

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO AMAZONAS-UEA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS-MBT

MBT

AURICÉLIA MATOS DA GAMA

PROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPASE
MICROBIANA

Manaus, Amazonas
agosto/2012
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO AMAZONAS-UEA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS-MBT

AURICÉLIA MATOS DA GAMA



PROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPASE
MICROBIANA .

Plano de Dissertação apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Recursos Naturais, da
Universidade do Estado do Amazonas,

como pré-requisito para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Dr. Tetsuo Yamane

Co-orientador: Dr. André Luiz
Willerding

Manaus, Amazonas
agosto / 2012
DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a vocês: pai, mãe,
meus
meus irmãos: Marcelo, Daniele, Danieu, Danilo e
Rafael. E a todos que me ajudaram na realização
deste sonho...

AGRADECIMENTOS

Nesta página muito especial gostaria de agradecer a algumas pessoas que me ajudaram nessa longa caminhada, e que estão compartilhando da conquista deste trabalho. Todos de alguma forma foram muito importante, me fizeram crescer não somente como pesquisadora, mas como pessoa...

- A Deus pelo dom da vida, pelo discernimento, força, coragem e amor que sempre demonstra para comigo. Sendo sempre fiel em suas promessas e na sua misericórdia;
- Aos meus familiares, especialmente meus pais e irmãos pela ajuda, apoio e incentivo. Pelo lar que construímos todos juntos e o amor que nos une e protege;
- Ao Dr. Tetsuo Yamane, pela orientação, oportunidades dadas, aprendizado e seu grande exemplo de vida. Posso dizer que me aproximei primeiro do ser humano e depois do pesquisador;
- Ao Dr. André L. Willerding pela co-orientação dada, suas ideias, correções e paciência;
- Ao Dr. Eduardo Brandit da USP de Ribeirão Preto pelo estágio realizado em seu laboratório de Bioquímica, pela porta sempre aberta que nos concedeu, por todo o trabalho realizado, ensinamentos, paciência e principalmente na simplicidade de está na bancada trabalhando juntos;

- A técnica Odete do laboratório de Bioquímica de Ribeirão Preto pela ajuda nos experimentos com eletroforese, na acolhida e principalmente no carinho que teve conosco.
- Aos Drs. Nóbrega e Mota por terem realizado o sequenciamento da cepa; pelas ideias e conselhos;
- Aos amigos Samara, Dácio e Isaque por todo o apoio, amizade e grande ajuda (vocês foram de uma importância tão grande em muitos momentos difíceis);
- Aos amigos do laboratório: Diego e Francisco Neto pela ajuda, parceria e paciência que tiveram comigo. Por acreditarem nas ideias, no projeto e lutarmos juntos;
- A Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza por todos os conselhos dados no decorrer desse mestrado, além do seu carinho e preocupação;
- Aos ex-companheiros de laboratório do CBA: André Santos, Alice Maria, Cleber Ricardo, Armando e Joselma pela ajuda e companherismos;
- Ao Centro de Biotecnologia do Amazonas pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, pelas portas que estiveram sempre abertas.
- Ao laboratório de Microbiologia, do CBA pelas cepas da coleção cedidas para o trabalho;
- Ao laboratório de Biorgânica, do MBT e UEA pelas cepas cedidas para o trabalho;
- Ao Dr. Álvaro Petrini do Butantan (USP) pelos ensinamentos e críticas;
- Ao Dr. Losano por ter sido um ótimo professor, fazendo eu me apaixonar por essa área de proteínas;
- A minha turma do MBT de 2010, especialmente nas parcerias e ajudas em cada disciplina cursada, além de cada professor que contribuiu para nosso crescimento;
- Aos irmãos da Comunidade Nossa Senhora do Rosário pela força e orações;
- Ao Dr. Francisco Kleber pela oportunidade de ter ido trabalhar no CBA;
- À CAPES pelo apoio financeiro;
- Enfim a todos que contribuíram de alguma forma direta ou indiretamente para realização desse trabalho;

“Acreditamos saber que existe uma saída, mas não sabemos onde está. Não havendo ninguém do lado de fora que nos possa indicá-la, devemos procurá-la nós mesmos. O que o labirinto ensina não é onde está a saída, mas quais são os caminhos que não a levam a lugar algum.”

Norberto

Bobbio

RESUMO

PROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO

DE LIPASE MICROBIANA. Universidade do Estado do Amazonas. Rua Carvalho Leal N° 1777 CEP: 69055-001. Manaus – Am, GAMA, A. M.; WILLERDING, A. L. & YAMANE, T. auri_matos@yahoo.com.br. Palavras chaves: lipases extracelulares, fungos filamentosos, purificação. Fonte financiadora: CAPES.

As lipases são enzimas que catalisam a síntese e a hidrólise de triacilglicerídeos em glicerídeos e ácidos graxos. Sua utilização como catalisador biológico tem tomado várias aplicações na indústria farmacêutica e alimentar. Sua fonte pode ser tanto de origem animal, vegetal e microbiológica. Com grande destaque para a última devido às vantagens como forma de obtenção, manuseio e grande diversidade, o que torna os fungos filamentosos uma ampla fonte de lipases. A busca por novas fontes proporciona vários trabalhos com objetivos específicos. Assim o objetivo do trabalho foi selecionar e avaliar dentre duas coleções de fungos filamentosos, possíveis produtores de lipases. Para este estudo, 316 isolados foram efetivamente testados quanto à atividade lipolítica em meio de cultura líquido indutor de lipase (óleo de oliva). Desse total, 298 (94%) apresentaram-se lipase positivos e suas atividade verificada a partir da reação de hidrólise com o substrato p-NPP com leitura no espectrofotômetro a 410 nm. Como forma de seleção, apenas os isolados que apresentaram atividade acima de 7000 U/ml foram selecionados. Com isso, somente seis isolados apresentaram atividades consideradas boas e foram submetidas a novos ensaios com a atividade enzimática em

óleo de dendê. A cepa mais promissora foi identificada através de técnicas moleculares como *Endomelanconiopsis endophytica*, produzindo uma atividade de 7895 U/mL para o óleo de oliva e 10727 U/mL para o óleo de dendê. O extrato bruto foi então purificado através da cromatografia de troca iônica, resultando em três enzimas de forma ativa (duas de 60 e uma de 46 kDa) quantificada em SDS-PAGE. E suas identidades verificadas através do espectro de massa e do sequenciamento do N-terminal, pela degradação de Edmann. Duas delas apresentaram-se bloqueadas e a de 46 kDa foi obtida sua sequência. Assim o estudo procurou contribuir para a descoberta de novas lipases com o potencial biotecnológico, contribuindo para um futuro banco de dados protéico.

Palavras-chave: lipases extracelulares, fungos filamentosos, fermentação submersa; purificação

Área de concentração: Prospecção e Uso de Recursos Naturais

Linha de pesquisa: Uso sustentável da Biodiversidade

ABSTRACT

Screening, characterization and purification of microbial lipase

Lipases are enzymes which catalyze the synthesis and hydrolysis of glycerides in triacylglycerols and fatty acids. Its use as a biological catalyst has taken various applications in the pharmaceutical and food industries. Your source may be either animal, plant and microbial. With great emphasis on the latter due to the advantages as a means of obtaining, handling and great diversity, which makes filamentous fungi an interesting source of lipases. The search for new sources provides several jobs with specific objectives. Thus the aim of this study was to evaluate and select among two collections of filamentous fungi, potential producers of lipases. For this study, 316 strains were actually tested for lipolytic activity in liquid culture medium inducing lipase (olive oil). Of this total, 298 (94%) were positive and their lipase activity observed from the hydrolysis reaction with the substrate p-NPP with reading in the spectrophotometer at 410 nm. Only isolates exhibiting activity above 7000 U / ml were selected. Thus, only six isolates showed activities considered good and underwent further testing with enzyme activity in palm oil. The most promising strain was identified through molecular techniques as *Endomelanconiopsis endophytica*, producing an activity of 7895 U/mL for the olive oil and 10,727 U/mL for palm oil. The crude

extract was then purified by ion exchange chromatography, resulting in three enzymes active form (two of 60 and one of 46 kDa) quantified by SDS-PAGE. And their identity verified by mass spectral and N-terminal sequencing by Edmann degradation. Two of them were presented blocked and the 46 kDa its sequence was obtained. Thus the study sought to contribute to the discovery of new lipases with biotechnological potential, contributing to a future database protein.

Keywords: lipases, filamentous fungi, submerged fermentation, purification

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas de acordo com a IUB.	3
Tabela 2 – Utilização das lipases no mercado mundial	8
Tabela 3 - Algumas lipases disponíveis comercialmente, suas fontes e aplicações industriais	10
Tabela 4 - Triagem de várias cepas fúngicas para a produção de lipase por fermentação	13
Tabela 5 - Recuperação da precipitação com solvente	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo estrutural da família de α/β hidrolases	6
Figura 2 – Estrutura de uma lipase de <i>Penicillium expansum</i> (Fonte: Protein data Bank)	7
Figura 3 - Estrutura de uma lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> (Fonte: Protein data Bank)	7
Figura 4 – Algumas das reações químicas realizadas pelas lipases	12
Figura 5 - Gráfico da curva-padrão para a concentração de p-nitrofenol (p-NP) em 410 nm	17
Figura 6 - Precipitação com etanol 75%	23
Figura 7 - Material precipitado após overnight	23
Figura 8 - Precipitado ao final do tratamento	24
Figura 9 - Precipitado em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8	24
Figura 10 – Histograma das cepas utilizadas na primeira seleção da atividade hidrolítica	26
Figura 11 – Evolução da atividade da lipase em meio de cultura indutor contendo óleo de dendê	27

<u>Figura 12 - Comparação entre as atividades enzimática das lipases dos seis isolados selecionados em meios de cultura com óleo de oliva e de dendê em nove dias de indução. Letras diferentes representam diferenças estatísticas dentro de cada óleo testado (Tukey p<0,05).</u>	28
<u>Figura 13 – Ceba CBA-309 em placa de petri contendo BDA</u>	29
<u>Figura 14 – Gráfico referente ao ensaio com diferentes pH.</u>	30
<u>Figura 15 – Ilustracao do PCR . em gel de agarose. ITS 1 e IT.</u>	31
<u>Figura 16 – Ilustracao do gel de quantificação da terceira diluição do DNA</u>	31
<u>Figura 17 - Alinhamento do Blast (Sequenciamento do fungo: espécie <i>Endomelanconiopsis endophytica</i>.)</u>	32
<u>Figura 18 – Gel de eletrofores, (Nu PAGE 4-12% Bis-Tris Gel, 1.5mm x 10 well) do perfil do material liofilizado; G.1a e G1.b é a mesma amostra aplicada, apenas G1.a sendo o dobro de amostra aplicada. M: marcador molecular.</u>	33
<u>Figura 19 – Gel de gradiente de poliacrilamida. Marcador com vários pesos e 15 µL das amostras B; 1 e 2.</u>	35
<u>Figura 20 – Gel de eletrofore 10%. OVA: marcador de 60 kDa; BSA: marcador d 45 kDa; B; 1 e 2: frações obtidas na Mono-Q2 dessalinizadas e liofilizadas. Diluídas com 30 µL de tampão da amostra e aplicado 15 µL.</u>	35
<u>Figura 21 – Gel de gradiente de poliacrilamida.</u>	35
<u>Figura 22 – Gel de gradiente : M: marcador; Q2.2: fração da Mono-Q2; Q3A: fração da Mono-Q3; Q3B: fração da Mono-Q3 (em uma sequencia aplicado 25 µL e outra 10 µL).</u>	36
<u>Figura 23 – Sequenciamento por espectrometria de massa, referente a banda 45 kDa (10 ul desalted w/c4, thin layer, ext.cal. w/bsa 1+ and 2+)</u>	37
<u>Figura 24 – Sequenciamento por espectrometria de massa da banda 60^a kDa</u>	37
<u>Figura 25 - Sequenciamento por espectrometria de massa da banda 60 kDa</u>	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – microlitro

μg – micrograma

DNA- ácido desoxirribonucleico

kDa – quilodalton

mg – miligrama

min – minuto

ml – mililitro

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

$^{\circ}\text{C}$ – grau Celsius

PCR – Polimerase Chain Reaction

pH – potencial hidrogeniônico

PM – peso molecular em Daltons

rpm – rotações por minuto

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio

uv – ultravioleta

BDA – batata + dextrose + Agar

Tris – tris-hidroxi-metil-aminometano

SDS – dodecil sulfato de sódio

p-NPP – palmitato de p-nitrofenila

p-NP – p-nitrofenol

TAE – tris-acetato-EDTA

pb – pares de bases

Gen-Bank – banco de sequencias de genes e proteínas do NCBI

E.C – Enzyme Comission

BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina de soro bovino)

INDICE

- 1. INTRODUÇÃO
01
- 2. REVISÃO DA LITERATURA
02
- 2.1. ENZIMAS
02
- 2.2. ENZIMAS LIPOLÍTICAS
04
- 2.3. LIPASES
05
- **2.3.1. Estrutura das lipases**
06

2.3.2. Classificação das lipases esterases
08

2.3.3. Aplicações das lipases
08

• **2.3.4. Reações Catalisadas por lipases**
11

• **2.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES**
13

• **3. OBJETIVOS**
15

• **4. MATERIAIS E MÉTODOS**
16

• **4.1. ESTERELIZACAO DOS MEIOS E MATERIAIS**
16

• **4.2. MICRORGANISMOS E MANUTENÇÃO**
16

• **4.3. SELECAO PRIMARIA DAS CEPAS PRODUTORAS DE LIPASES EXTRACELULARES**
16

• **4.4. ENSAIOS PARA DETERMINACAO DA ATIVIDADE ENZIMATICA**
17

• **4.5. SELECAO SECUNDARIA DAS CEPAS POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE LIPASES EXTRACELULAR**
18

• **4.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEINAS.**
18

• **4.6.1. Determinação do teor de proteínas**
18

• **4.6.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**
18

- 4.6.3. Gel de Eletroforese com gradiente
19
- 4.7. CINÉTICA DO EXTRATO BRUTO
19
- 4.7.1. Efeito do pH na atividade enzimática 19
- 4.7.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática 20
- 4.8. IDENTIFICACAO
20
- 4.8.1. Morfológica
20
- **4.8.2. Identificação molecular do Fungo CBA-309**
20
- **4.8.2.1.Extração do DNA**
20
- **4.8.2.2.Sequenciamento**
21
- 4.9. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO
22
- 4.9.1. Obtenção do extrato bruto
22
- 4.9.2. Precipitação do extrato bruto
22
- 4.9.2.1.Precipitação com sulfato de amônio
22
- 4.9.2.2.Precipitação com solventes orgânicos
22

- 4.9.2.3. Medida da atividade e recuperação do precipitado
23
- 4.9.3. Precipitação do extato bruto (fermentado em larga escala) em etanol
75% 23
- 4.9.4. Purção da enzima pelo método da cromatografia de troca iônica
24
- 4.9.4.1. Coluna aniônica DEAE-FF
24
- 4.9.4.2. Coluna catiônica S-Sepharose
24
- 4.9.4.3. Coluna aniônica Mono-Q
25
- 4.9.4.4. Coluna Sephadex-G25
25
- 4.9.5. Determinação de AAs do N-terminal
25
- 4.9.5.1. Análises no espectro de Massa
25
- 5. RESULTADOS E DISCURSSÕES
26
- 5.1. SELEÇÃO DAS CEPAS
26
- **5.1.1. Seleção primária**
26

- **5.1.2. Seleção secundária**
26
- **5.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO**
29
- **5.3. PRECIPITAÇÃO DO EXTRATO BRUTO**
30
- **5.3.1. Precipitação com sal**
30
- **5.3.2. Precipitação do extrato bruto com solventes**
30
- **5.4. IDENTIFICAÇÃO**
31
- **5.4.1. Identificacao Morfológica**
31
- **5.4.2. Identificação Molecular do Fungo**
31
- **5.4.3. Sequenciamento da cepa CBA-309**
32
- **5.5. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA**
33
- **5.5.1. Primeira fase da cromatografia do precipitado etanol 75%**
33
- **5.5.2. Segunda fase da cromatografia do precipitado etanol 75% (A)**
34

- **5.5.3. Segunda fase da cromatografia do precipitado etanol 75% (B)**
35

- **5.6. SEQUENCIAMENTO DAS ENZIMAS**
37

- 5.6.1. Espectro de massas**
37

- 6. CONCLUSÕES**
39

- 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
40

1. INTRODUÇÃO

As lipases (glicerol ester hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atua geralmente na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (SHARMA, et al., 2001).

A função biológica destas enzimas é primordialmente catalisar a hidrólise de triglicerídeos insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol. Entretanto, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, a maioria das lipases pode exercer sua atividade catalítica reversa, catalisando também reações de esterificação e transesterificação, entre outras. Assim, devido às diferentes reações que são capazes de catalisar e às suas características de regio e enâncio seletividade, as lipases, além de sua utilização em áreas tradicionais, como a indústria de detergentes e alimentícia, vêm sendo intensamente empregadas nos mais diversos campos: indústria farmacêutica, de química fina, óleoquímica, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais. As enzimas de interesse industrial, em especial as lipases, têm sido produzidas tradicionalmente por fermentação submersa. (FREIRE e CASTILHO, 2000; SHARMA, et al., 2001).

As lipases são encontradas amplamente na natureza, podendo ser obtida a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (CASTRO et al., 20104). Recentemente, tem crescido muito o interesse pelas lipases microbianas, devido principalmente à sua maior estabilidade, e diversidade e rendimento quando comparadas a lipases de outras fontes. Assim, a descoberta de novas lipases, a partir da seleção de microrganismos, com características desejáveis e interessantes (estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, alta especificidade em relação a certos ácidos graxos e enâncio seletividade), pode abrir promissoras perspectivas científicas e comerciais (BJORKLING, et al., 1991; SAMAD et al., 1990).

Dentro desse contexto, este trabalho pretendeu contribuir para o estudo de fungos filamentosos da região amazônica, como potenciais produtores de lipase. As cepas pertencente a duas coleções de microrganismos, foram ensaiadas tendo como indutor da enzima o óleo de oliva, e sua atividade enzimática avaliada frente a hidrolise do p-NPP. Seleccionada a cepa mais promissora, esta foi submetida a varios procedimentos que visaram a produção, extração, purificação e identificação da lipase produzida.

- 2. REVISÃO DA LITERATURA
- 2.1. ENZIMAS

A biotecnologia está baseada na procura e no uso de sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para responder às necessidades do homem. O estudo e uso das enzimas em particular, tem se desenvolvido como um dos setores majoritário, por apresentarem ampla utilização biotecnológica, com aplicação por ramos tão diversos como a medicina, farmacologia e em diversas áreas industriais, como o uso na biocatálise (BULL; WARD; GOOFELLOW, 2000). As enzimas são proteínas cuja as funções são de catalisar reações biológicas (catalisadores biológicos), possuindo uma importância fundamental e indispensável para o funcionamento das células vivas, possuindo a função de viabilizar a atividade das células quebrando moléculas ou juntando-as para formar novos compostos. Aumentando em muito a velocidade das reações em fatores de 10^6 - 10^{12} (WISEMAN, 1995).

São encontradas na natureza, produzidas por todos os seres vivos, em diferentes concentrações, podendo ser de origem animal, vegetal e microbiana (FUCINOS et al., 2005).

Diferentemente das enzimas vegetais e animais, a produção de enzimas microbianas não depende diretamente de fatores climáticos, que na maioria das vezes são incontroláveis. Somando a este fator a enorme biodiversidade dos microrganismos em variados em variados habitats , até mesmo aqueles que vivem em condições extremas (SAID e PIETRO, 2004).

Possuem uma especificidade notável pelo seu substrato, combinando entre-si para formar um complexo enzima-substrato. A formação desse complexo geralmente induz uma variação conformacional na enzima que permite se ligar mais eficientemente ao substrato. Como quase todas as enzimas são proteínas, o substrato está ligado à proteína e a reação ocorre no chamado sítio ativo. As forças não-covalentes que ligam o substrato ao sítio ativo são as mesmas forças que respondem pelas conformações das próprias proteínas: forças de van der Waals, forças eletrostáticas, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Os aminoácidos localizados no sítio ativo são arranjados de tal forma que podem interagir especificamente com o substrato. E as reações catalisadas por enzimas são completamente estereoespecíficas (BOM et al., 2008).

São classificadas e denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam. No início de sua descoberta até mais ou menos o século XIX, as enzimas eram nomeadas empregando-se o sufixo “ina”, após o nome referente à sua fonte. Alguns desses nomes ainda são usados até hoje (ex: bromelina, papaína, pancreatina, etc). No final do século XIX, E. Duclaux sugere o uso do sufixo “ase”, precedido não mais pelo nome da fonte da enzima, mas pelo nome referente ao substrato ao qual a enzima tinha afinidade, ou seja, por meio de suas propriedades catalíticas, indicadas pela ação sobre o substrato (lipase, protease, celulase, amilase, etc), sendo adotado até os dias atuais. Em 1956, a União Internacional de Bioquímica (IUB) propôs um programa para estabelecer a classificação e a nomenclatura de enzimas. E a partir de 1961 essa classificação é adotada oficialmente (ROSEVEAR et al., 1987). Estão disponível mais de 300 enzimas, de acordo com a Comissão de Enzimas (EC) da IUB e são divididas em seis classes que se baseiam na reação que catalisam. Cada enzima descrita recebe um número de classificação, conhecido por “EC” que é composto por 4 dígitos. O primeiro número designa a qual das seis classes a enzima pertence. O segundo número indica o tipo de ligação que a enzima atua. O terceiro número é uma subclassificação do tipo de ligação e o quarto número é apenas um número de série, a tabela 1 mostra o exemplo de cada classe com a respectiva reação (NELSON et al., 2006).

Tabela 1 – Classificação das enzimas de acordo com a IUB.

Classe da enzima	Tipo de reação catalisada	Exemplos
1. Oxirredutases	Catalisam reações de oxirredução. Transferência de H, O ou elétrons.	Lactato desidrogenase (E.C.1.1.2.4)
2. Transferases	Catalisam transferência de grupos entre moléculas.	Alanina aminotransferase (E.C.2.6.1.2)

3. Hidrolases	Catalisam transferência de grupos entre moléculas.	Lipase (E.C.3.1.1.3)
4. Liases	Catalisam a adição de grupos a ligações duplas e vice versa.	Piruvato descarboxilase (E.C.4.1.1.1)
5. Isomerasas	Catalisam reações de isomerização.	Alanina racemase (E.C.5.1.1.1)
6. Ligases	Catalisam a união de duas moléculas, associadas à ruptura da ligação tirofosfato do ATP.	Glutamina sintetase (E.C.6.3.1.2)

Fonte: NELSON et al., 2006.

Assim os avanços tecnológicos e científicos que ocorrem principalmente a partir do século XX favoreceram a utilização das enzimas nos mais diversos campos, passando a ocupar papéis importantes em produtos e processos industriais, permitindo que fossem empregadas em larga escala, diversificando em novas abordagens experimentais a fim de descobrir e identificar novas enzimas e estudar suas vias metabólicas secundárias (SAID e PIETRO, 2004).

• 2.2. ENZIMAS LIPOLÍTICAS

As lipases juntamente com as esterases são as maiores da classe dessas hidrolases, fazem parte de um grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídios. Essas enzimas juntamente com o grupo das celulasas constituem, atualmente, um dos mais importantes grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas (JAEGER & EGGERT, 2002). As enzimas lipolíticas possuem uma enorme importância fisiológica, uma vez que hidrolisam óleos e gorduras em diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres, que são essenciais aos processos metabólicos, como transporte dos ácidos graxos, sua oxidação e síntese de glicerídeos e fosfolipídeos (REED, 1975). As lipases e as esterases possuem as mesmas estruturas tridimensionais (dobra característica α/β das hidrolases). Apresentam a mesma tríade catalítica das serino-hidrolases e apesar de apresentarem o mesmo mecanismo de hidrólise, ou formação de éster, ser essencialmente iguais, na interação do sítio catalítico elas não são iguais, e uma das diferenças entre lipases e esterases está baseada na diferenciação de especificidade entre as duas enzimas. Enquanto os substratos naturais para as lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis

constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, as esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácido graxos de baixa massa molar (Salameh e Wiegel, 2007). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Tomic, S., 2006; Bornscheuer et al. 2002; Nini et al., 2001).

Assim sendo as lipases junto com as esterases são as enzimas lipolíticas mais importantes dentre as hidrolases, fazem parte de um grupo que estão associadas ao metabolismo dos lipídeos. Essas enzimas juntamente com o grupo das celulasas constituem, atualmente, um dos mais importante grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológica (5).

• 2.3. LIPASES

As lipases [triacilglicerol éster hidrolases, (E.C. 3.1.1.3)] são enzimas cuja função é de catalisar a reação de hidrólise e de síntese de triacilgliceróis (TGA), obtendo como produtos o glicerol e ácidos graxos livres (Brockman et al. 1998; Tsujisaka et al. 1977). São serino- hidrolases que apresentam pouca atividade em soluções aquosas contendo substratos hidrofílicos e são definidas como carboxiesterases que catalisam tanto a hidrólise quanto a síntese de acilgliceróis de cadeia longa (Colen 2006). Por catalisarem reações com substratos hidrofóbicos apresentam sua máxima atividade na interface óleo-água. Podem ser obtida a partir de fonte animal, vegetal ou microbiana. Essas enzimas juntamente com o grupo das celulasas constituem, atualmente, um dos mais importantes grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológica (Jaeger e Eggert 2002).

Dentre as várias metodologias adotadas para acompanhar a atividade da lipase presente no meio fermentativo, destacam-se os modos colorimétricos que usam de substratos sintéticos como os ésteres de ácidos graxos de p-nitrofenila (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e esterato) e o modo titulométrico (pH STAT) que usam a trioleína como substrato padrão. E o óleo de oliva têm sido uma fonte alternativa desse

substrato citada em diversos trabalhos, por ser de baixo custo e conter em média 70% de trioleína (MESSIAS, et al., 2009).

A produção das lipases tem sido desenvolvida por fermentação submersa (FSM) a mais utilizada pela indústria, tendo em vista as várias técnicas de engenharia já desenvolvidas, com associação ao crescimento microbiano e conseqüentemente, às variações da composição e condições de cultivo (SHARMA et al.; 2001). E por fermentação em substrato sólido (FES) utilizando substrato insolúveis com baixa porcentagem de água (PANDEY, 2003).

O processo de FES possuem a vantagem do baixo custo, tendo em vista o reaproveitamento de vários resíduos agroindustriais e sua desvantagem de não possuírem uma homogeneidade do meio, na limitação de transferência de massa e na dificuldade de monitorar e controlar os parâmetros operacionais. Já para a FSM a vantagem está na homogeneidade do sistema, possibilitando a transferência mais eficiente de calor, além de facilidade em controlar parâmetros como pH, temperatura e oxigenação. E sua principal desvantagem está no elevado custo do processo, que muitas vezes acaba inviabilizando a produção em larga escala. E esse um dos grandes gargalos da produção de lipases, obtidas em bancadas de laboratórios e que na maioria das vezes não chega a escala industrial (SINGHANIA et al., 2009).

• **2.3.1. Estrutura das lipases**

As lipases apresentam estruturas protéicas variáveis, no entanto possuem uma característica padrão, fazem parte da superfamília de α/β -hidrolases (estrutura terciária) que incluem as enzimas lipolíticas, cuja atividade depende principalmente de uma tríade catalítica (sítio catalítico) normalmente formada por resíduos de serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico (JAEGER et al., 1999; GILL; PARISH, 1997). Possuem um motivo estrutural conservado composto por estrutura em forma de folha β rodeadas por estruturas em α hélice, com seu sítio ativo localizado no lado C-terminal das fitas β (serina) mais especificamente na fita $\beta 5$. A figura 3 mostra os filamentos em conformação β (1-8) formando uma estrutura em folha β -pregueada, que estão sendo indicadas por setas, e estruturas na forma de α -hélices (A-F), indicadas pelas colunas e por último as posições relativas dos aminoácidos pertencentes a tríade catalítica indicadas pelos quadrados (BORNSCHEUER, 2002; ARPIGNY et al., 1999).

O dobramento α/β -hidrolases e a tríade catalítica foram observadas inicialmente em serina proteases e após em várias serina hidrolases. Essas proteínas não possuem alta similaridade em relação às suas sequências de aminoácidos, mas estudos indicam que divergiram a partir de uma proteína ancestral comum ao longo da evolução (NARDINI; DIJKSTRA, 1999). O resíduo nucleófilo catalítico em lipases é a serina, localizada na porção C-terminal da fita β_5 e no centro de um pentapeptídeo altamente conservado Gly-X-Ser-X-Gly (onde “X” se refere a qualquer aminoácido) (JAEGER et al., 1994).

Figura 1- Modelo estrutural da família de α/β hidrolases.

Fonte: Adaptado de (BORNSCHEUER, 2002).

Essas enzimas apresentam massa molecular entre 20 a 75 kDa com aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos. Possui atividade na faixa de pH que vai de 4 a 9 e temperatura que varia entre 25 e 70 °C, destacando as lipases microbianas por possuírem maior estabilidade térmica (CARVALHO et al., 2003; CASTRO et al., 2004).

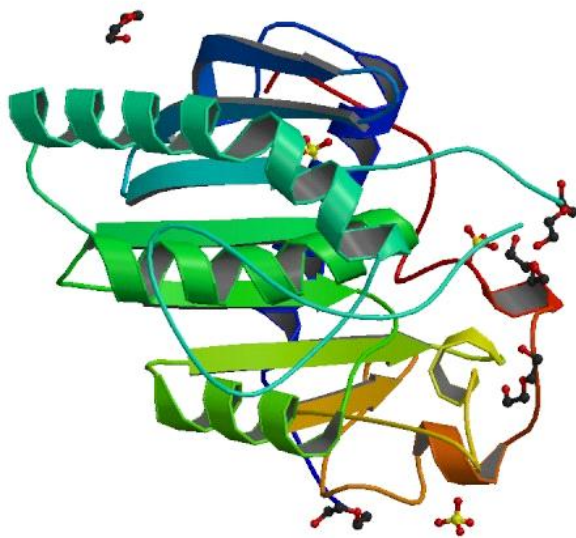
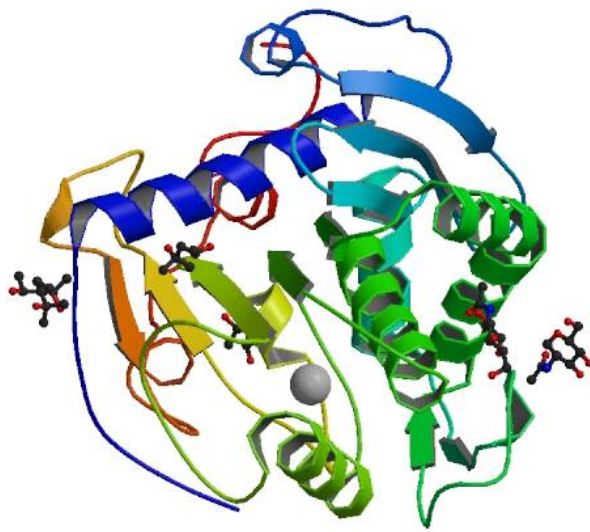


Figura 2 – Estrutura de uma lipase de *Penicillium expansum* (Fonte: Protein data Bank)
Figura 3 - Estrutura de uma lipase de *Yarrowia lipolytica* (Fonte: Protein data Bank)

Mecanismo de Reação das Lipases

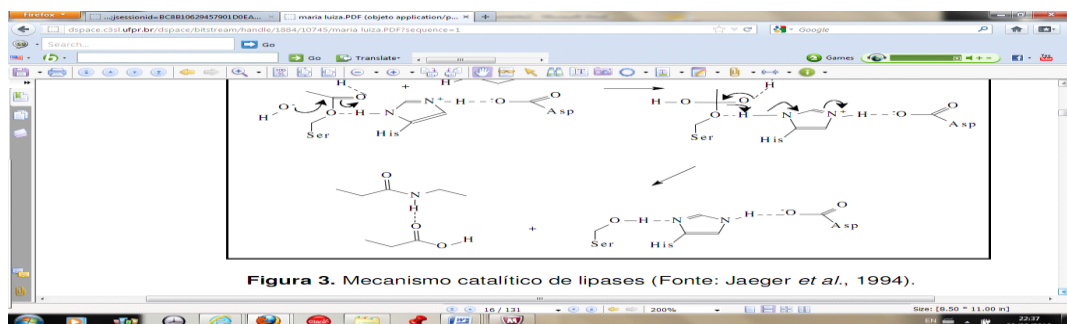
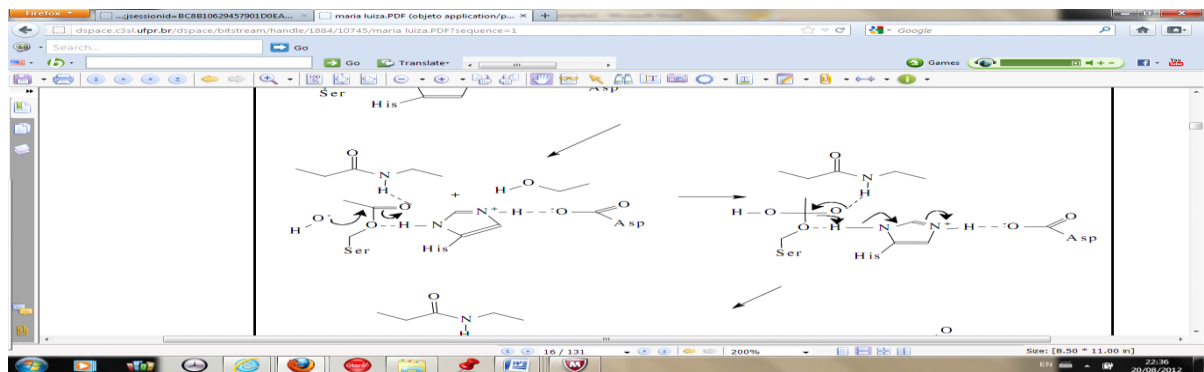
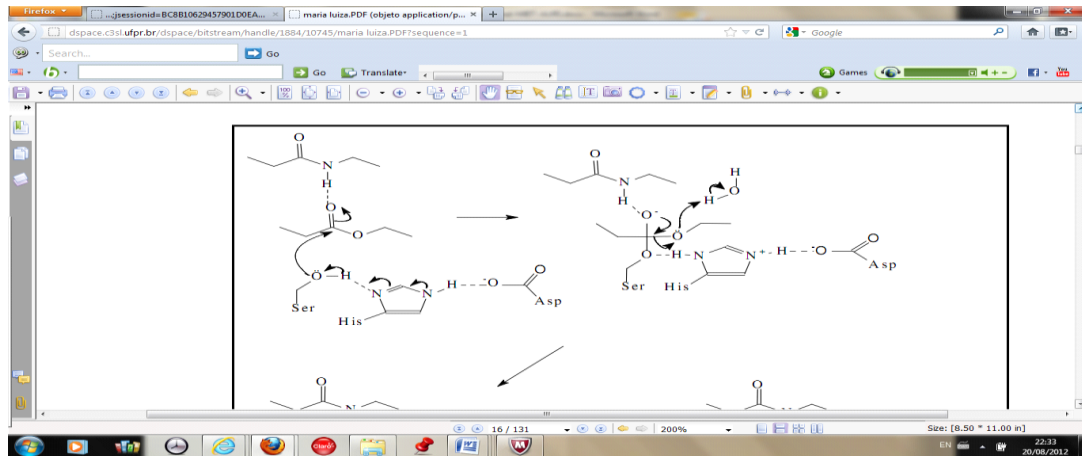


Figura 4 – Mecanismo catalítico proposto para lipases (JAEGER, 1999)

• **2.3.2. Classificação das lipases e esterases**

As lipases e esterases são classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos e suas propriedades, em oito famílias. As lipases verdadeiras compreendem os membros da família I, que são divididas em sete subfamílias. Porém novas famílias têm sido isoladas e identificadas pela análise metagenômica e novas famílias têm sido propostas como a descoberta da LipG, a partir de uma biblioteca metagenômica de planície de maré (LEE et al., 2006). E em outro trabalho foi isolado a lipase LipEH166 com a também proposta de uma nova família (KIM et al., 2009).

2.3.3. Aplicações das lipases

Estas enzimas ao lado de esterases e proteases são enzimas muito estudadas e possuem inúmeras aplicações industriais no mundo inteiro, indo desde aplicações em detergentes até a resolução de misturas racêmicas para a produção de fármacos quirais, com grande importância na indústria farmacêutica (WATANABE et al. 1995; FERNANDEZ et al., 2006; LIN et al., 2007). Uma das características que as tornam tão atrativas para o mercado é a de possuir uma alta especificidade em relação ao tipo e a posição estereoespecíficas do resíduo de ácido graxo, sendo muito cotadas para aplicações na área de alimentos. Como por exemplo, a utilização de flavorizantes obtido através da hidrólise parcial de triglicerídeos, usados em alimentos destinados tanto ao consumo humano quanto ao animal. Também tem um grande apelo voltado para a questão ambiental, pois vêm sendo utilizadas na redução da concentração dos lipídeos contidos nos efluentes. (MALCATA et al. 1990).

Tabela 2 – Utilização das lipases no mercado mundial

Setor Alimentício	Efeito Utilizado	Produtos
-------------------	------------------	----------

Lacticíno	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos
Panificação	Melhoramento do sabor/qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeito e bolos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos	Bebidas alcoólicas, ex: saque, vinhos e outras
Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carnes e peixes	Desenvolvimento de aroma e remoção excesso de gorduras	Produtos embutidos
Processamento de óleo	Transesterificação de óleos naturais, hidrólise de óleos (ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos)	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)

Setor Químico	Efeito Utilizado	Produto
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de manchas de óleos e gorduras	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleo e gordura	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnósticos
Cosméticos	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gordura das peles de animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpezas de tubulação, tratamento de efluentes e outros, em combinação com outras enzimas

Fonte: (Lin et al. 2007)

As enzimas são usadas na transformação de compostos orgânicos há mais de cem anos, mas somente a partir da década de 80 houve um grande interesse após a publicação dos trabalhos de Zaks e Klibanov (1984), tendo seu potencial intensamente explorado. Foi justamente neste período que um grande número de reações químicas catalisada por enzimas foram desenvolvidas, tornando-se familiares aos químicos orgânicos (ZIMMERMANN, 2005). Pois até então acreditava-se que somente em meio aquoso a enzima podia manter sua conformação estrutural catalítica ativa. Entretanto muitas enzimas são cataliticamente ativa em soluções orgânicas, com eficiência similar ou até superior comparadas com soluções aquosas. As enzimas em meio orgânico permanecem na sua forma original e não se desdobram, esta característica deve-se, em parte, ao aumento que acontece das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima em solventes orgânicos e à baixa constante dielétrica da maioria deles, como

também um aumento do número de ligações de hidrogênio (KLIBANOV, 2001). O que tem assim as tornados tão atraentes para o setor industrial, com um número cada vez mais crescente de aplicações e publicações. Podemos também destacar um dos setores que vem crescendo que é a do biodiesel, pois o uso de novas tecnologias biocombustíveis (produção de bioetanol e biodiesel) é uma alternativa viável para substituir o petróleo (fonte fósseis) por se tratar de tecnologia verde que não polui e não contribui para o aumento de CO₂ na atmosfera, responsável pelo aumento da temperatura terrestre (BELTRÃO, 2007)

Tabela 3 - Algumas lipases disponíveis comercialmente, suas fontes e aplicações industriais

Fonte	Aplicação	Nome comercial	Producing company
<i>Humicola lamuginosa</i>	Detergent additive	Lipolase TM	Novo Nordisk
<i>C. cylindracea</i>	Food processing	ChiroCLEC-CR Lipase AY Lipase MY, Lipase OF-360 Chirazyme® L-3 Lipomod TM 34P-L034P	Atlas Biologics Amano Meito Sangyo Boehringer Mannheim Biocatalysts
<i>C. rugosa</i>	Síntese orgânica	Lipase AY “Amano” 30 Resinase®	Amano Novozymes
<i>R. miehei</i>	Food processing	Palatase®	Novozymes
<i>T. lanuginosus</i>	Detergent additive	Lipolase®, Lipolase® Ultra, Lipo Prime TM , Lipex®	Novozymes
<i>A. niger</i>	Food processing	Lipase A “Amano” 6 Lypolyve AN	Amano Lyven
<i>Rhizopus oryzae</i>	Food processing, oleoquímico	Lipase F-AP15 Lipomod TM 627P-L627P	Amano Biocatalysts
<i>R. niveus</i>	Oleoquímica	Newlase F	Amano
<i>M. miehei</i>	Food processing	Piccinate	Gist-Brocades Novo Nordisk
<i>M. javanicus</i>	Food processing e oleoquímico	Lipase M “Amano” 10	Amano
<i>Penicillium roquefortii</i>	Food processing	Lipomod TM 338P-L338P	Biocatalysts
<i>Penicillium camembert</i>	Food processing e oleoquímico	Lipase G “Amano” 50	Amano

<i>Penicillium</i> sp.	Food processing	Lipomod TM 621P-L621	Biocatalysts
<i>Candida Antarctica</i> A/B	Síntese orgânica	Chirazyme®L-5 SP526 Chirazyme®L-2 SP 525 or Novozym 435b	Boehringer Mannheim Nova-nordisk Boehringer Mannheim Nova-nordisk
<i>G. candidum</i>	Oleoquímica	Chirazyme®L-8 SP 524, Lipolase®	Boehringer Mannheim Nova-nordisk

Fonte: SINGH e MUKHOPADHAY (2011)

•

• 2.3.4. Reações Catalisadas por lipases

As lipases são responsáveis por catalisarem diversas reações dependendo do meio em que atuam, com sua aplicação em biocatálise, pois são ativas e estáveis em solventes orgânicos, não requerem a presença de co-fatores, catalisam reações em baixa temperatura e pressão, tendo por isso a sua grande importância na pesquisa (JAEGER e REETZ 1998). Sua utilização com substratos lipídicos teve início a partir da década de setenta, quando foi comprovado em experimentos ser possível reverter a hidrólise de TGA no sentido da reação de esterificação, pelo controle do teor da água no meio (20). Com base nesses experimentos, tornou-se possível a utilização de lipases como biocatalisadores de esterificação ou interesterificação de óleos e gorduras. Essas reações trazem alterações na composição e distribuição dos ácidos graxos na molécula de TGA (17).

Uma das mais importantes características das lipases é que elas possuem uma larga especificidade pelo substrato e exibem alta enantiosseletividade, ou seja, possuem uma seletividade química com características quimiosseletividade, enantiosseletividade e regioseletividade. Quanto a especificidade as lipases podem ser específica em relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato (AÇIKEL et al. 2010 ; RIGO et al. 2010).

Na sua catalisação (meio aquoso) no substrato lipídio/água elas quebram as ligações de éster do triacilgliceróis com o consumo de água (hidrólise), sendo também capazes de realizar a reação reversa sob condições mínimas de água (meio orgânico)

com a formação de ligação éster, a partir de um álcool mais um ácido carboxílico (síntese de éster) (TSUJISAKA et al. 1977; MILLER et al. 1988;). Os dois processos hidrólise e síntese de éster combinados numa sequência lógica podem resultar em reações de transesterificação de óleos e gorduras (acidólise, alcoólise e interesterificação) dependendo dos reagentes de partida utilizado para formação do produto (AÇIKEL et al. 2010; RIGO et al. 2010).

-
-

-
-

-

- Figura 4 – Algumas das reações químicas realizadas pelas lipases

-
-

- **2.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES**

Estima-se que exista cerca de 10^6 a 10^8 espécies de microorganismos na terra (CURTIS, et al., 2002). Estes microorganismos desempenham um papel de suma importância no equilíbrio ecológico, e devido as várias alterações ambientais que vêm ocorrendo ao longo dos tempos, mostram grande diversidade genética (LIAW, et al., 2010).

As lipases de origem microbianas são as mais utilizadas na indústria, visto que apresentam a vantagem de serem mais estáveis que as de origem vegetal e animal, podem ser produzidas com um menor custo, possuem uma alta velocidade de síntese, grande versatilidade, além de serem facilmente manipuladas e com grande diversidade genética (Ellaiah et al. 2004; Freire e Castlho 2008). O interesse nos últimos anos tem levado a um grande desenvolvimento, devido as suas diversas aplicações industriais.

Numerosas espécies de fungos, leveduras e bactérias produzem lipases. Diferentes microorganismos foram usados para a produção de lipases como as espécies *Rhizopus*, *Rhizomucor mehei*, *Aspergillus Níger*, *Penicillium* e *Bacillus*.(Iftikhar e Hussain (2002). Dentre os microorganismos, destacam-se os fungos filamentosos por serem de fácil cultivo, e alta produção de enzimas extracelulares. Os fungos

filamentosos são considerados bons produtores de enzimas (Maia et al. 2001), e as lipases fúngicas são as preferidas para aplicação industrial (Mahadik et al. 2002).

Tabela 4 - Triagem de várias cepas fúngicas para a produção de lipase por fermentação

Microrganismos	Tempo (h)	Atividade da lipase	Tipo de fermentação	Raw material
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	48	25 U mL ⁻¹	SmF	Óleo de soja
<i>R. rhizopodiformis</i>	24	43.0 U mL ⁻¹	SSF	
<i>R. pusillus</i>	25	10.8 U mL ⁻¹	SSF	
<i>P. restrictum</i>	24	30 U g ⁻¹	SSF	
<i>P. simplicissimum</i>	36	30 U g ⁻¹	SSF	
<i>Rhizopus oligosporus T^{UV}-31</i>	48	76.6 U g ⁻¹	SSF	
<i>Rhizopus oligosporus ISU^{UV}-16</i>	48	81.2 U g ⁻¹	SSF	
<i>Aspergillus carneu</i>	96	12.7 U mL ⁻¹	SSF	
<i>C. cylindracea</i>	179.5	23.7 U mL ⁻¹	SmF	Ácido oleico
<i>C. rugosa</i>	50	3.8 U mL ⁻¹	SmF	Óleo de oliva
<i>P. verrucosum</i>	48	40 U g ⁻¹	SSF	Farelo de soja
<i>Geotrichum sp.</i>	24	20 U mL ⁻¹	SmF	Óleo de oliva
<i>R. homothallicus</i>	12	826 U g ⁻¹	SSF	Óleo de oliva
<i>P. chrysogenum</i>	168	46 U mL ⁻¹	SSF	Farelo de trigo
<i>Fusarium solani</i> FS1	120	0.45 U mg ⁻¹	SmF	Óleo de gergelim
<i>P. simplicissimum</i>	48	21 U g ⁻¹	SSF	
<i>Aspergillus awamori</i>	96	495 U mL ⁻¹	SmF	
<i>C. cylindracea</i> NRRLY-17506	175	20.4 U mL ⁻¹	SmF	

Fonte: SINGH e MUKHOPADHAY (2011)

De acordo com Fellows (1994), a atividade enzimática ótima das enzimas microbianas ocorre nas mesmas condições em que se produz o crescimento máximo dos microrganismos (Curva de crescimento microbiano). As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas). Enzimas extracelulares são mais estáveis do que as intracelulares por possuírem pontes de sulfeto (CHEETHAM, 1995). A produção de enzimas extracelulares é obtida na fase logarítmica de crescimento ou na fase estacionária, enquanto as enzimas intracelulares são produzidas durante a fase estacionária e somente são liberadas ao meio pela lise celular que ocorre na fase estacionária ou na fase de declínio.

Para otimizar o processo de fermentação de microrganismos produtores de lipases é necessário avaliar alguns fatores químicos e físicos que influenciam a ação de todos os tipos de microrganismos. Os principais fatores são: fontes de carbono, fontes

de nitrogênio, presença de indutores, presença de estimuladores e de inibidores, presença de agentes que afetam a interface água/óleo, temperatura de incubação, pH do meio de cultura e inóculo, tempo de cultivo. Todos estes que de alguma forma podem aumentar, diminuir ou mesmo inibir a síntese de lipase (HADEBALL, 1991; DOMINGUEZ et al., 2003).

A busca e identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao ser humano, é de grande interesse estratégico, pois, garante o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, como também torna possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser realizados a partir de enzimas vegetais ou animais (OLIVEIRA, 2006).

• **3. OBJETIVOS**

• 3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho de pesquisa tem como principal objetivo a produção, isolamento e purificação de lipases, a partir de fungos filamentosos da região Amazônica.

3.2. OBJETIVO ESPECIFICOS

- Selecionar os fungos potenciais produtores da enzima lipase extracelular em meio líquido dentre as cepas pertencentes a coleções do CBA e da UEA (Seleção primária);
- Selecionar a cepa mais promissora a partir da indução com o óleo de dendê (Seleção secundária);
- Caracterizar através da cinética enzimática o extrato bruto, em relação a sua atividade com mudanças de temperaturas e pH;

- Identificar pelo método molecular de sequenciamento automatizado a cepa selecionada;
- Realizar a purificação da enzima através de técnicas cromatográficas de troca iônica;
- Caracterizar a enzima purificada através da obtenção da sequência do N-terminal, utilizando as técnicas de espectrometria de massas e sequenciamento;

- **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

- 4.1. ESTERELIZACAO DOS MEIOS E MATERIAIS

Os meios de propagação do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 ° C, durante 15 min.

- 4.2. MICRORGANISMOS E MANUTENÇÃO

As cepas utilizadas neste trabalho foram cedidas gentilmente de duas coleções do Laboratório de Biorgânica do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e outra do Laboratório de Microbiologia do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). As cepas foram obtidas a partir do método de conservação em Castellane e em meio sólido de BDA

(Batata+Dextrose+Agar). Estes foram reativados em placas de Pétri contendo o meio BDA e incubados à 30 ° C, durante 7 a 14 dias dependendo da cultura.

• 4.3. SELECAO PRIMARIA DAS CEPAS PRODUTORAS DE LIPASES EXTRACELULARES

A produção de lipase foi induzida a partir de meio de cultura líquida de composição adequada para a atividade enzimática. Para a avaliação da produção de lipase pelas cepas foi realizada uma seleção primária, com a fermentação em substrato líquido (FSL). Nesta fermentação, foi testado um meio de cultura com fontes de carbono a base de óleo de oliva (comercial com graus de acidez livre 0,5%, marca: Galo). A partir da reativação em meio de cultura sólido (meio Agar) foi retirado um pequeno fragmento (7 mm) e inoculado em tubos contendo 20 mL de meio líquido composto de Peptona 3 g.L⁻¹, K₂HPO₄ – 2 g.L⁻¹, CaCl₂ – 2 g.L⁻¹, MgSO₄ . 7H₂O – 1 g.L⁻¹, extrato de levedura – 2 g.L⁻¹, 1% (v/v) de tween 80 e 2% (v/v) de óleo de oliva comercial. E colocados em agitador orbital (Shaker) durante 15 dias a 30 ° C e 130 rpm.

• 4.4. ENSAIOS PARA DETERMINACAO DA ATIVIDADE ENZIMATICA

Atividade da lipase foi ensaiada com palmitato de p-nitrofenila como substrato (15,19,30). Este método baseia-se na reação de hidrólise em meio aquoso, catalisada pela enzima. A reação consistiu de uma mistura de 900 µL da solução A+B (A- palmitato de p-nitrofenila diluído em de isopropanol-3mg/mL e B- 2 g de Triton 100X + 0,5 g de goma arábica diluída em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L) com 100 µL da solução de enzima ou de tampão para o branco. A mistura da reação foi incubada a 37 ° C e 300 rpm durante 15 min. O produto foi a liberação do p-nitrofenol, que é confirmado pela coloração amarela da solução, e quantificada por espectrofotometria a 410 nm. A leitura da absorbância de cada isolado foi comparada com a curva padrão para o p-NP, a fim de quantificar a produção de lípase pelos isolados. Uma unidade de atividade de lípase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de

p-NP/mL. Foi desenvolvida uma curva padrão com diferentes concentrações de p-NP (M), como forma de quantificar a atividade enzimática (Figura 1).

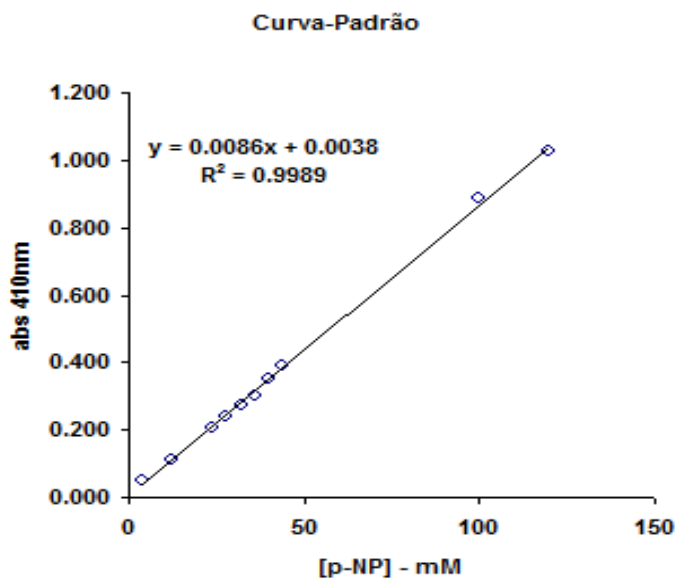


Figura 5 - Gráfico da curva-padrão para a concentração de p-nitrofenol (p-NP) em 410 nm

- 4.5. SELEÇÃO SECUNDÁRIA DAS CEPAS POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE LIPASES EXTRACELULAR

Na seleção secundária, a fase de otimização de produção de lipase pelas linhagens mais promissoras, utilizou a mesma formulação básica do meio do item 3.3.1, no entanto a partir desse processo a fermentação ocorreu em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido, e tendo o indutor o óleo de dendê, cedido pela EMBRAPA. Avaliada também a atividade enzimática, conforme o item 3.3.2, para obtenção da cepa mais promissora.

- 4.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS.

4.6.1. Determinação do teor de proteínas

Para a determinação do teor de proteína presente nas soluções contendo lipases, utilizou-se da metodologia utilizada por Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado a partir da solução de 100 mg de azul de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95% e posterior adição de 100 mL de ácido orto-fosfórico 85% (p/v). A solução final foi diluída com água destilada para o volume final de 1L.

Em um micrortubo, adicionaram-se 900 μ L do reagente de Bradford a 100 μ L da amostra, agitou-se o tubo em agitador vortex e aguardou a reação durante 5 min em local escuro, para realizar a leitura de absorvância ($\lambda=595$ nm) em espectrofotômetro. Para obtenção da curva de calibração de proteína, correlacionaram-se os valores de absorvância obtidos a partir da leitura de soluções de albumina de soro bovino a concentrações conhecidas de proteína, variando-se a concentração de (7,64; 15,29; 50; 100; 150; 200 e 2500 μ g) de proteína/mL.

4.6.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A separação, detecção e quantificação das amostras, foram realizadas segundo o método de Laemmli et al., (1979). No sistema eletroforético foi utilizado gel de empilhamento de concentração a 6% contendo bis-acrilamida:acrilamida, na proporção 0,8:30 (m/v) em Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 0,1% e gel de separação a 12,5%

contendo bis-acrilamida:acrilamida na proporção 0,8:30 (m/v) em Tris-HCl 2,0 M, pH 8,8 e SDS 0,1%. Os géis foram polimerizados em placas de vidro adaptáveis a sistemas verticais, as quais foram acopladas e seus respectivos reservatórios contendo tampão Tris-HCl a 25 mM contendo SDS a 0,1% (m/v) utilizado como tampão de corrida.

Um volume de 10 µL de Tris-HCl a 0,0625 M, pH 6,8 contendo glicerol 10%, β-mercaptaetanol 5% (v/v), SDS 2% e azul de bromofenol a 0,001% (tampão de amostra) foi adicionado a 20 µL de todas as amostras submetidas a eletroforese. As soluções foram aquecidas a 100 °C por 5 min e aplicadas nos poços, num volume final de 80 µL. As proteínas utilizadas como padrão de massa molecular foram albumina sérica bovina (BSA: 66 kDa), ovalbumina (OVA: 45 kDa), anidraze carbônica (CA: 30 kDa), inibidor de tripsina de soja (ITS: 20,1 kDa).

A eletroforese foi efetuada sob uma tensão de 120 v para a separação das amostras durante a migração no gel de empilhamento e de resolução. Após 4 horas de separação eletroforética, a presença das bandas proteicas foi detectada com imersão dos géis numa solução de corante Comassie Brilliant Blue 250 R por 15 min sob agitação branda. Em seguida, os géis foram descorados com ácido acético 7%.

4.6.3. Gel de Eletroforese com gradiente

Uma análise mais segura do material final purificado foi usado um gel de poli-acrilamida com gradiente de acrilamida (Nu PAGE 4-12% Bis-Tris Gel, 1.5mm x 10 well) segundo o fabricante. O material liofilizado foi ressuspendido no tampão de amostra e aplicado no gel. A análise da proteína foi realizada em condições desnaturantes e por “Western Blot”.

• 4.7. CINÉTICA DO EXTRATO BRUTO

4.7.1. Efeito do pH na atividade enzimática

Os extratos enzimáticos produzidos pelo fungo através dos ensaios foram submetidos a ensaios da hidrólise do p-NPP, conforme o item 3.3.2. Substituindo o tampão da reação por: CH₃COONa 50mM pH (5; 5,5 e 6); K₂HPO₄ 50mM pH (6; 6,5 e 7); Tris-HCl 100mM pH (7; 7,5; 8 e 8,5) e Na₂HPO₄ 50mM. pH (8,5; 9; 9,5; 10; 10,5 e 11) a temperatura de 37 ° C.

4.7.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática

Para o mesmo extrato bruto foi realizado o ensaio conforme o item 3.3.2 com diferentes temperaturas: 25; 30; 37; 40; 45; 50; 55; 60; 70; 80 ° C para a reação. Foi realizado o ensaio com o próprio tampão da metodologia e também com o tampão que obteve o melhor resultado do item 3.4.1.

- **4.8. IDENTIFICAÇÃO**

- **4.8.1. Morfológica**

Para a identificação a cepa foi inicialmente semeada em placa de Petri contendo ágar batata dextrose (LACAZ et al., 2002) para a identificação micromorfológica. Foram realizados exames microscópicos diretamente desta cultura.

A identificação das estruturas microscópicas foi realizada a partir de microcultivos, de acordo com o procedimento a seguir: em placas de Petri contendo dentro um papel de filtro umedecido com água autoclavada, e em cima duas lâminas em forma de x, utilizadas como apoio dos blocos de BDA (um bloco em cada extremidade). Foram semeados fragmentos da cultura no meio do bloco, para induzir a produção da estrutura de conidiogênese. O bloco foi recoberto com lamínulas e incubadas à temperatura ambiente por até 20 dias para a observação das estruturas ao microscópico, as lamínulas foram retiradas da placa de Petri e colocada sobre lâminas, contendo uma gota de corante lactofenol-azul (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

- **4.8.2. Identificação molecular do Fungo CBA-309**

Para obtenção do material, um fragmento de 7 mm da cepa contido em placas de BDA foi inoculado em 40 mL de caldo de BD+Ext. de levedura, contidos em erlenmayer de 125 mL, e mantido sob agitação constante (130 rpm, 30 °C, durante 72 horas). Após esse período, foi filtrada em papel de filtro comum para obtenção do micélio.

- **4.8.2.1.Extração do DNA**

O micélio foi triturado em presença de N₂ líquido em almofariz e transferido para microtubos, pesado e adicionado tampão de extração. Incubado por 60 °C durante 60 min, resfriado e centrifugado a 10000 rpm por 15 min. Separando o sobrenadante e adicionando o mesmo volume de fenol e realizando suaves agitações por cinco min. Centrifugado sob as mesmas condições anteriores e transferido a fase aquosa, com a adição de mesmo volume de clorofane e agitar suavemente durante 5 min. Novamente centrifugar, transferindo a fase aquosa e acrescentando o mesmo volume de corofil. Agitando por cerca de 5 min. centrifugou por 10000 rpm durante 5 min. Transferindo a fase aquosa e precipitando os ácidos nucleicos com 1/10 (NaCl 5 M) do volume da solução aquosa e 2 volumes de etanol 95% gelado. Deixar overnight a 4°C. Centrifugar a 14000 rpm por 10 min. Descartou o sobrenadante e adicionou 500 µL de etanol 70%, centrifugado a durante 5 min. e descartado o sobrenadante e deixado o pellet secar a temperatura ambiente. Após ressuspendeu com 50 µL de tampão TE (1/10) pH 8 mais RNase (SAMBROOK et al., 1989).

- **4.8.2.2. Sequenciamento**

O sequenciamento da cepa CBA-309 foi realizado a partir do DNA extraído e enviado ao Laboratório de Genética molecular e Genomas, Departamento de Biociências e Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), São José dos Campos, SP, Brasil. Responsável o Dr. Francisco G. Nóbrega e realizado pelo Dr. Adolfo J. Mota.

Para o seqüenciamento foi realizado uma amplificação utilizando o “kit” Go[®]Taq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) e os oligonucleotídeos ITS4 e ITS5 (White e Lee, 1990) foram usados para amplificar a região ITS1-5,8S-ITS2 do cistron ribossomal seguindo as recomendações do fabricante. A termociclagem (Express Thermal Cycler, Hybaid Limited), constou de uma desnaturação inicial à 95°C por 3 min, seguida de 35 ciclos: 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30s. O seqüenciamento direto a partir dos amplicons foi realizado com o reagente “Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems[™]) Segundo a reação: 1 x Big Dye Terminator Sequencing mix, 1 x sequence buffer, 200 ng do produto de PCR, 100 nM de cada oligo, ITS4 ou ITS5, água ultrapura para um volume total de 10 µl. A termociclagem constou de 40 ciclos a 95°C 30 s, 50°C 30 s and 60°C 1 min. O seqüenciamento automático foi realizado em um seqüenciador automático ABI Prism[®] 3100 Genetic

Analyzer (Applied BiosystemsTM) seguindo as instruções do fabricante. As sequências foram analisadas com o programa Lasergene[®] SeqManTM II para o Windows versão 5.00 (DNASTAR) e foram comparadas contra o banco de sequências nucleotídicas não redundantes (nr/nt) do GenBank com a ferramenta BLASTN disponível no site do NCBI.

• 4.9. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

A purificação da enzima foi realizada em duas etapas, devido à necessidade de se obter mais material para as análises. Com a parte da cromatografia sendo realizada no laboratório de Bioquímica, da Faculdade de Medicina- USP de Ribeirão Preto, sob a orientação do Dr. Eduardo Brandit e apoio técnico de Odete da Cunha.

4.9.1. Obtenção do extrato bruto

Para a obtenção da lipase, a cepa foi cultivada em larga escala (FSL). Em enlenmayer de 250 mL contendo o óleo de oliva como indutor, nas condições de agitação (130 rpm), 30 °C durante 7 dias (ponto máximo da atividade enzimática). O fermentado foi filtrado em papel de filtro comum para separação do micélio e obtenção do extrato bruto.

4.9.2. Precipitação do extrato bruto

Foi realizado um pré-ensaio com uma amostra do extrato bruto da cepa CBA-309, utilizando duas metodologias de precipitação de proteínas, a fim de verificar o melhor rendimento e recuperação da atividade enzimática.

4.9.2.1. Precipitação com sulfato de amônio

Na precipitação foi utilizada 50 mL de extrato bruto e uma concentração de 80% de sulfato de amônio. O sulfato de amônio foi adicionado lentamente ao extrato bruto, em um sistema de agitação constante, com uma temperatura de 4 °C. Após foi deixado overnight na mesma temperatura, centrifugado a 12000 rpm, 4 °C durante 20 min.

4.9.2.2. Precipitação com solventes orgânicos

A precipitação da proteína foi realizada com acetona e etanol, para a determinação foi usado uma precipitação de 40, 50, 60, 75 e 90% do volume do extrato

bruto, com adição dos solventes na temperatura de 4 °C Foram usados volumes finais de 2 e 15 mL. Cada tubo contendo as amostras foram deixados overnight, a 4 °C. Após os materiais foram centrifugado a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. Foi retirado o sobrenadante e deixado cada tubo vertido em temperatura ambiente para eliminação do solvente. O precipitado formado foi dissolvido em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,1 (100 µL para o volume de 2 mL e 300 µL para o volume de 15 mL). Determinada a atividade e o teor de proteína total em cada solução.

4.9.2.3. Medida da atividade e recuperação do precipitado

A partir de cada etapa no processo de purificação do extrato bruto, o resultado foi acompanhado e avaliado através da atividade enzimática e do cálculo da recuperação. A eficiência de cada etapa é dada por um “rendimento” ou “recuperação” (a porcentagem retida da atividade total da enzima originalmente presente), conforme a equação 1.

Equação 1:

4.9.3. Precipitação do extrato bruto (fermentado em larga escala) em etanol 75%

Um volume de 850 mL do extrato bruto adquirido no item 3.6.1 foi colocado sob agitação em banho de gelo, e acrescentado lentamente etanol gelado até uma porcentagem de 75% do volume total, conforme a figura 4 e 5. Deixado overnight a 4 °C, para precipitação das proteínas. Em seguida o material foi centrifugado a 7000 G , 4 °C por um tempo de 30 min. Separado o sobrenadante, o precipitado foi dissolvido em 30 mL de Tris-HCl 20 mM pH 8,0.



Figura 6 - Precipitação com etanol 75%

Figura 7 - Material precipitado após overnight

E homogenizado para a extração máxima da proteína, o material foi então centrifugado a 12000 rpm, 4 °C durante 10 min para eliminação do material sólido que não houve interação com o tampão. Obtido um volume final de 22, 5 mL denominado precipitado etanol 75 % conforme as figuras 6 e 7.

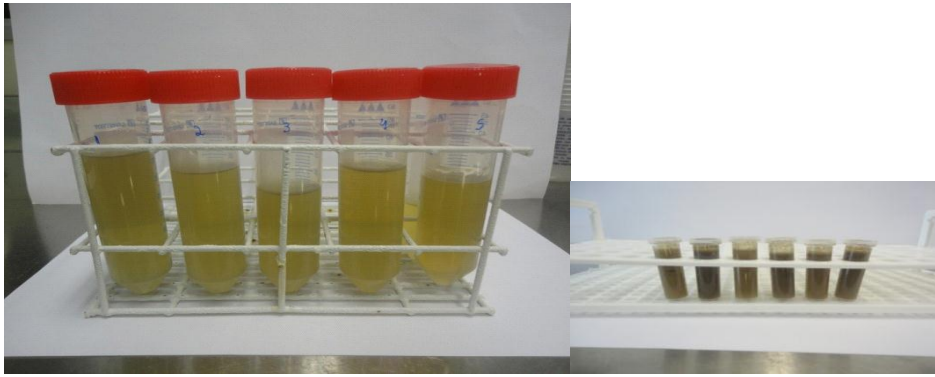
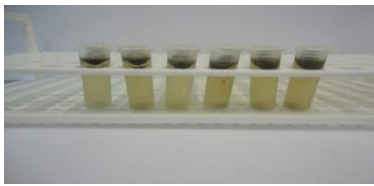


Figura 8 - Precipitado ao final do tratamento

Figura 9 - Precipitado em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8



4.9.4. Purção da enzima pelo método da cromatografia de troca iônica

4.9.4.1. Coluna aniônica DEAE-FF

Após a obtenção do precipitado etanólico 75% em tampão Tris-HCl, a purificação foi realizada em condições não desnaturantes em coluna cromatográfica de troca iônica contendo o trocador iônico a resina contendo os grupos dietilaminoetil (DEAE-FF) para troca aniônica. Seguindo as instruções descritas pelo fabricante. Para a purificação foram utilizadas uma coluna de vidro contendo 20 mL de resina, utilizando um cromatógrafo adaptado: (Aparelho: LDC Analytical (Consta Metric 4100 solvent delivery system (bomba); Detectot-SM 4000 programmable Wavelength e válvula de injeção manual). A coluna foi montada manualmente retirando o álcool 20% contido na resina e equilibrando com o tampão A (20 mM Tris-HCl pH 8,1, 20 mM de NaCl). Logo após a preparação da coluna, foi injetada um volume de 21,75 mL de amostra misturada com 10% de glicerol, com um fluxo de 1,5 mL/min. E lavada com um

volume de 25 mL do tampão A. Finalizada esta etapa, as proteínas foram eluídas com um gradiente utilizando os tampões: A com 125 mL (20 mM Tris-HCl pH 8,1, 20 mM de NaCl) e B 125 mL (20 mM Tris-HCl pH 8,1, 0,7 mM NaCl) e fracionadas em volume de 4 mL. Logo após as frações selecionadas foram então concentradas e equilibradas com o tampão A (inicial da próxima coluna) utilizando concentradores Amicon Ultra-4/ultracell-30k (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante.

4.9.4.2. Coluna catiônica S-Sepharose

Após a obtenção do concentrado no item 3.6.4.1 a amostra foi corrida na coluna catiônica, realizando o mesmo procedimento do item anterior de acordo com as seguintes condições: Coluna de vidro já empacotada pelo fabricante: 10 cm de altura e 0,5 cm de diâmetro; Quantidade de amostra injetada: 5,5 mL com 10% de glicerol em um fluxo de 0,5 mL/min coletadas manualmente, usando um volume de 7 mL do tampão A para injetar a amostra. Gradiente: A-25 mL de ácido fórmico 20 mM Tris-Base pH 3,2 e B-25 mL de acetato 40 mM Tris-Base pH 5,2. No final ainda foi corrido outro gradiente 12,5 ml de acetato 40 mM Tris-Base pH 5,2 e o mesmo com pH 8;

4.9.4.3. Coluna aniônica Mono-Q

A amostra já concentrada e equilibrada no tampão A da Mono-Q foi então corrida na coluna já previamente equilibrada nas condições: Coluna de vidro já empacotada pelo fabricante: 5 cm de altura e 0,5 cm de diâmetro; Amostra: 1,8 mL com 10% de glicerol em um fluxo de 0,5 mL/min coletadas manualmente, usando um volume de 2,5 mL do tampão A para injetar a amostra. Após o fluxo foi aumentado para 0,8 mL/min. Gradiente: A- 20 mL (20 mM Tris-HCl pH 8,1, 0,12 M NaCl) e B- 20 mL (20 mM Tris-HCl pH 8,1 , 0,5 M NaCl)

4.9.4.4. Coluna Sephadex-G25

A amostra selecionada da coluna Mono-Q foi corrida em uma coluna de filtração em gel, realizado o procedimento de dessalinização. Um coluna plástico de 5 cm de altura e 1,6 cm de diâmetro, já montada pelo fabricante foi equilibrada (três vezes seu volume) e eluída com uma solução Bicarbonato de amônio 20 mM. A amostra contendo um volume de 920 µL foi aplicada, coletando 10 frações, a coluna foi corrida na bancada apenas a força da gravidade e coletada manualmente. Cada fração contendo

700 μ L, com excessão da primeira com uma volume de 1,62 mL. Ao final as frações selecionadas foram reunidas e liofilizadas.

4.9.5. Determinação de AAs do N-terminal

4.9.5.1. Análises no espectro de Massa

A determinação do AA da lipases total foi determinada por espectrômetro de massa, a análise foi realizada pela Dra. Mary Ann Gawinowicz da Universidade Columbia University (New York). Perfil cromatográfico das enzimas purificadas através do método analítico, para determinação das massas molares das amostras liofilizadas foi utilizado o método a técnica analítica de espectrometria de massas, utilizando o aparelho, tendo com fonte de ionização a forma MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization). Como analisador de massas TOF (time-of-flight).

5. RESULTADOS E DISCURSSÕES

5.1. SELEÇÃO DAS CEPAS

5.1.1. Seleção primária

Das 312 cepas usadas nos ensaios enzimáticos de hidrólise, 14 não cresceram e o restante foi obtido o valor da atividade (U/mL) pelo método do pNPP. Destes apresentaram acima da média. A figura 4 apresenta a distribuição dos valores de atividade enzimática em p-NPP (U/mL) com relação aos 298 fungos testados. A média geral foi de 3249 U/mL. Para uma primeira seleção foram selecionados os isolados que apresentaram valores acima de 6000 U/ml (Seleção I), totalizando 16 fungos. Estes passaram por uma segunda seleção ao qual foi escolhido uma única cepa para um estudo mais aprofundado da cinética, assim como para sua identificação molecular que foi a cepa codificada por CBA-309. A enzima também foi precipitada e realizada várias cromatografias para uma possível purificação.

Figura 10 – Histograma das cepas utilizadas na primeira seleção da atividade hidrolítica

5.1.2. Seleção secundária

A partir da seleção dos seis isolados que apresentaram uma maior atividade da lipase em óleo de oliva, foi realizada uma série de ensaios quantitativos com p-NPP visando analisar o nível de indução enzimática tendo óleo de dendê como substrato indutor. A Figura 2 mostra o comportamento dos seis isolados selecionados para a fase com óleo de dendê. Após 15 dias de indução, o processo fermentativo apresentou, na média entre os seis isolados, o pico de atividade enzimática aos nove dias. Ao analisar o gráfico, percebe-se que nem todos os isolados apresentaram a mesma afinidade ao óleo de dendê. O isolado UEA-244 não produziu mais a partir do nono dia. Nota-se que o isolado UEA-243 apresentou sua maior atividade aos sete dias, mas que a partir disso, a sua produtividade começa a cair. Por outro lado, a produtividade do isolado CBA-309 supera a do isolado UEA-243 somente a partir de oito dias, com a atividade apresentando pico aos nove dias superando todos os demais isolados até o final do ensaio.

Figura 11 – Evolução da atividade da lipase em meio de cultura indutor contendo óleo de dendê.

A Figura 12 mostra um comparativo entre os seis isolados selecionados quando à atividade enzimática induzida por óleo de oliva e óleo de dendê sob as mesmas condições aos nove dias de fermentação. Na média, o óleo de oliva apresentou uma melhor atividade enzimática (7611 U/mL). Nota-se que não há muita diferença na atividade hidrolítica quando óleo de oliva é utilizado, com os valores variando de 7133 a 8135 U/ml, o que demonstra uma mesma afinidade das respectivas lipases a este substrato. Contudo, ao substituir o óleo de oliva pelo de dendê, as diferenças de afinidade das lipases ao óleo ficam evidentes. Na média, a atividade enzimática ficou em 4050 U/ml, variando de 296 a 10727 U/ml. Quando foi realizada uma análise de variância e teste Tukey para comparação de média, o isolado CBA-309 foi superior estatisticamente aos demais. Ao analisar a figura 12 fica clara esta superioridade apresentada pela alta atividade enzimática, o que demonstra uma boa afinidade da lipase ao óleo de dendê. Quando comparada a sua atividade entre os óleos, a atividade com óleo de dendê foi superior em 35% à atividade induzida pelo óleo de oliva. Isto

demonstra que a seleção do isolado CBA-309 foi correta, em função da alta afinidade ao óleo de dendê apresentada. Portanto, aos nove dias foi selecionado o isolado CBA-309,(figura 13) para as outras fases do trabalho.

Figura 12 - Comparação entre as atividades enzimática das lipases dos seis isolados selecionados em meios de cultura com óleo de oliva e de dendê em nove dias de indução. Letras diferentes representam diferenças estatísticas dentro de cada óleo testado (Tukey $p < 0,05$).

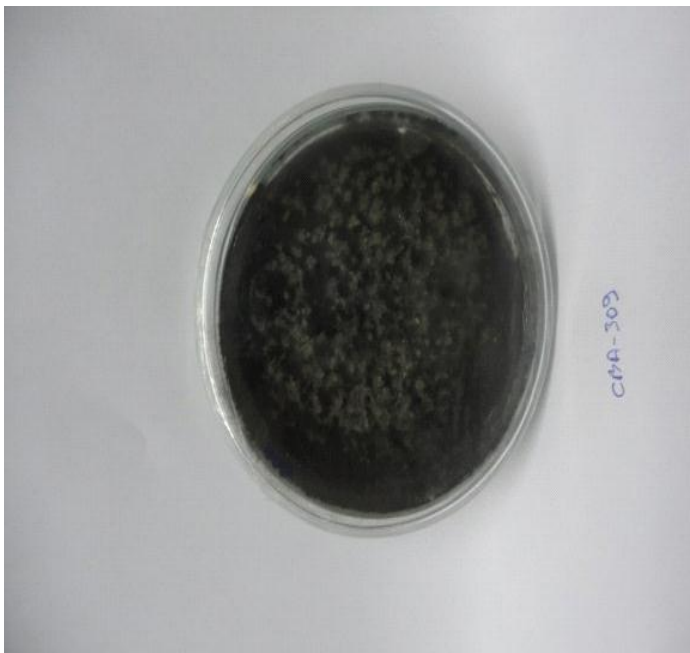


Figura 13 – Cepa CBA-309 em placa de petri contendo BDA

5.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO

A cepa CBA-309 obteve uma ótima atividade para o pH básico. Ressaltando especialmente o tampão Tris-HCl no pH 7,5 e 8,5 que obteve o pico da atividade, junto com o fosfato de sódio no pH 9,0 conforme a figura 13. Já para o pH 10,5 com o tempo percorrido para a reação houve uma reação espontânea para branco. E no pH 11 após a mistura do substrato o branco reagiu, não suportando o pH.

Já para a reação em temperaturas diferentes houve uma boa atividade para as temperaturas de 25 – 60 °C. para o tampão Tris-HCl, com picos para 40 e 50 °C. Para a reação com o tampão fosfato teve um padrão do pico nas temperaturas de 30 – 60 °C.

Figura 14 – Gráfico referente ao ensaio com diferentes pH.

5.3. PRECIPITAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

5.3.1. Precipitação com sal

Para a precipitação com o sal sulfato de amônio 80%, não houve uma detecção da precipitação ao final do processo. Talvez pela inexperiência em realizar o experimento, se tivesse sido realizado com um gradiente crescente de concentração de sal, a enzima pudesse ter sido precipitada. Visto que na literatura a maioria das lipases são precipitadas a uma concentração de 80%, mas existe casos que sua precipitacao ocorre em concantracoes menores ou maiores. Ficando, assim como perspectivas de experimentos futuras este ensaio.

5.3.2. Precipitação do extrato bruto com solventes

Já para a precipitação com os solventes, tanto para a acetona quanto o etanol ocorreu a precipitação do extrato bruto nas diversas concentrações testadas. Assim procurou selecionar o solvente e a concentração mais adequada através do cálculo da recuperação enzimática.

O resultado para a precipitação com etanol a 75%, foi o que teve a melhor recuperação da atividade enzimática, comparando com o extrato bruto. conforme a tabela 5, Concluindo assim que a enzima não foi prejudicada com o contato com o solvente orgânico, mostrando-se uma boa metodologia para a fase inicial.

Tabela 5 - Recuperação da precipitação com solvente

Amostra	Atividade	Recuperação
Extrato bruto	330 U/mL	
Precipitado etanol 75%	219 U/mL	66%

5.4. IDENTIFICAÇÃO

5.4.1. Identificação Morfológica

Quanto à identificação morfológica macroscópica não foi possível uma identificação quanto ao gênero, pois este apresentava apenas hifas em suas estruturas não permitindo nenhuma visualização de estruturas que pudessem identificá-lo. Vários procedimentos foram realizados com o intuito de estressar a cepa para que pudesse produzir as estruturas de conídios, mas sem resultado algum.

5.4.2. Identificação Molecular do Fungo

Tanto para o DNA como para o PCR foi realizado um gel de agarose para verificar a integridade do material purificado, conforme as figuras 14 e 15. Após a análise o material foi então sequenciado. Segue abaixo a foto do gel do DNA e da PCR do fungo. Para o gel de DNA foram aplicados 3µL de TEB 5X mais 5µL de amostra de DNA diluída. Para a PCR foram 3µL de TEB 5X mais 10µL de amostra de PCR.

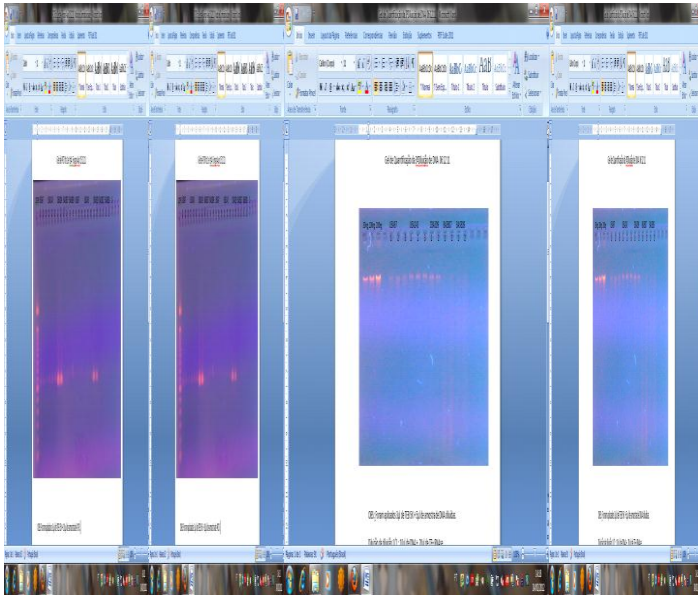


Figura 15 – Ilustracao do PCR . em gel de agarose. ITS 1 e IT.
 Figura 16 – Ilustracao do gel de quantificação da terceira diluição do DNA

5.4.3. Sequenciamento da cepa CBA-309

Assim pela identificação molecular que foi realizada pelo seqüenciamento da região ITS do DNA ribossomal. Os resultados permitiram classificar o fungo como espécie *Endomelanconiopsis endophytica*. Pelo alinhamento do blast, pode-se verificar que há uma troca de base na posição 30, de C para T, esse polimorfismo tem grandes chances de ser verdadeiro pois essa é a região ITS e a deamaninação da citosina metilada para T é um mecanismo conhecido de mutação, conforme a figura 16 .

CBA_309(2).pdf - Foxit Reader - [CBA_309(2).pdf]

File Edit View Comments Forms Tools Help

apostila de purificação de protef... CBA_309(2)

gb|GQ469968.1| Endomelanconiopsis endophytica strain CMW28552 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; internal transcribed spacer 2, partial sequence Length=604

Score = 787 bits (426), Expect = 0.0 Identities = 428/429 (99%), Gaps = 0/429 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 2   CGGACCTCTTCTCTCACACCCTATGTGTA|CTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTC 61
          |||
Sbjct 79   CGGACCTCTTCTCTCACACCCTATGTGTA|CTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTC 138

Query 62  CTCCGCGGCCGGCCCCCTAACGGGGCTGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACTACCAAACCTCC 121
          |||
Sbjct 139  CTCCGCGGCCGGCCCCCTAACGGGGCTGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACTACCAAACCTCC 198

Query 122 AGTCAGTAAACGTAGCTGTCTGATCAAAAGTTTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGAT 181
          |||
Sbjct 199  AGTCAGTAAACGTAGCTGTCTGATCAAAAGTTTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGAT 258

Query 182  CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG 241
          |||
Sbjct 259  CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG 318

```

Ready 1 / 1 167.59%

CBA_309(2).pdf - Foxit Reader - [CBA_309(2).pdf]

File Edit View Comments Forms Tools Help

apostila de purificação de protef... CBA_309(2)

```

Query 122  AGTCAGTAAACGTAGCTGTCTGATCAAAAGTTTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGAT 181
          |||
Sbjct 199  AGTCAGTAAACGTAGCTGTCTGATCAAAAGTTTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGAT 258

Query 182  CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG 241
          |||
Sbjct 259  CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG 318

Query 242  AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCA 301
          |||
Sbjct 319  AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCA 378

Query 302  TGCCGTGTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGCCGTCCTTCA 361
          |||
Sbjct 379  TGCCGTGTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGCCGTCCTTCA 438

Query 362  CCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGCTTTGCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACC 421
          |||
Sbjct 439  CCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGCTTTGCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACC 498

Query 422  TCGCTTTGG 430
          |||
Sbjct 499  TCGCTTTGG 50

```

Ready 1 / 1 167.59% Size: [8.27 * 11.69 in] 01:56 28/02/2012

Figura 17 - Alinhamento do Blast (Sequenciamento do fungo: espécie *Endomelanconiopsis endophytica*.)

5.5. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

5.5.1. Primeira fase da cromatografia do precipitado etanol 75%

Para a primeira coluna DEAE-1-FF houve uma interação com a coluna aniônica, e após a eluição do aumento da concentração do gradiente, houve a separação das proteínas de acordo com a afinidade pelo gradiente. Para a lipase houve uma atividade verificada através da hidrólise do substrato p-NPP realizada para todas as colunas. A atividade foi verificada para as frações D1.20 a D1.35. Com a seleção para as frações D1.22 a D1.30 para uma purificação mais precisa, (Anexo A). Para a coluna S-Sepharose-1 houve atividade para as frações S1.9 a S1.24, com a seleção das frações S1.10 a S1.13 a qual houve um pico de atividade. Para a Mono-Q1 a atividade estava contida nas frações Q1.12 a Q1.18, com a seleção a fração Q1.14 para se ter um máximo da enzima pura e não correr o risco de trazer contaminantes de outras proteínas próximas. (Anexo A). Após a dessalinação e liofilização as amostras foram corridas no gel de gradiente de crilamida, conforme a figura 20.

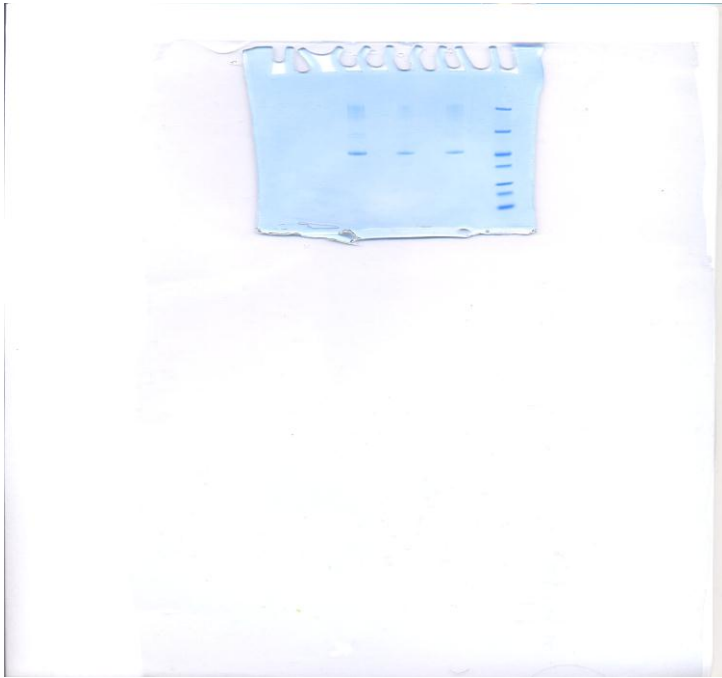


Figura – Gel de eletrofores, (Nu PAGE 4-12% Bis-Tris Gel, 1.5mm x 10 well) do perfil do material liofilizado; G.1a e G1.b é a mesma amostra aplicada, apenas G1.a sendo o dobro de amostra aplicada. M: marcador molecular.

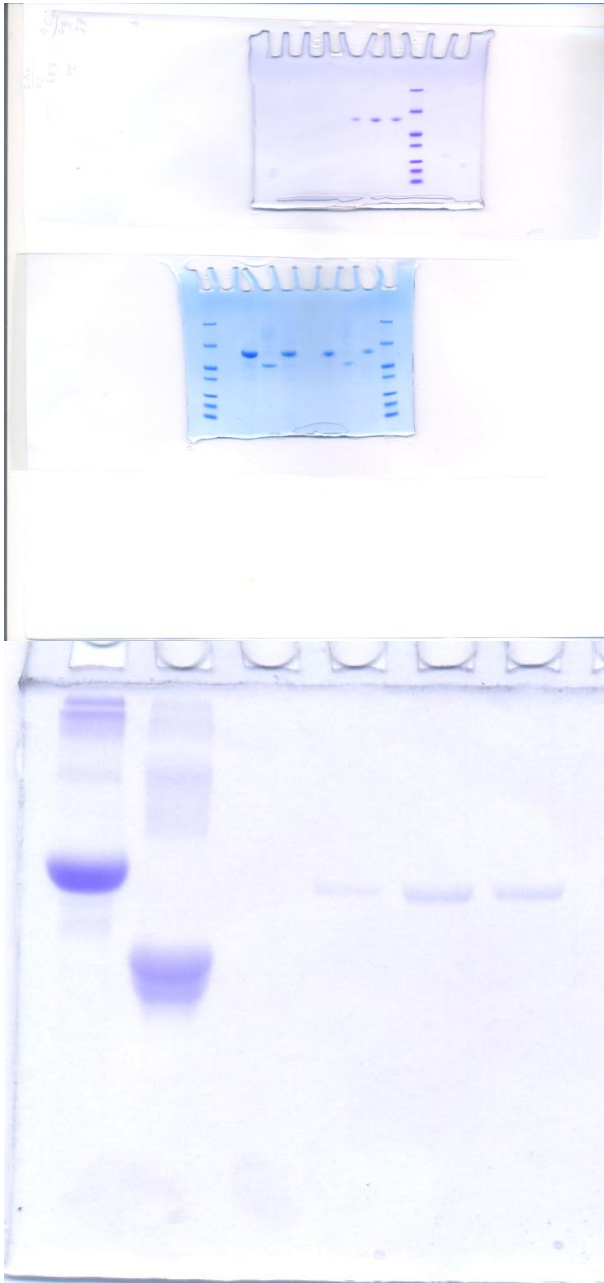
Das frações 4 e 5 obtidas da Sephadex G-25, que foram liofilizadas, foram ressuspensa com o tampão de amostra e aplicada nos poços. Sendo que um dos poços

foram aplicados o dobro do volume (A) que as outras duas (B). Através da análise do perfil do gel, houve um aparecimento de três conjuntos: a primeira banda mais intensa (1A e 1B) de 46 kDa (susposta lipase); duas bandas muito próximas e bem fracas (2A e 2B) com o peso de 58 e 62 kDa; e um rastro fraco (3A e 3B) um conjunto de bandas visíveis individualmente, com peso molecular na faixa de 97-124 kDa).

Foram recortados três fragmentos e transferido para micrortubos; 3A que pegou a parte do rastro; 2A que pegou as duas bandas fracas (dublete) e 1A que pegou a banda única e mais abundante.

5.5.2. Segunda fase da cromatografia do precipitado etanol 75% (A)

Para as colunas DEAE-2A-Sepharose e DEAE-2B-Sepharose foram obtidos atividade enzimática em dois picos, o primeiro logo no início e que não se prendeu a coluna. O segundo pico o mais intenso de atividade e que se prendeu a coluna, saindo ao longo do gradiente. Sendo que selecionou o segundo pico da segunda coluna DEAE-2B-Sepharose por apresentar um perfil bem mais significativo da enzima de interesse. Foram então reunidas as frações D2A.69 a D2A.76. Já com a S-Sepharose-2 houve uma primeira corrida e por não ter havido uma boa separação, obtida através da OD_{280nm} reuniu-se as frações S2A.31 a S2A.33 e correu novamente na S-Sepharose sob as mesmas condições, só que coletando manualmente. Selecionado então as frações S2B.5 e S2B.6 referente ao pico de atividade. E na Mono-Q-2 foi selecionado as frações Q2.B; Q2.1 e Q2.2 que não foram reunidas e sim dessalinizadas individualmente e liofilizadas para obtenção do perfil, conforme a figura 20. Com o resultado do gel 10% foi verificado que as três frações eram a mesma, só que mostrando um perfil de peso de 60 kDa, diferente da enzima obtida na primeira cromatografia. Como a relatos de que dependendo da concentração do gel, as glicoproteínas podem modificar seu perfil de peso molecular no gel. Optou-se por realizar com o restante das amostras diluídas no tampão de amostra, correr outro gel de gradiente de acrilamida, o mesmo utilizado para amostras da primeira cromatografia (Nu PAGE 4-12% Bis-Tris Gel, 1.5mm x 10 well). Confirmando os resultados que seria uma nova lipase de aproximadamente 60 kDa.



OVA BSA Q2.B Q2.1 Q2.2 2

Figura 19 – Gel de gradiente de poliacrilamida. Marcador com vários pesos e 15 μ L das amostras B; 1 e 2.

Figura 20 – Gel de eletroforese 10%. OVA: marcador de 60 kDa; BSA: marcador de 45 kDa; B; 1 e 2: frações obtidas na Mono-Q2 dessalinizadas e liofilizadas. Diluídas com 30 µL de tampão da amostra e aplicado 15 µL.

5.5.3. Segunda fase da cromatografia do precipitado etanol 75% (B)

Como a enzima obtida não foi a esperada (46 kDa), optou-se por retomar ao material das duas colunas DEAE-2A-Sepharose e DEAE-2B-Sepharose referente ao primeiro pico de cada com atividade enzimática e que não se prendeu a coluna. As frações foram reunidas e novamente corridas em uma DEAE-3-FF. E reunidas as frações D3.23 a D3.30 com atividades enzimáticas. Para a coluna S-Sepharose reunidas as frações S3.13 a S3.17 com atividades e para a Mono-Q3 houve dois picos não seguidos com atividade enzimática. Reuniu-se então as frações Q3.8 e Q3.9 (Q3A) e as frações Q3.16 e Q3.17 (Q3B), para o processo de dessalinização e liofilização. E aplicada em um gel de gradiente de poliacrilamida, conforme a figura 22. Através do gel foi verificado que as duas enzimas obtidas com atividade da Mono-Q-3 eram de pesos moleculares diferentes, massas iguais a 45 e 60 kDa. Ao qual foi também corrida com uma das amostras da Mono-Q-2 de também massa igual a 60 kDa. Optou-se por não reunir as duas de 60 kDa, visto que vieram de pesos diferentes, uma se prendeu a coluna e outra não.

Figura 21 – Gel de gradiente de poliacrilamida.

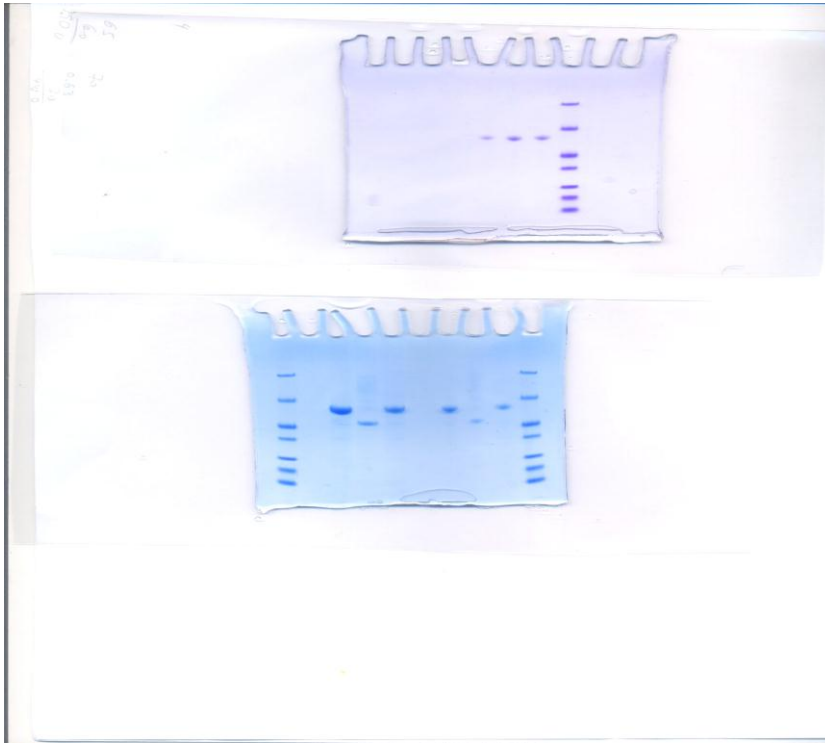


Figura 22 – Gel de gradiente : M: marcador; Q2.2: fração da Mono-Q2; Q3A: fração da Mono-Q3; Q3B: fração da Mono-Q3 (em uma sequencia aplicado 25 μ L e outra 10 μ L).

As amostras então selecionadas para o sequenciamento tanto do N-terminal, quanto para o Massas nesta fase as frações liofilizadas, Q2.1; Q3A e Q3B.

5.6. SEQUENCIAMENTO DAS ENZIMAS

5.6.1. Espectro de massas

Figura 23 – Sequenciamento por espectrometria de massa, referente a banda 45 kDa (10 ul desalted w/c4, thin layer, ext.cal. w/bsa 1+ and 2+)

Figura 24 – Sequenciamento por espectrometria de massa da banda 60^a kDa

Figura 25 - Sequenciamento por espectrometria de massa da banda 60 kDa

A sequência completa dos aminoácidos de uma proteína inclui a sequência de cada uma das suas subunidades, se existirem. Portanto as subunidades precisam ser identificadas e separadas antes de se iniciar o sequenciamento. A Análise dos Grupos Terminais Revela o Número de Diferentes Tipos de Subunidades. Cada cadeia polipeptídica (se ela não estiver quimicamente bloqueada) possui um resíduo amino-

terminal e um carbóxi-terminal. A identificação desses grupos terminais pode estabelecer o número de cadeias polipeptídicas quimicamente distintas em uma proteína. Por exemplo, a insulina possui quantidades iguais de resíduos N-terminais Gly e Phe, que indica que ela possui números iguais de duas cadeias polipeptídicas distintas.

6. CONCLUSÕES

- Para a prospecção primária das cepas houve uma quantidade significativa que produziu a enzima, através da indução com óleo de oliva comercial. Sendo que para a seleção optou-se pelas seis que deram o maior pico de atividade e que estavam em um perfil mais próximos, para serem explorados;
- Na seleção secundária optou-se por realizar a indução com o óleo de dendê, que está em planos futuros de trabalhos voltados para a esterificação do próprio para a obtenção de biodiesel, através a catálise enzimática;
- O extrato bruto teve uma boa atividade enzimática em pHs alcalinos e temperaturas mais altas. Sendo de grande interesse para a indústria enzimas com essas características;
- Foi observado que as resinas de troca iônica e os tampões utilizados foram bons meios de adsorção e de transporte, de forma que ambos promoveram uma boa afinidade entre a resina e as lipases. De forma que deu para se ter uma purificação com níveis bem pequenos de contaminação;
- A análise do sequenciamento foi capaz de obter uma das sequencias para uma enzima (46 kDa) através do massas, que proporcionará a identificação através do

banco de dados. Outra (45 kDa) terá que passar por mais uma etapa de cromatografia para separação de dois componentes indicados pelo sequenciamento. Já para as duas (60 kDa) foi detectado um bloqueio, que impediu de verificar a sequência;

- Assim foi verificado através desse trabalho, a grande possibilidade de se conseguir fontes alternativas da região produtoras de lipases, bem como metodologias que podem ser seguidas para conseguir purificar parcialmente ou totalmente as enzimas. Obtendo ao final suas identidades e contribuindo para ciência e a pesquisa de proteínas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIKEL, U.; ERAN, M.; ACIKEL, Y. S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Food Bioprod. Proc.**, v. 8, p. 31-39, 2010.

BELTRÃO, N. E. de M. Situação atual, problemas, perspectivas e desafios para 2007. Anuário Brasileiro do Biodiesel, São Paulo: Letra Boreal. p. VII-14,15, 2007.

BARON, A. M. **Preparação e Caracterização de Lipases Imobilizadas para Utilização em Biocatálise**. Tese (Doutorado em Ciências – Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 138 f, 2008.

BROCKMAN, H.; MONSEN, W. E.; TSUJITA, T. Lipid-lipid complexes and effects on lipase binding to surfaces. **J. Am. Oil. Chem.**, v. 65, p. 891-896, 1998.

BULL, A.T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, p. 573-606, 2000.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p.75-80, 2003.

CAVALCANTI, S.D.B.; LEVI, JE.; DANTAS, KC, MARTINS, J. E. C. Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**; 102: 41-7, 2007.

CHEETHAM, P. S. J. The application of enzymes in industry, **In A. Wiseman (ed.) Hand Book of Enzyme Biotechnology**. Ellis Horwood, UK., p. 419-522, 1995.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipase**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 2006.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T.; SCANNELL, J. W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, p. 10494-10499, 2002.

ELLIAH, P., PRABHKAR, T.; RAMAKRSH, B.; TALEB, A.T.; ADINAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Proc. Biochem**, v. 39, p. 525-528, 2004.

FREIRE, D. M. A; CASTLHO, L. R. **Lipases em biocatálise**. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 506, 2008.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol Rev**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications on lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for Biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

IFTIKHAR, T.; HUSSAIN. A. (2002). Effect of nutrients on the extracellular lipase production by the mutant strain of *R. oligosporous* T^{uv}-31. **Biotech.** 1(1): p. 15-20, 2002.

LEE, M. H.; LEE, C. H.; OH, T. K.; SONG, J. K.; YOON, J. H. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 7406-7409, 2006.

LIAW, R. B; CHENG, M. P.; WU, M. C. LEE, C. Y. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. **Bioresource Technology**, v.101, p. 8323-8329, 2010.

MAIA, M. M. D. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 23-27, 2001.

MAHADIK, N. D. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MACATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G.; AMUNDSON. C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 67, p. 890-910, 1990.

MESSIAS. J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; DEKKER, R.F.H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosfera* species for lipases: production of lipase by *Botryosfera ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 45, p. 426-431, 2009.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W, Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Curr Opin Struct Biol**, v. 9, p. 732-7, 1999.

NINI, L.; SARDA, L.; LOUIS-CLAUDE, C.; BOITARD, E.; JEAN-PAUL, D.; CHAHINIAN, H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study. **Biochemical Biophysics Acta**, v. 1534, p. 34-44, 2001.

OLIVEIRA, A. N. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal, Amsterdam**, v.13, p. 81-84, 2003.

SAID, S.; PIETRO, C. L. R. Generalidades sobre aplicação industrial de enzimas. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto. Legis Summa, 2004. p. 1-7

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATS T. **Molecular cloning- a laboratory manual**, 2nd ed, 1989.

SALAMEH, M.; WIEGEL, J. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. **Adv. Appl. Microbiol.** v. 61, p. 253-283, 2007.

SHARMA, R., CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, p. 627-662, 2001.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 13-18, 2009.

TOMIC, S.; RAMEK, M. Quantum mechanical study of Burkholderia cepacia lipase enantioselectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, n. 3-6, p. 139-147, 2006.

TSUJUSAKA, Y. OKUMURA, S.; INAI, M. Glyceride synthesis by four kinds of microbial lipases. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 489, p. 415-422, 1977, 1997.

KIM, E. Y.; OH, K. H.; LEE, M. H.; KANG, C. H.; OH, T. K.; YOON, J. H. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 257-260, 2009.

KLIBANOV, A. M.; **Nature**, p. 409, 241, 2001.

ZIRMMERMANN. A. **Aplicação de resolução na síntese estereoseletiva de fermónios de agregação de insetos de palmáceas**. Dissertação de Mestrado. Curitiba. 2005

WATANABE, Y. MIZOKOSHI, K. SHOJAKU, H. WATANABI, I. HINOKI, M. KITAHARA, M. Epidemiological and clinical characteristics of Menieres disease in Japan. **Acta Otol** (Supp) 519:206-10, 1995.

WHITE, TB, and LEE, S. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**, *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (ed), PCR. Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, USA. p 315-322, 1990.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar um experimento com variações na quantidade de óleo, peptona e tweem-80, a fim de otimizar a produção de lípase, assim como passar o material em uma coluna de filtração em gel, com o objetivo de tentar limpar as bandas contaminantes;
- A partir do material purificado restante (enzimas de 60A; 60B e 45 kDa) encontrar o PI, através da focalização isoeletrica;
- Procurar calcular a atividade específica e a recuperação da atividade ao final, em cada etapa de cromatografia, a fim de descobrir a melhor metodologia para purificação da enzima. Esperando realizar esse experimento aqui em Manaus, através da aquisição de colunas com grandes capacidade, para se trabalhar com o aparelho AKTA-PRIMER.
- Ensaia a enzima com reações de esterificação, através de substratos sintéticos: tributirina, com o intuito de verificar suas características físico-químicas;

ANEXOS

Gráficos obtidos das cromatografias de troca iônica, dados adquiridos pelo programa Windaq-32.

Figura 26 – Gráfico da coluna de troca ionica DEAE-1 -FF

Figura 27 – Gráfico da coluna catiônica S-Sepharose-1

Figura 28 – Gráfico da coluna aniônica Mono-Q-1

- Gráficos referentes a segunda cromatografia realizada em maior escala

Figura 29 – Gráfico da DEAE-2A-Sepharose

Figura 30 – Gráfico da coluna aniônica DEAE-2B-Sepharose

Figura 31 – Gráfico da coluna catiônica S-Sepharose-2A-1

Figura 32 – Gráfico da coluna catiônica S-Sepharose-2A-2

Figura 33 – Gráfico da coluna aniônica Mono-Q-2

- Gráficos referentes a tomada do material que não se prendeu as colunas DEAE-2A e 2B-Sepharose.

Figura 34 – Gráfico da coluna aniônica da DEAE-3-FF

Figura 35 – Gráfico referente a coluna catiônica S-Sepharose-3

Figura 36 – Gráfico da coluna Mono-Q-3