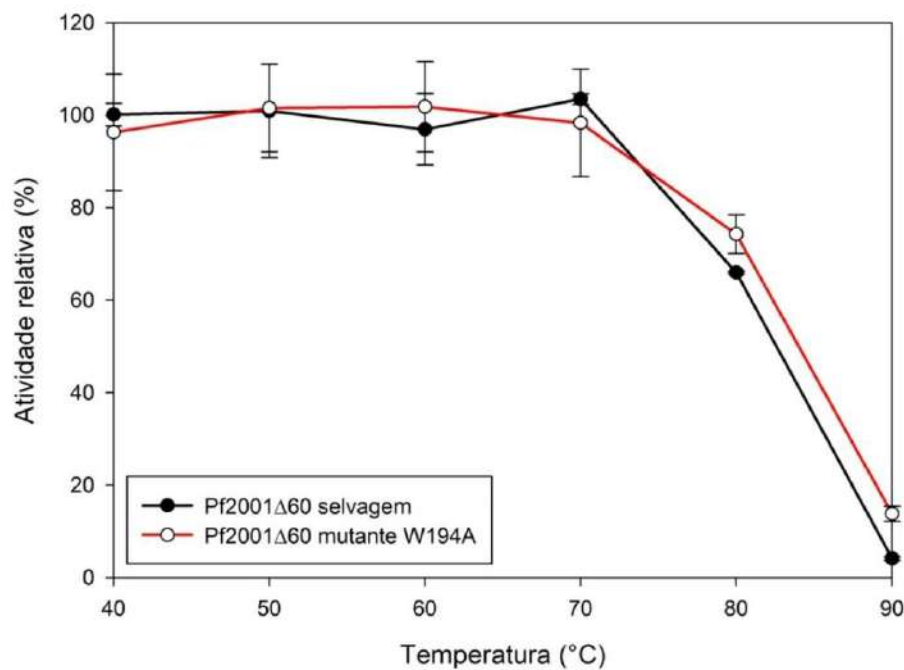
Os substratos utilizados foram: p-nitrofenil butirato (C4), p-nitrofenil octanoato (C8), p-nitrofenil laurato (C12) e p-nitrofenil palmitato (C16). Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando 3  $\mu$ M de cada uma das enzimas. A barra de erros corresponde ao desvio padrão obtido para as triplicatas.

#### 4.6 – Ensaio de termoestabilidade das lipases Pf2001Δ60 selvagem e do mutante W194A

Para os ensaios de termoestabilidade, as amostras de lipase Pf2001Δ60 selvagem e do mutante W194A na concentração de 3  $\mu$ M foram incubadas nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C por 120 minutos. Ao final desse tempo, as amostras foram utilizadas para o ensaio de atividade a 40°C, utilizando o substrato 4-metil-umbeliferil-heptanoato (C7). A atividade da amostra a 40 °C, sem incubação prévia, foi considerada como 100% para os cálculos de atividade relativa. A lipase Pf2001Δ60 selvagem e a mutante W194A apresentaram termoestabilidades semelhantes. Ambas exibiram perdas mínimas de atividade enzimática entre as temperaturas de 40 e 70°C. Em 80°C, as duas enzimas mostraram perda significativa de atividade enzimática, 34% para a enzima selvagem e 26% para o mutante W194A. Entretanto, a 90°C, pôde-se observar que o mutante W194A mostra 3 vezes mais atividade que a enzima selvagem (9,9 nmols/min.mg para selvagem vs. 31,2 nmols/min.mg para o mutante), indicando que a



mutação melhora a termoestabilidade da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 em elevadas temperaturas (Figura 22).



**Figura 21: Avaliação de termoestabilidade das lipases Pf2001 $\Delta$ 60 e do mutante W194A.**

Medidas de atividade relativa para as lipases Pf2001 $\Delta$ 60 (curva em preto) e W194A (curva em vermelho).

A atividade de ambas as enzimas sem incubação prévia foi considerada como 100% para os cálculos de atividade relativa.

## 5 – DISCUSSÃO

A biotecnologia é uma ciência versátil e representa uma via possível para alcançar a sustentabilidade da indústria química, através de processos menos custosos, produtos com cada vez mais qualidade e menor impacto ambiental gerado pelo processo (Gavrileuscu; Chisti, 2005 e Lievonen, 1999).

Nesse contexto, as enzimas desempenham um papel importante como biocatalisadores, sendo um mercado com demanda crescente e alto valor comercial. Os biocatalisadores podem operar a temperaturas mais baixas, produzem resíduos menos tóxicos e geram menos emissões e subprodutos de reação. Devido à seletividade desses biocatalisadores, a necessidade de purificar o produto e eliminar subprodutos é reduzida, o que diminui também a demanda energética do processo, assim como o impacto ambiental gerado (Gavrileuscu, Chisti, 2005).

Apesar dos processos enzimáticos apresentarem vantagens consideráveis em relação às rotas químicas, estes biocatalisadores devem ser mais eficazes em termos de custo e produção. Sendo assim, a descoberta de novos biocatalisadores com maior eficiência e seletividade, que apresentem estabilidade em altas temperaturas e que possam ser aplicados na indústria é de extrema importância (Gavrileuscu, Chisti, 2005).

Uma alternativa é o emprego de enzimas de organismos extremófilos que são intrinsecamente mais estáveis nessas condições.

Nesse cenário, o nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com a prospecção e caracterização bioquímica e estrutural de novas enzimas, especialmente lipases de organismos extremófilos no intuito de obter biocatalisadores customizados e específicos para cada tipo de bioprocessos.

A arquea de *Pyrococcus furiosus* possui seu genoma completamente sequenciado, sendo fonte não só de enzimas importantes e comercialmente distribuídas, como a DNA polimerase (pfu), amplamente utilizada na técnica de PCR, como também, de outros biocatalisadores em potencial. Sendo assim, a prospecção da enzima Pf2001Δ60 foi realizada, inicialmente, através do estudo *in silico* do seu gene que codificava domínios conservados para as famílias das  $\alpha/\beta$  hidrolases, dipeptidil aminopeptidases, esterases e lipases (Almeida *et al.*, 2006).

Para a clonagem da lipase Pf2001Δ60 selvagem, os 60 primeiros nucleotídeos, referentes ao peptídeo sinal, foram deletados evitando a agregação da proteína e o vetor de clonagem utilizado foi o plasmídeo pET25b inserindo à proteína uma cauda de

histidina (Almeida, 2001, Almeida *et al.*, 2006). Após a etapa de clonagem, expressão e purificação foram realizados estudos de caracterização estrutural da enzima frente a desnaturantes químicos e físicos. Os estudos de termoestabilidade e atividade enzimática revelaram que a lipase é estável na faixa de temperatura de 25 a 75°C (Figura 5) (Varejão, 2010, De Andrade, 2016). Além disto, a lipase Pf2001Δ60 apresenta elevada estabilidade na presença de ureia e guanidina. Em ureia, a proteína mostrou maior estabilidade estrutural e ativação (entre 1 e 4 M) do que em guanidina (1 M) (Figura 6) (De Andrade, 2016).

Embora a desnaturação por ureia e cloreto de guanidina seja amplamente utilizada como método para estudar o enovelamento e a estabilidade de proteínas, o seu mecanismo de ação ainda não é bem compreendido (England e Haran, 2011, Tanaka *et al.*, 2004). Isto se deve em grande parte ao número limitado de estruturas tridimensionais de proteínas determinadas na presença destes agentes desnaturantes (Tanaka *et al.*, 2004). A ureia e o íon guanidínio possuem grande semelhança estrutural, entretanto, o íon guanidínio tem uma carga positiva deslocada sobre sua estrutura plana, o que pode perturbar e enfraquecer interações eletrostáticas otimizadas entre cadeias laterais com carga (Del Vecchio *et al.*, 2002). É amplamente considerado que o cloreto de guanidina é aproximadamente duas vezes mais eficaz do que a ureia na sua capacidade para desnaturar proteínas (De Andrade, 2012, De Andrade, 2016, Xia *et al.*, 2012).

A determinação estrutural da lipase Pf2001Δ60 foi realizada através de cristalografia e difração de raios-x (PDB ID 5G59) evidenciando um único domínio e o enovelamento  $\alpha/\beta$  hidrolases característico desta família de enzimas, com a tríade catalítica em suas posições esperadas. A estrutura mostrou ainda uma região móvel na estrutura da lipase, com característica muito hidrofóbica, descrita como um subdomínio tampa (Figura 7). Cabe ressaltar que não foram encontrados homólogos estruturais nos bancos de dados para esta proteína, o que pode indicar que a lipase Pf2001Δ60 seja a primeira proteína a ter sua estrutura determinada em um novo grupo estrutural da família das lipases (De Andrade, 2016).

Estudos anteriores através de simulação de dinâmica molecular (SDM) indicaram que a lipase Pf2001Δ60 apresenta baixa flexibilidade conformacional (De Andrade, 2016). Isso é esperado para proteínas de organismos hipertermófilos que são reconhecidas por mostrarem menor flexibilidade que suas homólogas mesófilas devido a um número aumentado de interações intramoleculares (Cambillau e Claverie, 2000, Reed *et al.*, 2013, Szilágyi e Závodszky, 2000, Suhre e Claverie, 2003, Ueno *et al.* 2016,

Vielle e Zeikus, 2001). Entretanto, a hélice  $\alpha 5$  e a hélice  $\alpha 6$  situadas próximo ao sítio ativo mostraram uma flutuação significativa do RMS (Figura 8). Os dados de SDM obtidos no tempo de simulação utilizado (200 ns) não permite inferir sobre eventos que ocorrem na escala de milissegundos a segundos, como mudanças conformacionais tais como a abertura da tampa de uma lipase. Entretanto, a posição das hélices  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  no topo da cavidade do sítio ativo e sua dinâmica térmica diferenciada em relação ao restante da proteína nos faz sugerir que estas hélices constituam a tampa da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 (De Andrade, 2016).

É sabido que mutações no subdomínio em tampa de algumas lipases têm alterado características importantes dessas enzimas, tais como atividade enzimática, seletividade a substrato e termoestabilidade (Gao *et al.*, 2011, Karkhane *et al.*, 2009, Santarossa *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2012).

Neste contexto, com base na estrutura tridimensional e nas simulações de dinâmica molecular da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 construímos, de forma racional, os mutantes W194A, F198A e W194A/F198A. Estas mutações se situam no subdomínio em tampa da lipase Pf2001 $\Delta$ 60, região esta, já descrita para outras lipases, como importantes podendo levar a modificações nas características bioquímicas e estruturais sem perda de atividade enzimática.

Desta forma, os plasmídeos foram transformados utilizando cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) e DH5 $\alpha$  para expressão e estoque, respectivamente. Diversos protocolos de expressão da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 já foram descritos pelo nosso grupo (Moura *et al.*, 2011, Almeida *et al.*, 2006, De Andrade, 2012, De Andrade, 2016). Com base nestes resultados, realizamos testes de expressão para as lipases Pf2001 $\Delta$ 60 selvagem e seus mutantes W194A, F198A e W194A/F198A (Figuras 15 e 16). Todas as lipases apresentaram condições de crescimento ótimas em meio mínimo a 30°C com indução de 1mM de IPTG em DO<sub>600nm</sub> de 1,0 (Figura 16).

A purificação da lipase selvagem e dos mutantes foram realizadas através de cromatografias de afinidade e exclusão molecular. A cromatografia de afinidade foi realizada utilizando uma matriz carregada com níquel e as eluições feitas utilizando diferentes concentrações de imidazol (Figura 18). Cabe ressaltar que o melhor resultado foi obtido para a lipase selvagem mostrando uma maior concentração de proteína parcialmente purificada quando comparado aos mutantes.

Em seguida, as amostras parcialmente purificadas foram concentradas e aplicadas em coluna de exclusão molecular HiLoad 16/600 superdex 75 (GE) utilizando

sistema Akta plus. Os resultados obtidos indicaram que as amostras da lipase selvagem e do mutante W194A apresentaram alto grau de pureza, que são necessários para os ensaios de atividade e termoestabilidade (Figura 19). Os resultados obtidos para os mutantes F198A e o duplo mutante W194A/F198A não foram satisfatórios necessitando de otimização nos protocolos de purificação para a continuidade dos estudos.

Os ensaios de atividade enzimática na presença de substratos com diversos tamanhos de cadeia carbônica foram realizados para analisar o efeito da mutação W194A na especificidade da lipase Pf2001 $\Delta$ 60 a substratos. Os resultados indicaram que ambas possuem comportamento muito semelhante, com preferência para substratos de cadeia média (C8) como descrito anteriormente para a lipase selvagem (Almeida *et al.*, 2006, De Andrade, 2012, De Andrade, 2016) (Figura 21). Entretanto, uma particularidade muito interessante foi observada para o mutante W194A. Na presença do substrato palmitato (C16), o mutante W194A apresentou maior atividade enzimática do que a lipase selvagem mostrando maior afinidade à substratos de cadeia longa. Do ponto de vista biotecnológico, este resultado é bastante interessante, pois lipases que aceitam substratos de cadeia longa podem ser biocatalisadores em potencial na indústria do biodiesel, sendo estes, um dos objetivos do nosso grupo de pesquisa. Além disto, este comportamento sugere, que a modificação nos aminoácidos do subdomínio tampa realmente afeta a atividade da proteína Pf2001 $\Delta$ 60, segundo descrito por De Andrade, 2016.

Diversos trabalhos têm mostrado que os resíduos do subdomínio em tampa são importantes para a atividade e a especificidade de lipases, assim como visto para a lipase Pf2001 $\Delta$ 60.

Santarossa *et al.* (2005), ao realizar mutações em resíduos do subdomínio em tampa da lipase de *Pseudomonas fragi*, observaram um aumento na atividade relativa para tricaprilina de até 63% (mutante T138N) e de até 81% para trilaurina (mutante S141G).

Holmquist *et al.* (1994) demonstraram através de mutações sitio-dirigidas, a importância do resíduo de triptofano 89, presente no subdomínio em tampa da lipase de *Thermomyces lanuginosus*. A mutação deste resíduo por outros menos hidrofóbicos levou a redução da atividade de hidrólise para tributirina: 13,9% da atividade da lipase selvagem para o mutante W89F, 7,7% para o mutante W89L, 5,5% para o mutante W89G e apenas 1,2% para o mutante W89E. Estes dados sugerem que o resíduo de triptofano 89 é importante para a ligação do substrato a enzima.

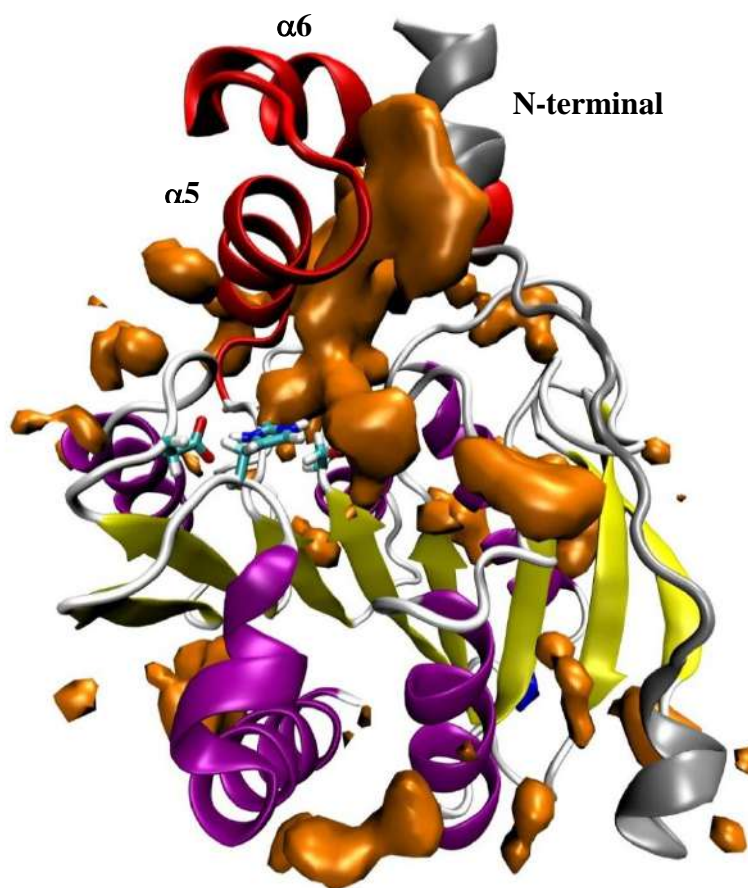
Karkhane *et al.* (2009) realizaram mutações na tampa da lipase de *Bacillus thermocatenulatus*, substituindo os resíduos do subdomínio em tampa F181 e/ou F182 por alaninas. A distância entre o grupamento fenil da cadeia lateral da fenilalanina 181 e o grupamento hidroxila da serina 114 catalítica é de apenas 7,97 Å na lipase selvagem. Isto gera um impedimento estérico e limita o acesso das moléculas de substrato a este resíduo. A mutação F181A substituiu a cadeia lateral volumosa da fenilalanina por uma metila, o que permitiu aumentar a distância entre as cadeias laterais para 11,21 Å. Desta maneira, a especificidade a substrato da enzima foi alterada de tributirina (C4) para tricaprilina (C8), mostrando um aumento de 2,6 vezes na atividade para este substrato. Além disso, a mutação F181A aumentou a atividade da lipase para toda a gama de triglicerídeos testados: 2,2 vezes para tributirina (C4), 1,1 vezes para tricaproína (C6), 1,1 vezes para tricaprina (C10), 1,6 vezes para trilaurina (C12), 1,2 vezes para trimiristina (C14), 1,4 vezes para tripalmitina (C16) e 1,6 vezes para trioleína (C18). A mutação F182A também alterou a especificidade a substrato da lipase de tributirina para tricaprilina, aumentando a atividade da enzima em 1,5 vezes para este substrato. Para os outros substratos testados, a atividade deste mutante foi similar (C12, C14 e C18) ou menor do que a selvagem (C4, C6, C10 e C16). O duplo mutante (F181A-F182A) mostrou menor atividade para todos os substratos testados, e também mostrou preferência por tricaprilina (De Andrade, 2016).

Organismos extremófilos oferecem enzimas de grande utilidade, capazes de ampliar a gama de condições de reação adequadas para a biocatálise. Em particular, os organismos hipertemófilos, são fonte de enzimas termoestáveis, sendo capazes de atuar mesmo em temperaturas muito altas (Atomi, 2005). Sendo assim, analisamos a termoestabilidade das lipases Pf2001Δ60 e W194A, a fim de determinar a temperatura máxima de operação associada à manutenção da atividade das enzimas. Podemos observar a manutenção de praticamente 100% da atividade de ambas as lipases até a temperatura de 70°C, em seguida há uma redução drástica da atividade nas temperaturas de 80 e 90°C (Figura 21). A lipase mutante apresentou comportamento muito próximo ao da lipase selvagem. Entretanto, para temperaturas acima de 70°C podemos observar que o mutante possui 3 vezes mais atividade que a lipase selvagem. Sugerindo também, que modificações na região da tampa, podem contribuir para melhora da termoestabilidade desse biocatalisador.

De uma forma geral, nossos resultados indicam que o mutante W194A possui características muito similares à lipase selvagem, embora, tenha demonstrado um

aumento significativo na afinidade à substratos de cadeia longa, como também, em sua termoestabilidade.

Estes resultados podem ser extrapolados ao estudarmos a estrutura tridimensional da lipase selvagem. Dados de simulação de dinâmica molecular levaram a detecção de cavidades na lipase Pf2001 $\Delta$ 60, representadas como superfícies sólidas em laranja (Figura 23). Apesar desta proteína possuir uma grande quantidade de cavidades, focamos na cavidade do sítio ativo, que é a maior existente na proteína. Esta cavidade apresenta abertura na superfície da proteína e se aprofunda acompanhado o sítio ativo em direção ao interior da proteína. A  $\alpha$ -hélice 5 flanqueia seu lado esquerdo, a  $\alpha$ -hélice 6 flanqueia sua parte posterior, enquanto que a porção N-terminal constitui o lado direito da cavidade (Figura 23).



**Figura 22: A presença de cavidades na proteína Pf2001 $\Delta$ 60.**

As cavidades detectadas na proteína foram representadas pelas superfícies sólidas coloridas em laranja. É importante notar que a principal cavidade detectada na proteína faz o delineamento do seu sítio ativo, distribuindo-se entre os resíduos Ser-149, Asp233 e His 264 e se posicionando entre as hélices.

O resíduo de triptofano mutado por uma alanina na posição 194 na hélice- $\alpha$ 6 pode levar a uma maior flexibilidade local devido ao menor tamanho de sua cadeia lateral podendo facilitar a entrada de substratos de cadeias maiores, como o observado para o palmitato.

Estudos de modelagem, simulação de dinâmica molecular e docking dos mutantes W194A, F198A e W194A/F198A na presença dos diferentes substratos estão sendo realizados para a confirmação dos resultados experimentais obtidos.



## 6 – CONCLUSÃO

- Os genes que codificam as lipases selvagem Pf2001Δ60 e os mutantes W194A, F198A e W194A/F198A foram clonados e transformados em células competentes Rosetta (DE3) e DH5α para expressão e estoque, respectivamente.
- Após estudo da cinética de expressão da proteína, variando parâmetros como temperatura, concentração de indutor e meio de expressão, foi possível obter a melhor condição de superexpressão das construções. A melhor condição de expressão foi obtida em meio mínimo a 30°C com indução com 1 mM de IPTG em DO<sub>600nm</sub> 1,0.
- Após crescimento e lise celular as proteínas foram obtidas na fração solúvel
- A purificação da lipase Pf2001Δ60 e dos mutantes W194A, F198A e W194A/F198A foram realizadas através de cromatografias de afinidade e exclusão molecular. Entretanto, somente a lipase Pf2001Δ60 e o mutante W194A resultou em uma amostra com alto grau de pureza.
- A partir das frações purificadas da lipase Pf2001Δ60 e do mutante W194A foram realizados ensaios de atividade e termoestabilidade.
- Os ensaios de atividade sugerem que a lipase Pf2001Δ60 e o mutante W194A possuem maior afinidade por substratos de cadeia média (C7, C8). Contudo, a lipase mutante apresentou um comportamento bastante interessante pois evidenciou maior atividade para substratos de cadeia longa quando comparada à lipase selvagem.
- Os ensaios de termoestabilidade da lipase Pf2001Δ60 e do mutante W194A evidenciaram atividade até a temperatura de 70°C. Para temperaturas acima desse valor, a lipase selvagem apresentou três vezes mais atividade do que a lipase selvagem.
- Nossos resultados demonstraram que o mutante W194A da lipase Pf2001Δ60 possui características interessantes do ponto de vista biotecnológico podendo levar ao melhoramento da enzima para a utilização em bioprocessos como na produção do biodiesel. Além disto, este estudo evidencia a importância dos estudos estruturais para a obtenção de mutantes racionais.
- Perspectivas futuras: melhorar a purificação dos mutantes F198A e W194A/F198A, realizar ensaios de caracterização bioquímica para ambos, determinar os parâmetros cinéticos de todos os mutantes, estudar a estrutura dos mutantes através de técnicas de dicroísmo circular, fluorescência e RMN associados à técnica de simulações de dinâmica molecular.

## 7 – REFERÊNCIAS

Almeida, R. V., Clonagem, expressão e caracterização do gene de uma lipase de *P. furiosus*. D.Sc.; Programa de Engenharia Química – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

Almeida, R. V., Alquéres, S. M. C., Larentis, A. L., Rössle, S. C., Cardoso, A. M., Almeida, W. I., Bisch, P. M., Alves, T. L. M., Martins, O. B., Cloning, expression, partial characterization and structural modeling of a novel esterase from *P. furiosus*, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1128-1136, 2006.

Almeida, R. V., Branco, R. V., Peixoto, B., Lima, C. S., Alquéres, S. M. C., Martins, O. B., Antunes, O. A. C., Freire, D. M. G., Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification, *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 531-537, 2008.

Alquéres, S. M. C., Branco, R. V., Freire, D. M. G., Alves, T. L. M., Martins, O. B., Almeida, R. V., Characterization of the Recombinant Thermostable Lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus*: Effects of Thioredoxin Fusion Tag and Triton X-100, *Enzyme Research*, 2011.

Andualema, B., Gressesse, A., Microbial lipases and their industrial applications: Review, *Biotechnology*, v. 11, n° 3, p. 100-118, 2012.

Anobom, C.D., Pinheiro, A.S., De-Andrade, R.A., Aguiéras, E.C.G, Andrade, G.C., Moura, M.V.H., Almeida, R.V., Freire, D.M., From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases; *BioMed Research International*, v. 2014, 11 pages, 2014.

Aransiola, E. F., Ojumu, T.V., Oyekola, O.O., Madzimbamuto, T.F., Ikhu-Omoregbe, D.I.O., A review of current technology for biodiesel production: State of the art, *Biomass and bioenergy*, v. 61, p. 276-297, 2014.

Atomi, H., Imanaka, T., Thermostable carboxylesterases from hyperthermophiles, *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 15, p. 2729–2735, 2004.

Barbe, S., Lafaquière, V., Guieysse, D., Monsan, P., Siméon, M. R., André, I., Insights into lid movements of Burkholderia cepacia lipase inferred from molecular dynamics simulations; *Proteins*, v. 77, p. 509-523; 2009.

Barbe, S., Cortés, J., Siméon, T., Monsan, P., Siméon, M. R., André, I., A mixed molecular modelingrobotics approach to investigate lipase large molecular motions, *Proteins*, v. 79, p. 2517–2529, 2011.

Bautista, L. F., Vicente, G., Mendoza, A., Gonzalez, S., Morales, V., Enzymatic Production of Biodiesel from Nannochloropsis gaditana Microalgae Using Immobilized Lipases In Mesoporous Materials, *Energy Fuels*, v. 29, p. 4981–4989, 2015.

Bisen, P.S., Sanodiya, B.S., Thakur, G.S., Baghel, R.K., Prasad, G.B., Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification, *Biotechnol Lett*, v. 32, p. 1019-1030, 2010.

Bordes, F., Barbe, S., Escalier, P., Mourey, L., Mourey, L., André, I., Marty, A., Tranier, S., Exploring the Conformational States and Rearrangements of Yarrowia lipolytica Lipase, *Biophysical Journal*, v. 99, p. 2225–2234, 2010.

Bornscheuer U. T.; Huisman G. W.; Kazlauskas R. J.; Lutz S., Moore J. C.; Robins K., “Engineering the third wave of biocatalysis,”*Nature*, vol.485, pp.185–194, 2012.

Bradford, M.M.; A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding; *Analytical Biochemistry*; v.72.p. 248554, 1976.

Cambillau, C., Claverie, J.M., Structural and Genomic Correlates of Hyperthermostability, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n° 42, p. 32383-32386, 2000.

Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., Marty, A., Lipases: an overview. *Methods in Molecular Biology* 2012; 861:3–30.

Cavicchioli R., Amils R., Wagner D., McGenity T., Life and applications of extremophiles. *Environ. Microbiol.*, 2011.

Choi JM, Han SS, Kim HS, Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspect. *Biotechnol Adv* 2015, 33:1443–1454.

Cunha D. A. B., Estudos Estruturais e Comparativos entre as Lipases B de *Candida antarctica* (CalB) produzidas em diferentes plataformas de expressão, M.Sc., Programa de Pós Graduação em Bioquímica – IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2013.

Daiha, K. G., Angeli, R., Oliveira, S. D., Almeida, R. V., Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting, *Plos one*, 2015.

Dauids T., Schimidt M., Böttcher D., Bornscheuer U.T., DStrategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis, *Science Direct*, 2013.

De-Andrade, R. A., Caracterização estrutural da lipase Pf2001 de *Pyrococcus furiosus* fusionada à Tio redoxina: estabilidade à temperatura e a agentes desnaturantes, M.Sc.,

Del Vecchio, P., Graziano, G., Granata, V., Barone, G., Mandrich, L., Rossi, M., Manco, G., Denaturing action of urea and guanidine hydrochloride towards two thermophilic esterases, *Biochemical journal*, v. 367, p. 857-863, 2002.

Programa de Pós Graduação em Bioquímica – IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2012.

De-Andrade, R. A., Estudos estruturais e de dinâmica da lipase Pf2001 de *Pyrococcus furiosus*, D.Sc., Programa de Pós Graduação em Bioquímica – IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2016.

Elleuche, S., Schroder, C., Sahm, K., Antranikian, G., Extremozymes-biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms, *Curr Opin Biotechnol*, v. 29, p. 116–123, 2014.

England, J. L., Haran, G., Role of Solvation Effects in Protein Denaturation: From Thermodynamics to Single Molecules and Back, *Annu Rev Phys Chem.*, v. 62, p. 257-277, 2011.

Fiala G., Stetter KO., *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C. Arch Microbiol 1986;145:56–61.

Floudas C. A., Fung H. K., Mcallister S. R., Minigmann M., Rajgaria R., Advances in protein structure prediction and de novo protein Design: A review; Chemical Engineering Science; v. 61, p. 966-988; 2006.

Fuciños P., González R., Atanes E., Sestelo A. B., Pérez-Guerra N., Pastrana L., et al. . (2012). Lipases and esterases from extremophiles: overview and case example of the production and purification of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27. Methods Mol. Biol. 861, 239–266. 10.1007/978-1-61779-600-5\_15. Pubmed

Fujinami S., Fujisawa M., Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes—past, present and future. Environ. Technol 2010, 31, 845–856.

Fülöp, V., Bocskei, S., Polgár, L., Prolyl Oligopeptidase: An Unusual  $\beta$ -Popeller Domain Regulates Proteolysis, Cell, v. 94, p. 161-170, 1998.

Gao, B., Xu, T., Lin, J., Zhang, L. Sua, E., Jiang, Z., Wei, D., Improving the catalytic activity of lipase LipK107 from *Proteus* sp. by site-directed mutagenesis in the lid domain based on computer simulation. J. Mol. Catal. B: Enzymol., v. 68, p. 286–291, 2011.

Gavrilescu M., Chisti Y., Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. Biotechnology Advances, v. 23, n. 7-8, p. 471–499, 2005.

Gog, A., Roman, M., Tosa, M., Paizs, C., Irimie, F.D., Biodiesel production using enzymatic transesterification e current state and perspectives, Renew Energy, v. 39, p. 6-10, 2012.

Gurung N., Ray S., Bose S., Rai V., A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine and beyond. Biomed 2013, 1-18.

Gutteridge A., Thorton J. M., Understanding nature's catalytic toolkit. Trends in Biochemistry Science, v. 30, p. 622–629, 2005.

Holmquist, M., Martinelle, M., Clausen, I.G., Patkar, S., Svendsen, A., Hult, K., Trp89 in the Lid of *Humicola lanuginosa* Lipase Is Important for Efficient Hydrolysis of Tributyrin, *Lipids*, v. 29, n°. 9, 1994.

Heikinheimo, P.; Goldman, A.; Jeffries, C.; Ollis, D.; Of barn owls and bankers: a lush variety of  $\alpha/\beta$  hydrolases, *Structure*, v.7, p. 141-146, 1999

Jaeger, K., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T., Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, *Annual Reviews in Microbiology*, v. 53, p. 315-351, 1999.

Jaeger K., Eggert T., “Lipases for biotechnology,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol.13, no.4, pp.390–397, 2002.

Karkhane, A. A., Yakhchali, B., Jazii, F. R., Bambai, B., The effect of substitution of Phe (181) and Phe (182) with Ala on activity, substrate specificity and stabilization of substrate at the active site of *Bacillus thermocatenuatus* lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 61, p. 162–167, 2009.

Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C.C., Industrial enzyme applications. *Current Opinion Biotechnology* 2002, 13:345–35.

Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C., Industrial enzyme applications, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 345–351, 2002.

Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, v. 193, p. 680-685, 1970.

Lee S., Surma M., Hausner W., Thomm M., Boos W., The role of TrmB and TrmB-like transcriptional regulators for sugar transport and metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Arch Microbiol.* 2008; 190:247–256

Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P., Chatonnet, A., ESTHER, the database of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions, *Nucleic Acids Research*, p. 1-7, 2012.

Li, S. *et al.* Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. Computational and structural biotechnology journal, v. 2, n. September, p. e201209017, 2012.

Lievonen, J., Technological opportunities in biotechnology, Espoo, Finland: VTT, Group for Technological Studies; 1999.

Liu, Y., Liu, T., Wang, X.F., Xu, L., Yan, Y.J., Biodiesel synthesis catalyzed by Burkholderia cenocepacia lipase supported on macroporous resin NKA in solvent-free and isooctane systems, Energy Fuel, v.25, p. 1206-1212, 2011.

Moura, M. V. H., Clonagem e expressão da Lipase Pf2001 $\Delta$ 60 de Pyrococcus furiosus na levedura Pichia pastoris, M.Sc., Programa de Pós Graduação em Bioquímica – IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2011.

Nardini, M., Dijkstra, B. W., 1999,  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold Enzymes: The Family Keeps Growing, Current Opinion in Structural Biology, v. 9, p. 732-737.

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M.; Harel, M., Remington, S. J., Silman, I.; Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G., Goldmans, A., The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold, Protein Engineering, v. 5, p. 197-211, 1992.

Pasques, F. W., Macedo, G. A., Lipases de latex vegetais: propriedades e aplicações industriais, Química Nova, v.29, n° 1, p.93-99, 2006.

Purohit M. K., Singh S. P., A metagenomic alkaline protease from saline habitat: cloning, over-expression and functional attributes. Int. J. Biol. Macromol 2013, 53, 138–143.

Rahman M. Z. A., Salleh A. B., Rahman R. N. Z. R. A., Rahman M. B. A., Basri M., Leow T.C., “Unlocking the mystery behind the activation phenomenon of T1 lipase: a molecular dynamics simulations approach,” Protein Science, vol. 21, pp. 1210–1221, 2012.

Reed, C.J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., Evilia, C., Protein Adaptations in Archaeal Extremophiles, Archaea, volume 2013, 2013.

- Robles-Medina A., Gonzalez-Moreno, P.A., Esteban-Cerdan, L., Molina-Grima, E., Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production, *Biotechnol Adv*, v. 27, p. 398-408, 2009.
- Santarossa, G., Lafranconi, P. G., Alquati, C., DeGioia, L., Alberghina, L., Fantucci, P., Lotti, M., Mutations in the “lid” region affect chain length specificity and thermostability of a *Pseudomonas fragi* lipase, *FEBS Lett.*, v. 579, p. 2383–2386, 2005.
- Salihu, A., Alam, Z., Production and applications of microbial lipases: A review, *Scientific Research and Essays*, v. 7, n° 30, p. 2667-2677, 2012.
- Sharma, S., Kanwar, S. S., Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications, *The ScientificWorld Journal*, volume 2014, 2014.
- Sharma A., Kawarabayasi Y., Satyanarayana T., (2012). Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles* 2012.
- Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R., Cold-adapted enzymes, *Annu. Rev. Biochem*, v. 75, p. 403-433, 2006.
- Suhre, K., Claverie, J.M., Genomic Correlates of Hyperthermostability, an Update, v. 278, n. 19, p. 17198-17202, 2003.
- Szilágyi, A., Závodszky, P., Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey; *Structure*; v. 8, n.5, p. 493-504, 2000.
- Tanaka, Y., Tsumoto, K., Umetsu, M., Nakanishi, T., Yasutake, Y., Sakai, N., Yao, M., Tanaka, I., Arakawa, T., Kumagai, I., Structural evidence for guanidine–protein side chain interactions: crystal structure of CutA from *Pyrococcus horikoshii* in 3 M guanidine hydrochloride, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 323, p. 185-191, 2004.
- Ueno, K., Ibarra, M., Gojobori, T., Structural adaption of extremophile proteins to the environments with special reference to hydrophobic networks, *Ecological Genetics and Genomics*, v. 1, p. 1-5, 2016.



Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., Jones, T. A., The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*, *Structure*, v. 2, n° 4, p. 293–308, 1994.

Varejão, N., Clonagem, Expressão, Purificação e Caracterização Estrutural e Funcional da Lectina de *Cratylia mollis* (rCRAMOLL 1) e da Esterase de *Pyrococcus furiosus* (PF2001Δ60), D.Sc; Programa de Química Biológica – IBqM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

Vielle, C., Zeikus, G. J.; Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, p. 1-43, 2001.

Wende A., Johansson P., Vollrath R., Dyll-Smith M., Oesterhelt D., Gröninger M., Structural and biochemical characterization of a halophilic archaeal alkaline phosphatase. *J. Mol. Biol* 2010.

Yan, Y.; Li, X.; Wang, G., Gui, X., Li, G.; Su, F.; Wang, X.; Liu, T.; Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review; *Applied Energy*, v. 113, p. 1614–1631, 2014.

Yu, X. W., Tan, N. J., Xiao, R., Xu, Y., Engineering a disulfide bond in the lid hinge region of *Rhizopus chinensis* lipase: Increased thermostability and altered acyl chain length specificity. *PLoS One*, v. 7, 2012.

Xia, Z., Das, P., Shakhnovich, E., Zhou, R., Collapse of Unfolded Proteins in a Mixture of Denaturants, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 134, n° 44, p 18266–18274, 2012.