

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/55600

IB/ 81996

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Eliane Bogo



Análise da atividade lipolítica de uma nova
lipase de *Xylella fastidiosa* visando
utilização industrial

2003.4.3000

Orientador : Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Eliane Bogo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção de
título de Mestre em Genética de
Microrganismos.

2003

UNIDADE	I.B. 81996
Nº CHAMADA	UNICAMP B634a
V	EX
TOTAL DO BCI	55600
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CDD	

BIBID 300664

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Bogo, Eliane
B634a Análise da atividade lipolítica de uma nova lipase de *Xylella fastidiosa* visando utilização industrial / Eliane Bogo – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Bacteria. 2. Lipase. 3. Clonagem. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

UNICAMP – Instituto de Biologia

Departamento de Genética e Evolução

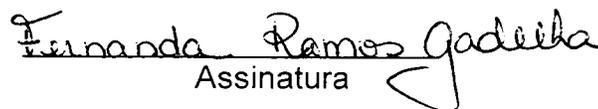


Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

UNICAMP – Instituto de Biologia

Departamento de Bioquímica

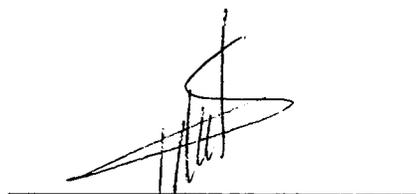


Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

UNICAMP – Instituto de Biologia

Departamento de Genética e Evolução



Assinatura

Prof. Dr. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

UNICAMP – Instituto de Biologia

Departamento de Genética e Evolução



Assinatura

Aos meus pais, Sergio e Lourdes, que além de me ensinarem o sentimento mais nobre que é o amor, me proporcionaram a oportunidade de chegar até aqui sendo os responsáveis por tudo o que sou como ser humano hoje e serei no futuro;

A minha amada irmã Cleise, pela amizade, incentivo e pela coragem que me fez ter para enfrentar meus medos e tentar as oportunidades;

Ao meu querido Pingo, que agora me olha do céu;

Dedico este trabalho.

“Dizem que o que todos procuramos é um sentido para ávida. Não penso que seja assim. Penso que o que estamos procurando é uma experiência de estar vivos, de modo que nossas experiências de vida, no plano puramente físico, tenham ressonância no interior do nosso ser e da nossa realidade mais íntimos, de modo que realmente sintamos o enlevo de estar vivos.”

Joseph Campbell

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira pela orientação, pelo grande incentivo que me deu para vencer os obstáculos durante o desenvolvimento do Mestrado e pela oportunidade de fazer parte de uma equipe de grande valor e conhecimento, o que permitiu adquirir a base de todo o conhecimento que tenho hoje.

A Profa. Dra. Fernanda Gadelha e à Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato pela amizade, participação na pré-banca, pelas correções e sugestões apresentadas, além do exemplo a ser seguido como pesquisadoras.

Ao professor Michel G. A. Vincentz e a professora Ana Maria Espin por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

A professora Gláucia Maria da Engenharia de Alimentos por estar presente em minha pré-banca, pelo incentivo inicial (vindo de uma de suas palestras) para que eu me apaixonasse por esse tema e me dedicasse as lipases.

Aos professores dos cursos de Pós Graduação do Departamento de Genética e Evolução/UNICAMP e da Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, por fazerem parte da minha formação.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética e Expressão (LGE) do Instituto de Biologia/UNICAMP, aos laboratórios do CBMEG do Departamento de Genética e Evolução /UNICAMP e ao Laboratório de BIOAROMAS do Departamento de Ciência de Alimentos da FEA/UNICAMP, pela agradável convivência e pela grande colaboração e paciência ao compartilharem as técnicas e conhecimentos que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Em especial agradeço aos meus colegas de trabalho: Odalys, Janaina, Carlinha, Marcos, Aninha, Cene, Carol e Anderson por suas colaborações, paciência e estímulo.

Aos vários técnicos que passaram pelos laboratórios cuja ajuda foi inestimável, aos funcionários pela disponibilidade e cooperação para resolução de burocráticos.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação do IB pela disponibilidade e gentileza.

Agradeço a todos os amigos de laboratório cujos nomes aqui não coloco, pois seria uma lista imensa: “- Galera Vocês são Demais!”.

Aos amigos Rpgistas, desde a primeira formação na casa do amigo Marcelo Lancellotti até o atual Grupo de RPG “Filhos de Sião”, pela amizade, tolerância em momentos de tensão pré-fim de tese e pelas animadas sessões de jogos que faziam os dias da minha semana muito mais agradáveis.

Aos amigos inestimáveis Julia, Andréa, Janaina, Mônica, Odalys, Gustavo, Marcelo, Alexandre, Maricene, Ana Carolina (mãe do Ulisses), Fernando, BH, Eli, Paola, Rebeca, Thiago, Raquel e Diana entre tantos outros, que aqui não cito, porem estão no meu coração.

E, finalmente, a Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xv
SUMMARY	xvi
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Uso Industrial de enzimas	1
1.2 – Lipases como biocatalizadoras	2
1.3 – Aplicações biotecnológicas das lipases	6
1.3.1 – Detergentes	7
1.3.2 – Polímeros	8
1.3.3 – Biodiesel	8
1.3.4 – Síntese de químicos finos	9
1.3.5 – Lipases na industria de alimentos	9
1.4 – Bactéria <i>Xylella fastidiosa</i>	10
1.5 – Lipases das espécies de <i>Pseudomonas sp</i>	10
1.6 – Expressão heteróloga de proteínas	13
1.6.1 – Bactérias como hospedeiras	14
1.6.2 – Leveduras como hospedeiras	15
2 – OBJETIVOS	17
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	18

3.1 – Linhagens de bactérias e leveduras utilizadas	18
3.2 – Meios de cultura	18
3.3 – Plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados	18
3.4 – Obtenção do DNA genômico de <i>X. fastidiosa</i>	21
3.5 – Clonagem do gene <i>lipXF1</i> em <i>E. coli</i>	22
3.6 – Transformação	22
3.7 – Seqüenciamento	22
3.8 – Comparação da seqüência de lipase de <i>X. fastidiosa</i>	23
3.9 – Clonagem do gene <i>lipXF1</i> no vetor pET32a em <i>E. coli</i>	23
3.10 – Clonagem do gene <i>lipXF1</i> no vetor pPIC9K em <i>P. pastoris</i>	23
3.11 – Indução de expressão	24
3.12 – Teste de Atividade	25
3.13 – determinação do pH e temperatura de atuação da lipase de <i>X. fastidiosa</i>	26
3.14 – Solubilização da proteína	26
3.15 – Purificação da proteína	27
3.16 – Extração de RNA total de levedura para Northern Blotting	28
3.17 – Reação de PCR para detecção dos genes nas colônias de levedura	28
3.18 – Preparação de placas contendo rodamina	29
3.19 – Hibridização com sonda de DNA (Northern Blotting)	29
3.20 – Hibridização com sonda de DNA (Southern Blotting)	30

3.21 – Hibridização com Anti-His para a detecção da proteína recombinante (Western Blotting) 31

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 32

4.1 – Análise da seqüência de lipase de *X. fastidiosa* 32

4.2 – Clonagem do gene *lipXF1* 39

4.3 – Indução da expressão do fragmento *lipXF1* em *E. coli* BL21 40

4.4 – Solubilização da proteína 42

4.5 – Testes preliminares de atividade com extrato celular 45

4.6 – Purificação da proteína 46

4.7 – Curvas de crescimento com indução em diferentes temperaturas 47

4.8 – Teste de atividade com a proteína purificada 49

4.9 – Teste com diferentes pHs e temperaturas utilizando o extrato bruto da lipase de *X. fastidiosa* 52

4.10 – Clonagem no vetor pPIC9K 53

4.11 – PCR de colônia das leveduras transformadas 55

4.12 – Teste de Atividade em placas de rodamina 56

4.13 – Confirmação da presença do inserto no genoma das leveduras transformantes 56

4.14 – Northern Blotting das leveduras transformantes 57

4.15 – Testes de atividade com as leveduras 58

5 – CONCLUSÕES 60

6 – PERSPECTIVAS FUTURAS 61

7 – BIBLIOGRAFIA 62

Tabela I: Progressão do uso de biocatalizadores na indústria química	1
Tabela II: Bioprocessos que aumentaram a sustentabilidade na indústria química	2
Tabela III: Característica que influenciam na atividade da lipase	4
Tabela IV: Classificação das lipases de acordo com similaridade e estrutura	5
Tabela V: Exemplos de Aplicações biotecnológicas das lipases	6
Tabela VI: Uso potencial das lipases nos diversos setores da industria química	7
Tabela VII: Seqüências dos oligonucleotídeos para a amplificação da lipase de <i>X. fastidiosa</i> , incluindo os sítios de restrição para a clonagem	21
Tabela VIII: Valores das titulações e da atividade das amostras induzidas de bactérias hospedeiras (BL21), bactérias com vetor (pET32a) e células recombinantes (XF5 e XF7), Δ é a diferença de volumes da titulação com NaOH 0,05N utilizada na fórmula $\mu\text{Mol}/\text{min} = M * \Delta * 1000 / T * P$ para determinação da atividade.	46
Tabela IX: Valores das titulações e da atividade das amostras de proteína lipXF1 purificada.	49
Tabela X: Determinação da concentração ótima de atividade da lipase de <i>X. fastidiosa</i>	51
Tabela XI: Atividade do extrato bruto sonicado em triplicata de BL21 nas temperaturas de 30°C, 50°C e 65°C utilizando os pHs 7.0; 8.0 e 9.0.	52
Tabela XII: Atividade do extrato bruto sonicado em triplicata do clone XF5 nas temperaturas de 30°C, 50°C e 65°C utilizando os pHs 7.0; 8.0 e 9.0.	53
Figura 1: A ação catalítica das lipases. Um triacilglicerol pode ser hidrolisado formando glicerol e ácidos graxos, ou a reação contrária (síntese) pode combinar glicerol e ácidos graxos formando triacilgliceróis .	3

- Figura 2: Meios de secreção de lipase utilizados pelas bactérias Gram-negativas do gênero *Pseudomonas* 12
- Figura 3: Seqüência de nucleotídeos do gene putativo (ORF XF1181) de lipase traduzido para aminoácidos. 32
- Figura 4: Alinhamento da seqüência do gene da lipase de *X. fastidiosa* com o gene da lipase (GenBank number - gi:126329) de *Pseudomonas sp* (E-value= $7e^{-99}$ e Score = 362 bits) 33
- Figura 5: Alinhamento da lipase de *X. fastidiosa* (lipxylella) com as lipases das espécies *Pseudomonas aeruginosa* (lippaeru), *Pseudomonas fluorescens* (lippflu), *Proteus vulgaris* (lipproteu) e *Pseudomonas fragi* (lipfrag) pertencentes à **subfamília 1**. (**Em vermelho**: resíduos de aminoácidos que pertencem à tríade do sítio catalítico da lipase; **em verde**: resíduos de ácido aspártico envolvidos no sítio de ligação ao Ca^{++} ; **em roxo**: resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto; **em azul**: regiões conservadas e relacionadas aos sítios catalíticos). 34
- Figura 6: Alinhamento da lipase de *X. fastidiosa* (lipxyll) com as lipases das espécies *Chromobacterium viscosum* (lipchro), *Burkholderia glumae* (lipburk), *Pseudomonas luteola* (lipluteo) e *Pseudomonas cepacia* (lipcep) pertencentes à **subfamília 2**. (**Em vermelho**: resíduos de aminoácidos que pertencem à tríade do sítio catalítico da lipase; **em verde**: resíduos de ácido aspártico envolvidos no sítio de ligação ao Ca^{++} ; **em roxo**: resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto; **em azul**: regiões conservadas e relacionadas aos sítios catalíticos). 35
- Figura 7: Predição do iSort para as seqüências: A) lipase de *X. fastidiosa* (lipXF1) e B) lipase de *P. luteola* (GI-126329) demonstrando a alta hidrofobicidade (pontilhado roxo) encontrada na lipase de *Pseudomonas* e a baixa em *Xylella* sendo mais um dado que demonstra que essa não é uma lipase tipicamente secretada (gráfico gerado pelo programa gnuplot). 37
- Figura 8: Valores da predição para as lipases de *X. fastidiosa* (lipXF1) e de *P. luteola* (lipPl) 37

(*lipP1*)

Figura 9: Valores da predição do pFAM para domínios na lipase de *X. fastidiosa*. 38

Figura 10: Os dois melhores alinhamentos encontrados com o programa pFAM para a lipase de *X. fastidiosa*. 38

Figura 11: **A:** PCR do DNA genômico para amplificação do gene de lipase de *X. fastidiosa*. **1.** DNA λ HindIII **2.** LipP **3.** *lipXF1*. A seta indica o fragmento de aproximadamente 1.132pb correspondente ao gene de interesse. **B:** PCR das colônias selecionadas contendo *lipXF1*. **1.** DNA λ HindII **2.** PCR de DNA genômico de *X. fastidiosa* **3.** DNA plasmideal Pet*lipXF1*-6 **4.**DNA plasmideal Pet*lipXF1*-14, **5.** DNA plasmideal Pet*lipXF1*-17 **6.** DNA plasmideal pET-32a **7.** controle negativo **8.** pET-32a digerido *EcoRI* e *XhoI*. 39

Figura 12: Indução de expressão da lipase de *X. fastidiosa* em pET32a. M padrão de peso molecular, AI antes da indução e DI depois da indução, BI21 bactéria sem ser transformada, pET32a bactéria transformada somente com o vetor pET32a, XF5 e XF7 colônias transformantes expressando a proteína recombinante *lipXF1*. A seta indica a proteína heteróloga *lipXF1*. 41

Figura 13: **A.** gel SDS-PAGE de indução, **B.** Western blotting com as mesmas amostras de **A.** M - Padrão de peso molecular. BI21, pET32a, XF5 e XF7 são amostras de depois da indução. A seta indica a proteína *lipXF1* 41

Figura 14: Teste com o sobrenadante das culturas induzidas de: Bactéria hospedeira (BI21); Bactérias com o vetor pET32a (pET32a) e bactéria transformante (XF7). Antes da indução (AI) e depois da indução (DI) assim como o sobrenadante de Antes da indução (SAI) e de depois da indução (SDI) da colônia transformante. 42

Figura 15: Teste solubilização de lipase de *X. fastidiosa* com Triton X-100. M -Padrão de peso molecular. Após a mistura com Triton X-100 tanto o extrato celular (EC) centrifugado como o sobrenadante (S) das células; sem vetor (BI21), com vetor (pET32a) e recombinante (XF5) foram testados . A seta indica a proteína *lipXF1*. 44

Figura 16: Teste solubilização de lipase de *X. fastidiosa* com Uréia 6M. M - Padrão 44
de peso molecular. Após a mistura com Uréia 6M a amostra foi
centrifugada e tanto o extrato celular (EC) centrifugado como o
sobrenadante (S) das células; sem vetor (BI21), com vetor (pET32a) e
recombinante (XF5 e XF7). Seta indica proteína heteróloga solubilizada
parcialmente.

Figura 17: Teste de atividade da lipase de *X. fastidiosa* feita com precipitado de 45
células rompidas. CN - Controle negativo, CP - Controle com lipase
comercial, 1, 2 e 3 teste em triplicata do recombinante XF5 antes (AI) e
depois da indução (DI).

Figura 18: **A.** gel SDS –PAGE 12% mostrando a purificação da lipase de *X.* 47
fastidiosa. **B.** Western blotting utilizando anticorpo anti-cauda de histidina
com proteína solubilizada em tampão Uréia 6M e imidazol 30mM.
1. Marcador de peso molecular (M). **2 à 10** correspondem as aliquotas
eluídas em tampão Uréia 6M e imidazol 80mM. A seta indica a presença
da proteína após a purificação e a sua detecção em *Western blotting*.

Figura 19: Gráficos I, II e III referentes às curvas de crescimento – BI21 se refere as 48
colônias de bactérias sem nenhum vetor introduzido. Pet se refere à
colônia transformada apenas com o vetor sem inserto e Xf5 e Xf7 são duas
colônias selecionadas e que expressam o gene da lipase.

Figura 20: Teste em duplicada da atividade utilizando várias concentrações de 50
proteína purificada. CN controle negativo, **1** teste contendo 1 µg de
proteína, **2** teste contendo 5 µg de proteína, **3** teste contendo 10 µg de
proteína, **4** teste contendo 15 µg de proteína, **5** teste contendo 20 µg de
proteína, **6** teste contendo 25 µg de proteína, **7** teste contendo 30 µg de
proteína, **8** teste contendo 35 µg de proteína, **9** teste contendo 40 µg de
proteína, CP controle positivo contendo 40 ug da proteína comercial.

Figura 21: **A** - Amplificação do gene *lipXF1* utilizando oligonucleotídeos específicos. 54
1e10 - Marcador de peso molecular λHindIII **2** - Colônia azul **3 a 6** -
Colônias brancas **7** - PCR de DNA genômico de *Xylella* **8** - ligação pGEM-

T lipXF1 e 9 – lipXF1 purificado por concert a partir de PCR. B- Digestão de alguns clones pPIC9k-lipXF1. 1 - Marcador de peso molecular λ HindIII 2 – pPIC9k digerido 3 – colônia 54 4 – colônia 55 5 – colônia 56 6 – colônia 57.

Figura 22: PCR de alguns clones pPIC9k-lipXF1. 1 e 16- Marcador de peso molecular λ HindIII 2 – H₂O 3 – DNA genômico de *X. fastidiosa* 4 – pPIC9K; 5 – *lipXF1* purificado; 6 ao 15 colônias E1 – E10 e na segunda linha do 17 ao 30 colônias E11 até F12 referentes a uma placa de 96 pocinhos.

Figura 23: PCR de colônia das leveduras transformantes com pPIC9K-LipXF. São 3 géis juntos: **primeiro gel:** 1 - Marcador de peso molecular λ HindIII 2 ao 9 colônias controle negativo, transformadas só com o vetor pPIC9K 9 ao 15 – colônias transformadas com o vetor proveniente da colônia 59 de *E. coli* digerida com *Bgl*II **segundo gel:** 1 - Marcador de peso molecular λ HindIII 2 ao 6 do terceiro gel continuação de colônias positivas transformadas com o vetor proveniente da colônia 59 de *E. coli* digerida com *Bgl*II **terceiro gel:** 1 - Marcador de peso molecular λ HindIII 7 ao 18 colônias positivas transformadas com o vetor proveniente da colônia 60 de *E. coli* digerida com *Bgl*II.

Figura 24: Hibridização de 18 colônias de levedura transformantes. As setas indicam hibridização positiva.

Figura 25: Hibridização utilizando-se amostras de RNA extraído das colônias 2, 7, 10, e 6 e RNA de levedura sem vetor(GS115), nos tempos de indução T₀=0, T₁=60min, T₂=120min e T₃=180min após a indução com metanol. O controle positivo é o produto de PCR de *lipXF1*.

Resumo

Com a finalização do Projeto Genoma da bactéria *Xylella fastidiosa* foi possível identificar a existência de um gene putativo homólogo a um gene de lipase de *Pseudomonas sp*, sendo esta espécie amplamente empregada industrialmente para a produção dessa classe de enzima. Esse fato despertou o nosso interesse para o estudo do gene de *X. fastidiosa* com o objetivo de avaliar o potencial biotecnológico da enzima codificada pelo mesmo.

O gene foi clonado em pET32a e a proteína expressa em *E. coli*, apresentando-se predominantemente insolúvel. A proteína foi solubilizada pela adição de uréia 6M e posteriormente purificada em coluna de afinidade. Entretanto, as quantidades produzidas em bactéria eram pequenas e as primeiras tentativas de produção em *Pichia pastoris* não foram bem sucedidas.

A atividade da enzima produzida em bactéria foi comprovada tanto em extrato protéico como com a proteína purificada, possuindo essa uma atividade semelhante à enzima extraída do gênero *Pseudomonas*. Testes preliminares feitos com extratos protéicos indicam que a atividade dessa enzima é maior em temperaturas acima de 50 °C e pHs alcalinos. Isso indica que essa lipase tem potencial biotecnológico, e que a otimização da sua produção poderá levar a obtenção de uma enzima de qualidade para processos industriais.

Abstract

The end of the *Xyella fastidiosa* genome project made it possible to identify a putative gene homologue to *Pseudomonas* sp lipase, that has been widely used to produce this type of enzyme for industry, purpose this fact increased researchers interest in studying the related gene in order to verify the biotechnological potential of the enzyme encoded by it.

The gene was cloned within the vector pET32a and expressed in *E.coli*. The protein produced was mostly insoluble and became soluble by the addition of 6M urea. An affinity column was used to purify the protein, although the quantities produced in *E. coli* were very low. The first attempt to transcript this lipase in *P. pastoris* was not successful.

Enzyme's activity produced in *E. coli* was confirmed in the crude extract as in purified protein. The activity in the crude extract was similar to enzyme products from *Pseudomonas*. Initial tests performed with the crude extract indicated that the optimal activity of this enzyme is associated with high temperatures (over 50°C) and alkaline pHs. This data shows that this enzyme has biotechnological potential and its optimization will make it possible to obtain a enzyme with good quality for industrial processes.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Uso Industrial das Enzimas

A indústria química hoje representa um dos maiores setores na economia mundial, sendo o seu papel predominante nas companhias européias e americanas. Apesar da indústria química estar muito evoluída, a criação de novas tecnologias para a utilização de enzimas, incluindo a biocatálise e a engenharia de bioprocessos, permitirá o acesso das indústrias a novos segmentos de mercado e novas aplicações para produtos analíticos e sintéticos [1, 2].

As enzimas são utilizadas principalmente nos segmentos industriais correspondentes a: química orgânica, drogas, produtos de limpeza e polímeros, onde se espera um rápido desenvolvimento tecnológico. A biocatálise acumula atualmente 2% do mercado químico (US\$25 bilhões por ano) [2].

Para ilustrar o crescente uso das enzimas nos processos industriais a Tabela I, lista os setores industriais e uma progressão estimada de seu desenvolvimento [2].

Tabela I: Progressão do uso de biocatalizadores na indústria química [2].

Setores industriais	Impacto estimado*		
	Hoje	Futuro próximo	Futuro Distante
Orgânicos	+	++	+++
Comidas e aditivos alimentícios	+++	+++	+++
Química fina	+	++	+++
Drogas (antibióticos e intermediários)	++	++	++
Materiais plásticos e sintéticos	+	++	++
Sabões, produtos de limpeza.	+	++	++
Inorgânicos	-	+	+
Misto de produtos (indústria do papel, processo de óleos, têxteis e adesivos).	+	+	++
Agroquímicos (herbicidas e intermediários)	+	+	++

*(+++ muito alta; ++ alta; + moderada e – baixa)

Várias pesquisas para garantir a sustentabilidade de um processo de produção, com relação à energia, a matéria prima usada, a produção de dejetos e os processos que estabilizam e asseguram a qualidade de um produto, estão sendo desenvolvidas onde se procura melhorar a atividade enzimática. Esses estudos compreendem desde a seleção de novas enzimas capazes de substituir processos químicos já existentes até o uso de cristalografia de certas enzimas ou o proteoma de alguns organismos. Estas pesquisas

refletem numa redução dos custos de produção e contribuem para uma maior competitividade entre as indústrias e os países produtores dessas tecnologias [1, 3, 4].

Hoje certas aplicações enzimáticas em indústrias químicas estão bem estabelecidas e, devido ao atual desenvolvimento, o número de processos biocatalíticos continuará a aumentar rapidamente. Podemos observar pela Tabela II alguns processos da indústria química que se tornaram sustentáveis graças à utilização de bioprocessos.

Tabela II: Bioprocessos que aumentaram a sustentabilidade na indústria química.*

Produto	Enzima Catalisadora	Comparação com processos convencionais	Companhia
Poliéster	Lipase (C. antarctica)	Alta qualidade do produto e não existe processo convencional alternativo	Baxenden
Remoção do peróxido de hidrogênio de Tecidos	Catalase	Processo simples com alta qualidade e diminuição na produção de dejetos	Windel
Remoção de ésteres de ácidos graxos de óleos	Fosfolipases	Processo simples redução de 10% a produção de dejetos, redução de 8% na produção de óleo sujo e redução no uso de matéria prima.	Cereol
Remoção de Sulfatos	Sulfato redutase microbiana	Presença de sulfatos e flúor nos despojos líquidos foi muito reduzido.	Budel Zink

* Resumida da tabela apresentada por Schmid *et al.* (2002)

Ao mesmo tempo em que a indústria química aumenta o seu interesse pela biocatálise e processos biotecnológicos com menores custos e sendo mais eficientes um grupo de enzimas se destacou: as lipases [1].

1.2 – Lipases como Biocatalizadoras

No século passado o microbiologista Eijkmann descreveu a capacidade de várias bactérias em produzir e secretar lipases. Quando se tornou aceito que as lipases se mantinham enzimaticamente ativas em solventes orgânicos, iniciaram-se vários estudos sobre estas enzimas com o objetivo de torná-las ferramentas para a indústria química [5].

As lipases (E.C. 3.1.1.3) catalisam tanto a hidrólise quanto a síntese de ésteres formados a partir de glicerol e longas cadeias de ácidos graxos (Fig. 1) [5, 6]. Essas reações geralmente procedem com alta regiãoseletividade e/ou enantioseletividade, uma situação muito vantajosa para a indústria. A essa propriedade soma-se o fato de que essas enzimas

podem ser obtidas em grandes quantidades, pois muitos microorganismos superexpressam elas naturalmente, e elas não precisam de cofatores para as suas reações. Além disso, muitas lipases já tiveram as suas estruturas resolvidas, facilitando consideravelmente o desenvolvimento de estratégias racionais de engenharia de proteína, visando a melhoria das características específicas da enzima [5, 7].

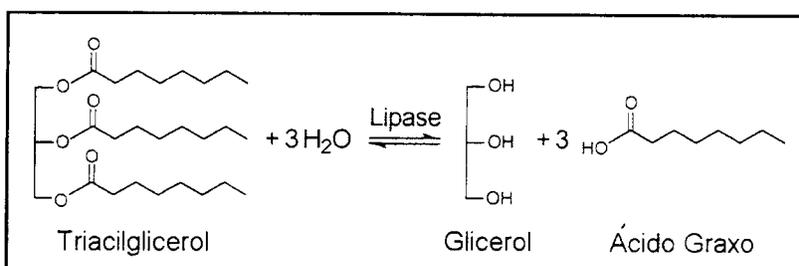


Figura 1: A ação catalítica das lipases. Um triacilglicerol pode ser hidrolisado formando glicerol e ácidos graxos, ou a reação contrária (síntese) pode combinar glicerol e ácidos graxos formando triacilgliceróis [5, 6].

As lipases também são capazes de realizar outras reações de grande importância para a indústria, como: esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise), interesterificação e lactonização [8].

O uso comercial das lipases compreende uma grande variedade de diferentes aplicações na área de detergentes e na produção de ingredientes alimentícios ou mesmo na fabricação de componentes enantiopuros para a indústria farmacêutica [6].

Apesar de várias lipases já serem utilizadas pelos diversos ramos industriais, ainda existe uma grande pressão para a identificação e isolamento de novos genes de lipases e para a otimização das lipases existentes com respeito as propriedades desejadas. Os altos níveis de produção de lipase microbiana requerem não somente um detalhado entendimento dos mecanismos moleculares que governam sua secreção e estrutura, como também métodos eficientes de super-expressão dos genes correspondentes, o que pode ser obtido com o uso das ferramentas de biologia molecular [5, 6].

Algumas características, como os efeitos da temperatura e de solventes orgânicos podem afetar a atividade e a seletividade das lipases [9]. Cada lipase possui características próprias e um resumo de como pode variar essa seletividade, dependendo da origem da lipase, é demonstrado na Tabela III.

Tabela III: Característica que influenciam na atividade da lipase [9]

Peso molecular		Pode variar de 20 a 200KDa
pH de atuação		Pode variar de 4.0 a 9.0
	Bactérias	7.0
	Leveduras	5.0 a 6.0
	Fungos	4.0 a 7.0
Temperatura de Atividade		Varia de 25°C a 70°C
Tipos de Especificidade		Lipases sem especificidade definida
		Específicas para a ligação 1,3
		Específicas ao tipo certo de ácido
		Graxo

Recentemente muitas lipases tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas. As primeiras foram a lipase produzida pelo fungo *Rhizomucor miehei* e a lipase pancreática humana, cujas estruturas foram determinadas em 1990. Desde então, novas estruturas foram determinadas, sendo todas de origem microbiana [6, 10].

Com estes estudos foi possível se determinar uma estrutura, denominada, α/β -hidrolase, presente em todas as lipases, além de se obter um maior entendimento no modo de ação das lipases sobre os substratos, inclusive sobre a sua ativação na interface óleo-água [11-13].

A partir das comparações entre as estruturas tridimensionais e a atividade das diversas lipases Arpigny e colaboradores (1999) desenvolveram uma classificação das lipases mais importantes já descritas. Nesse estudo foram analisadas 53 seqüências de lipases bacterianas e esterases, as quais foram classificadas de acordo com a conservação das seqüências motivos (sítios ativos) e propriedades biológicas. As informações relevantes foram extraídas dos estudos das estruturas tridimensionais, dando uma compreensão para efetuar as comparações (Tabela IV) [14].

Tabela IV: Classificação das lipases de acordo com similaridade e estrutura (Arpigny, J. L. 1999)

Subfamília	Espécie produtora de lipase	Acesso	Similaridade(%)		Propriedades
			Família	Subfamília	
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LipA)*	D50587	100		Lipases Verdadeiras
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95		
	<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LipC)	U75975	51		
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43		
	<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40		
	<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39		
	<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38		
2	<i>Burkholderia glumae</i> *	X70354	35	100	
	<i>Chromobacterium viscosum</i> *	Q05489	35	100	
	<i>Burkholderia cepacia</i> *	M58494	33	78	
	<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	77	
3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIKW1	D11455	14	100	
	<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	51	
4	<i>Bacillus subtilis</i> (LipA)*	M74010	16	100	
	<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	80	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	U35855	13	80	
	<i>Bacillus subtilis</i> (LipB)	C69652	17	74	
5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> L1	U78785	15	100	
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> P1	AF237623	15	94	
	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94	
	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	AF134840	14	92	
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	100	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AF096928	15	45	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	44	
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	36	Fosfolipases
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	AF208229	14	36	
	<i>Staphylococcus warneri</i>	AF208033	12	36	
7	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100	
	<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	U80063	14	50	

* Enzima com estrutura 3D resolvida.

Programa usado para montar a similaridade de aminoácidos Megaling (DNASar)

Foram então criadas oito famílias de lipases e esterases, sendo que na família 1 se encontram as “lipases verdadeiras” e fosfolipases (subfamília seis). Essa família é subdividida em sete subfamílias.

Algumas das lipases representadas na Tabela IV são utilizadas pela indústria em processos de biocatálise. A Tabela V demonstra algumas dessas utilizações.

Tabela V: Exemplos de Aplicações Biotecnológicas das lipases

Origem	Organismo Produtor	Aplicação Biotecnológica	Indústria que a produz
Fungos	<i>Cândida rugosa</i>	Síntese orgânica	Amano, Biocatalysts, Boehringer, Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Cândida Antarctica A/B</i>	Síntese orgânica	Boehringer, Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Termomyces lanuginosus</i>	Aditivo de detergente	Boehringer, Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Rhizomucor Miehei</i>	Processamento alimentício	Novo Nordisk, Amano, Biocatalysts
Bactérias	<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntese orgânica	Boehringer, Mannheim, Amano, Fluka
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo de detergente	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo de detergente	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntese orgânica	Asahi, Biocatalysts

1.3 – Aplicações Biotecnológicas das Lipases

Em 1994 a representação das lipases no mercado mundial era de apenas 4%, pouco perto de outras enzimas hidrolíticas (proteases e carbohidrases), que eram pelo menos dez vezes maior. O maior obstáculo para uma maior utilização do potencial das lipases é o custo dessa enzima [15].

Por essa razão existe uma grande pressão para identificar e isolar novas lipases que otimizem os processos existentes, melhorar o desempenho de enzimas já comercializadas e aprimorar os processos de extração, purificação e utilização das mesmas.

As lipases podem ser empregadas em praticamente todos os ramos industriais,, como apresenta a Tabela VI.

Tabela VI: Usos potenciais das lipases nos diversos setores da indústria química.

SETOR INDÚSTRIAL	UTILIZAÇÃO
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite Produção de aromas para seus derivados
Panificação	Aumento do aroma, da qualidade e da vida de Prateleira
Cervejaria	Aumento do aroma Aceleração de fermentação em função de lipídeos
Molhos	Aumento da qualidade do ovo pela hidrólise dos lipídeos
Processamento de carne	Desenvolvimento do aroma Remoção do excesso de gordura
Processamento de óleo	Transesterificação dos óleos Interesterificação de óleos e gorduras
Química fina	Síntese de ésteres; Síntese de aromas e fragrâncias; Resolução de racematos
Detergentes	Hidrólise de gorduras e óleos
Farmacêutica	Digestão de óleos e gorduras em alimentos
Médica	Determinação de triglicérides no sangue
Cosmética	Remoção de lipídeos
Couro	Remoção de lipídeos da pele de animais
Tratamento de resíduos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas
Indústria do papel	Limpeza dos lipídeos acumulados durante o processo

Algumas das aplicações acima descritas serão detalhadas nos itens abaixo relacionados.

1.3.1 Detergentes

A mais importante aplicação industrial das lipases é sem dúvida a sua adição a detergentes, o qual pode ser tanto para uso doméstico ou em lavanderia industrial como em máquinas caseiras de lavar pratos.

Em 1995 foi estimada a venda de enzimas por volta de US\$30 milhões, sendo que 30% correspondem a enzimas usadas em detergentes. É estimado que 1000 toneladas de lipase sejam adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos a cada ano [6, 16]. Em 1994, a Novo Nordisk introduziu a primeira lipase comercial, conhecida como LipolaseTM, originária do fungo *T. lanuginosus* e expresso em *Aspergillus oryzae*. Em 1995, duas lipases bacterianas foram introduzidas – LumafastTM feita a partir da lipases de

Pseudomonas mendocina e logo depois a Lipomax™ de *Pseudomonas alcaligenes*, ambas produzidas pela Genencor internacional (www.novonordisk.com; www.genencor.com).

Para se conseguir produzir uma lipase comercial para o ramo de detergentes é necessário a resolução de alguns desafios próprios desse processo, como:

- 1- A alta variação de triglicerídeos contidos nas gorduras requer uma lipase com baixa especificidade por substratos;
- 2- Para condições de lavagem extremas (pHs de 10 a 11 e temperaturas de 30 a 60°C) é necessário uma lipase com alta estabilidade;
- 3- Devido à presença de aditivos como desnaturantes, aditivos da linha dos surfactantes alquil benzeno sulfonados (LAS) e proteases, a lipase deve ser capaz de agüentar ação proteolítica desses componentes.

A solução para esses problemas está sendo desenvolvida através de contínuas seleções de novas lipases e o uso da engenharia genética para melhorar as propriedades das lipases já existentes no mercado.

1.3.2 Polímeros

Biopolímeros como polifenóis, polissacarídeos e poliésteres mostram um considerável grau de diversidade e complexidade. Hoje em dia esses componentes estão recebendo cada vez mais atenção por serem biodegradáveis e produzidos de matéria prima renovável. Lipases e esterases são usadas como catalisadoras para a síntese de polímeros, com a maior vantagem de serem altamente seletivas sob condições suaves de reação [5].

1.3.3 Biodiesel

Um meio alternativo de energia para o transporte público é o chamado Biodiesel, o qual pode ser produzido quimicamente usando óleo de várias plantas. O combustível originado de matéria-prima renovável reduz consideravelmente a produção de óxido sulfúrico. A conversão de óleos vegetais para metil- e outros ésteres (álcoois) de cadeia curta pode ser catalisado em uma simples reação de transesterificação usando lipase em solventes orgânicos. Mas, por enquanto a produção industrial é inviável, pois o preço de obtenção da lipase é ainda muito alto [17].

Muitos estudos ainda estão surgindo sobre esse novo tipo de combustível e sobre a sua utilização e obtenção de maneira mais econômica.

1.3.4 Síntese de Químicos Finos

O principal problema na cadeia de síntese para terapêuticos, agroquímicos, aromas e óleos especiais está nos complexos componentes quirais, os quais são difíceis de sintetizar por métodos químicos convencionais [18], dessa forma, somente uma de duas drogas enantioméricas é funcional para o uso farmacêutico e agro-industrial, tornando a síntese de produtos enantiopuros o maior desafio dessas indústrias. Essa é a maior razão para a expansão dramática da biocatálise, tendo os estudos sobre as lipases como a vanguarda desse desenvolvimento [5, 18], pois um dos mais excitantes aspectos das lipases é a sua capacidade de catalisar reações com enantioseletividade em escala industrial.

Existe dois tipos básicos de enantioseletividade responsáveis por transformações orgânicas catalisadas por lipases [6]: reações de substratos proquirais o que consiste em reações com componentes não quirais, mas que geram moléculas quirais ou estereogênicas e a resolução cinética de racematos, o que significa a separação dos componentes quirais de uma mistura de enantiômeros.

As lipases tipicamente utilizadas como catalisadoras são as produzidas pelas bactérias *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e outras espécies de *Pseudomonas*, *Burkholderia cepacia*, *C. viscosum*, *Bacillus subtilis*, *Achromobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, e *Serratia marcescens*, assim como dos fungos *Candida Antarctica* e *C. rugosa* [6].

No entanto, apesar do grande número de publicações nessa área, o número de processos industriais baseados em lipases catalisando reações de enantioseletividade ainda é limitado. Em geral os problemas incluem: Insuficiente enantioseletividade; Atividade enzimática limitada (baixa estabilidade); Dificuldades na reciclagem da lipase; Limitações práticas inerentes da resolução cinética pelo fato de que o máximo possível de conversão é de 50% [6, 19].

1.3.5 Lipases na Indústria de Alimentos

Na indústria de alimentos as lipases se tornaram uma parte essencial. O seu uso pode ser observado na produção de aromas para queijos e seus derivados, na produção de sucos

de frutas, comidas pré-cozidas e na fermentação de vegetais para o enriquecimento de produtos lácteos.

Óleos, gorduras e componentes aliados aos óleos são os alvos para a tecnologia dos alimentos. Durante a estocagem ocorrem mudanças nos alimentos, e a mais importante é a degradação dos lipídeos pelas lipases, essa degradação é responsável pela formação dos aromas desses alimentos. Esse aspecto é explorado pelas indústrias de alimentos pelo uso de lipases comerciais específicas para degradar os lipídeos desejados e produzir aromas mais agradáveis [20].

1.4 Bactéria *Xylella Fastidiosa*

O primeiro genoma seqüenciado no Brasil foi o da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* [21]. Esse projeto além de seqüenciar todo o genoma dessa bactéria, utilizou programas de bioinformática para identificar ORFs (regiões codificantes para prováveis proteínas) em seu genoma. Dentre as várias ORFs identificadas três apresentaram alta similaridade com genes de lipases de outros organismos. Em especial uma delas identificada no endereço eletrônico da FAPESP (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf>) como **ORF XF1181** apresentou similaridade com lipases das bactérias *Pseudomonas sp.*, despertando um grande interesse pelo possível uso biotecnológico dessa provável proteína.

1.5 Lipases das espécies de *Pseudomonas sp*

As bactérias produzem diferentes classes de enzimas lipolíticas, incluindo carboxiesterases como lipases e esterases. Dessas enzimas lipolíticas, as lipases bacterianas recebem uma atenção especial por dois grandes motivos: são importantes como fatores de virulência produzidos por bactérias patogênicas e são a mais importante categoria de biocatalisadores [22].

Isso é aplicado principalmente às lipases produzidas pelas bactérias do gênero *Pseudomonas*. Esse gênero de bactéria teve suas lipases intensamente estudadas, clonadas e caracterizadas e são as mais utilizadas na indústria [23-26].

Os estudos mais recentes que utilizam a caracterização tridimensional dessas lipases têm trazido novos conhecimentos sobre as suas funções e propriedades e tem ajudado na

compreensão de como as lipases são secretadas e se tornam ativas, assim como sobre a sua ativação interfacial [22].

Uma das características que tornou as lipases de *Pseudomonas* muito atrativas é a sua termoestabilidade. Essa característica foi observada há muitos anos atrás, quando se reconheceu que a deterioração do leite era causada pela atividade de uma lipase termo-resistente produzida por diferentes espécies psicotróficas (resistentes ao frio) de *Pseudomonas* [27]. Outras características das lipases produzidas pelas *Pseudomonas* se tornaram conhecidas através dos estudos dos agentes de deterioração do leite, como a sua tendência por atividade ótima em pHs alcalinos, e sua atividade mesmo em baixas quantidades de água, sendo que algumas são capazes de degradar até mesmo leite em pó [28].

Lipases de diferentes espécies que foram purificadas e caracterizadas bioquimicamente apresentaram diferenças quanto à temperatura, pHs, peso molecular e presença de agregados lipopolissacarídeos durante a secreção [14, 27].

A maioria das lipases produzidas por espécies de *Pseudomonas* é secretada para o meio externo. A bactéria *P. fluorescens*, no entanto, é uma exceção, pois produz dois tipos de lipases, sendo que uma delas é provavelmente citoplasmática, ou sua atividade extracelular não é detectável [29]. O estudo dessas duas lipases demonstrou que elas são diferentes em suas características. A extracelular pertence ao grupo I.2 da subfamília I enquanto a citoplasmática pertence ao grupo I.1 da subfamília I, segundo a classificação apresentada por Arpigny e colaboradores (1999) (Tabela IV).

Nas bactérias Gram-negativas como as do gênero *Pseudomonas*, existem pelo menos três meios de se secretar lipases para o meio externo (Figura 2) [22].

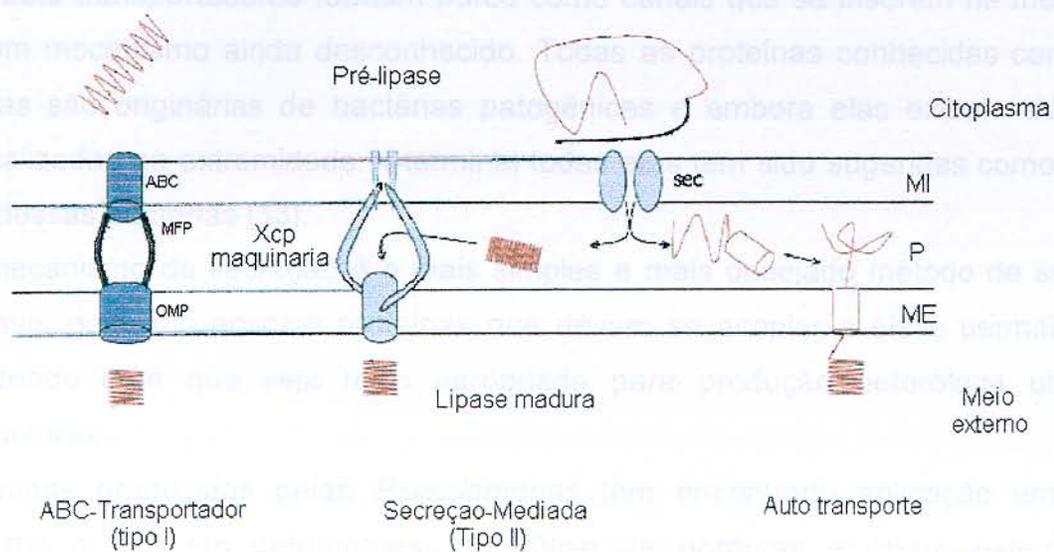


Figura 2: Meios de secreção de lipase utilizados pelas bactérias Gram-negativas do gênero *Pseudomonas* [22].

No mecanismo de secreção chamado ABC-transportador existem três proteínas que cooperam com a secreção da lipase. A lipase secretada pela bactéria *P. fluorescens* é um exemplo desse mecanismo. A primeira proteína (ABC – ATP- “binding” cassette) é responsável pela ligação da lipase à membrana interna da célula, a segunda (MFP – “membrane-fusion-protein”) faz a ligação entre a membrana interna e a externa e a terceira (OMP – “Outer membrane protein”) libera a lipase para o meio externo já na sua conformação madura [30].

O segundo tipo de secreção, chamado Secreção-Mediada ainda é um mecanismo pouco estudado e cujo processo ainda é desconhecido. O que se sabe é que existe uma proteína chamada Lif (“Lipase-specific-foldase”) responsável pela maturação da lipase e é aceito que essa maturação acontece no periplasma, antes do seu transporte através da membrana para fora da célula. A proteína Lif é codificada em um operon com sua lipase relacionada, como identificado em estudos com a lipase de *P. aeruginosa*, *P. wisconsinensis*, *B. cepacia*, *B. glumae*, *A. calcoaceticus* e *V. cholerae* [5, 22, 31, 32].

O terceiro tipo é independente de transportador pois a lipase possui um domínio na extremidade C-terminal fazendo com que ela consiga se auto transportar para o meio externo da célula. Essas enzimas possuem, geralmente, um sítio ativo característico chamado GDSL como descrito para a proteína lipolítica EstA [33].

Esses auto transportadores formam poros como canais que se inserem na membrana externa por um mecanismo ainda desconhecido. Todas as proteínas conhecidas como auto transportadoras são originárias de bactérias patogênicas e embora elas exibam diferentes atividades localizadas na extremidade N-terminal todas elas tem sido sugeridas como fatores de virulência dessas bactérias [33].

Esse mecanismo de secreção é o mais simples e mais desejado método de secreção para uma lipase, pois não envolve proteínas que devam se acoplar a ela e permitir a sua secreção, fazendo com que seja mais apropriada para produção heteróloga utilizando potentes promotores.

As enzimas produzidas pelas *Pseudomonas* têm encontrado aplicação em vários processos como o uso em detergentes, glicerólise de gorduras e óleos, esterificação, resolução quiral e síntese de acrilatos [34] e foram incluídas nas classes I.1 e I.2 da subfamília I da classificação de Arpigny e colaboradores (1999) (Tabela IV), sendo que vários trabalhos descrevem suas aplicações e estudos relacionados [5, 9, 27, 35, 36].

1.6 Expressão Heteróloga de Proteínas

A tecnologia do DNA recombinante possibilitou a obtenção de organismos com características novas ou não encontradas na natureza, o que permitiu uma nova alternativa para o melhoramento genético de espécies de valor biotecnológico [37].

Desse modo, células de bactérias, leveduras e mesmo eucariontes superiores como plantas puderam ser programadas para a expressão de genes exógenos, abrindo a perspectiva de produção nestes organismos de polipeptídios de interesse. A utilização de microrganismos modificados geneticamente, capazes de sintetizar proteínas em grande quantidade, apresenta, sob o ponto de vista econômico, uma vantagem considerável em relação aos processos clássicos de produção [38].

As técnicas para a introdução e expressão exógena de genes são fundamentais para o desenvolvimento de qualquer organismo para esse propósito. A bactéria *E. coli* e a levedura (eucarioto) *Saccharomyces cerevisiae* foram os primeiros exemplos de organismos usados para esse propósito [37, 39, 40].

O uso da bactéria *E. coli* se tornou estabelecido, porém, além da *S. cerevisiae* outras leveduras como as leveduras metilotróficas, em especial a levedura *Pichia pastoris* se

mostraram muito promissoras na produção heteróloga das proteínas [40]. A lipase tanto de bactérias, como a *Pseudomonas sp.* como de vários fungos é produzida utilizando esses sistemas. A sua produção em larga escala garante o seu uso nos diferentes setores industriais, pois, reduz consideravelmente o preço dessa enzima, tornando-se um fator diferencial no custo final do produto.

1.6.1 Bactérias como hospedeiras

A partir do descobrimento das ferramentas para a manipulação do DNA, por volta dos anos 60, a expressão de genes em *E. coli* se tornou conhecida como a técnica chave para o entendimento dos processos moleculares. O conhecimento de sua biologia, fisiologia e genética fez da *E. coli* um hospedeiro de sucesso para a produção de várias proteínas através da bioengenharia desse organismo [37].

Nos últimos anos, muitos vetores para *E. coli* têm sido construídos com diversas finalidades, entre essas, a clonagem de cDNAs, de fragmentos de DNA amplificados por PCR, transcrição *in vitro* e para a expressão e produção de proteínas heterólogas.

O Sistema pET de expressão (Novagen) é um dos mais poderosos desenvolvidos para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* [41]. Baseado no sistema dirigido pelo promotor T7 originalmente desenvolvido por Studier e colaboradores (1990), o sistema pET foi ampliado com a inclusão de vários novos tipos de vetores e novas linhagens de *E. coli* como hospedeiras e muitos outros produtos designados para detecção e purificação eficiente das proteínas de interesse [41, 42].

Ao contrário dos sistemas baseados em promotores de *E. coli* (como *lac*, *tac*) o sistema pET usa o promotor do bacteriófago T7 para a expressão direta dos genes de interesse. Já que a RNA polimerase de *E. coli* não reconhece o promotor T7, não há virtualmente nenhum transcrito formado na ausência da RNA polimerase T7 e o passo da clonagem se torna totalmente independente da expressão [41, 43].

Em alguns casos porém a produção de proteínas em *E. coli* não se dá adequadamente e as quantidades previstas de proteínas não são alcançadas, impedindo o seu estudo ou mesmo a sua utilização industrial. Esses motivos levaram ao uso das leveduras como organismos opcionais para a produção heteróloga de proteínas que não conseguiram ser produzidas em *E. coli*.

1.6.2 Leveduras como hospedeiras

A facilidade da sua manipulação genética e seu conhecido uso como organismo industrial levou ao estabelecimento da levedura *S. cerevisiae* como o melhor hospedeiro eucarioto para a expressão de gene recombinantes [39, 44].

Vários promotores fortes, muitos dos quais, originados da via metabólica da glicose, foram estudados e implementados para o uso em expressão [39]. Muitas proteínas recombinantes, geralmente expressas em organismos heterólogos, são produzidas em *Saccharomyces* [39, 44, 45], porém algumas limitações, também foram encontradas nesse sistema, o que levou aos estudos das leveduras metilotróficas.

Somente algumas espécies de leveduras são capazes de metabolizar metanol como fonte de carbono e energia, essas leveduras pertencem aos gêneros, *Cândida*, *Torulopsis*, *Hansenula* e *Pichia*. Dessas a mais conhecida e utilizada é a levedura *Pichia pastoris* [39, 46]. O fato de crescer até altas densidades celulares em um meio de cultura de baixo custo levou a empresa Phillips Petroleum Company a propor o uso dessa levedura como fonte de alimento ("single cell protein" - SCP) [47]. Após constatar que o processo de produção de SCP era inviável economicamente, a empresa decidiu transformar *P. pastoris* em um sistema de produção de proteínas recombinantes.

A principal característica que tornou a levedura *P. pastoris* uma atraente hospedeira para a produção de proteínas heterólogas foi a presença de um forte promotor usado para transcrever genes heterólogos, o qual é derivado do gene da álcool oxidase (AOX1) de *P. pastoris* [44, 47, 48]. Esse promotor é regulado transcricionalmente por metanol, um indutor relativamente barato. Em células expostas a metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição no promotor AOX1 é altamente eficiente e comparável aos promotores derivados dos genes altamente expressos da via glicolítica. No entanto, ao contrário dos promotores glicolíticos, o promotor AOX1 é fortemente reprimido sob condições de crescimento sem metanol [44-48].

A proteína produzida pela via metabólica do metanol é encaminhada para os peroxissomos, sendo que sob indução mais de 80% do volume celular é ocupado por peroxissomos [49]. Isso significa que a proteína heteróloga será produzida a taxas que vão de 30 a 60% da proteína total da célula [44, 45].

Vários genes de diferentes procedências (bactérias, fungos, invertebrados , plantas e humanos) já foram expressos em *P. pastoris* sob o controle do promotor AOX1[47]. Os vetores de expressão em *P. pastoris* são geralmente do tipo integrativo. Esses vetores possuem um cassete de expressão formado pelo promotor e pela região terminadora de transcrição do gene AOX1 além de uma marca de seleção, sendo a mais utilizada o gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) de *P. pastoris*. Essa marca permite a seleção de transformantes prototróficos his⁺ a partir de uma linhagem hospedeira *his4*. A maioria dos genes expressos tiveram seus produtos secretados para o meio extracelular utilizando peptídeo sinais, como o fator α de *Saccharomyces* ou o peptídeo sinal da fosfatase ácida (*PHO1*) de *Pichia*, expressos na frente do gene de interesse [47].

2 – OBJETIVOS

Este projeto teve por objetivo geral verificar a atividade lipolítica de um gene putativo de lipase de *Xylella fastidiosa* neste trabalho denominado *lipXF1* (ORF XF1181, NCBI number GI: 15837783), avaliando o seu potencial biotecnológico.

Os objetivos específicos foram:

- 1 - Clonagem do gene *lipXF1* de *X. fastidiosa* em vetores de expressão de *E. coli*.
- 2 - Expressão e purificação da lipase de *X. fastidiosa* em *E. coli* para a avaliação da sua atividade lipolítica.
- 3 - Clonagem em um cassete de expressão contendo o gene da lipase sob regulação do promotor: pAOX em *P. pastoris* e verificação de sua expressão.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Linhagens de bactérias e leveduras utilizadas

A *X. fastidiosa* selvagem da linhagem XF9a5c foi cedida pelo professor Marcos Machado do IAC – Cordeirópolis. A linhagem *E. coli* DH10b, foi utilizada para as diversas clonagens e multiplicação de plasmídeos. A linhagem *E. coli* BL21(DE3) foi utilizada para a expressão da lipase de *X. Fastidiosa*. A linhagem *P. pastoris* GS115, cedida gentilmente pela professora Lídia Moraes da Universidade de Brasília, foi utilizada na produção heteróloga de lípase em levedura.

3.2 – Meios de cultura

Meios de cultura para leveduras

YPD – meio completo [50]: 1% de extrato de levedura (yeast extract); 2% de peptona; e 2% de dextrose; 2% de ágar para meio sólido.

YNB – meio mínimo [50]: 1 ou 2% de glicose; 0,125% de mistura de aminoácidos (sem Histidina); 1,34% de YNB (Yeast Nitrogen Base – without amino acids); 2% de ágar para meio sólido.

YNB – meio mínimo modificando – troca-se a glicose por outras fontes de carbono ,

MM - meio mínimo metanol com 1% de metanol

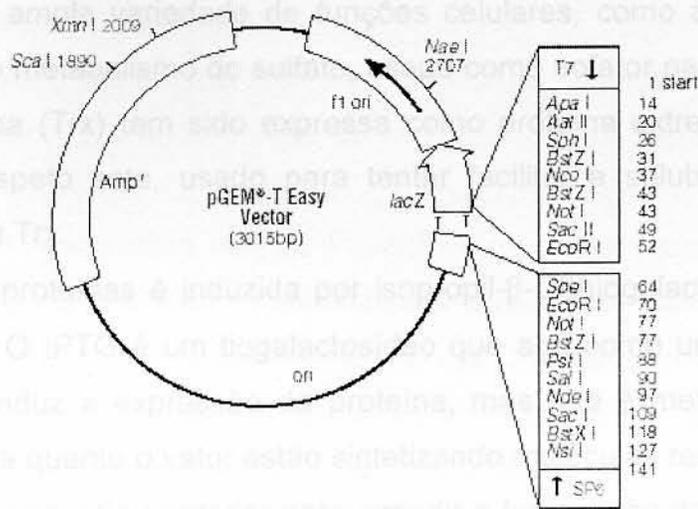
BMG – meio mínimo glicerol com 1% glicerol

Meios de cultura para bactérias

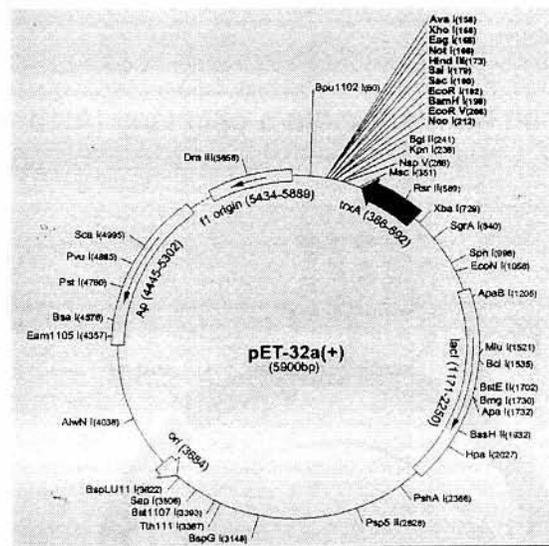
LB [51]: 1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de NaCl; utilizando para a seleção o antibiótico ampicilina (50 µg/ml), tanto para DH10b como para BL21 (DE3).

3.3 Plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados

1. pGEM-T Easy (Promega, EUA) – de 3 kb. Este plasmídeo contém marca de seleção Amp^R, permite manipulação em *E. coli* (mapa 1).

Mapa1

2. pET-32a(+) (Novagen, EUA) - clonagem e expressão da lipase de *X. fastidiosa* em *E. coli* (Mapa2).

Mapa2:

O vetor pET32a(+) é um dos vários que compõem o grupo dos vetores pET desenvolvidos pela Novagen. O Mapa 2 apresenta a representação gráfica do vetor pET32a(+) e seus sítios de corte com enzimas de restrição assim como as principais seqüências que ele carrega.

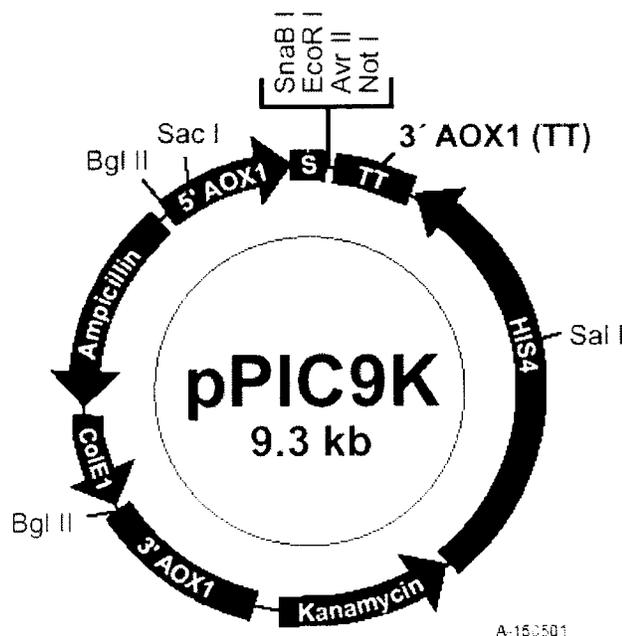
Este plasmídeo possui diferentes seqüências adjacentes ao sítio da clonagem que codificam para peptídeos (tags) que facilitam o posterior trabalho com a proteína, em especial a seqüência His-Tag que facilita a purificação da proteína por cromatografia de afinidade a

metais e a Trx-Tag constituída por 109 aminoácidos da tioredoxina de *E. coli*. Esta proteína está envolvida em uma ampla variedade de funções celulares, como a redução de pontes dissulfetos e intervém no metabolismo do sulfato, usado como cofator para a DNA polimerase do fago T7. A tioredoxina (Trx) tem sido expressa como proteína extremamente solúvel no citoplasma de *E.coli*, aspeto este, usado para tentar facilitar a solubilidade de proteínas heterólogas fusionadas a Trx.

A expressão das proteínas é induzida por isopropil- β -D-thiogalactopiranosideo (IPTG) ou pelo uso da lactose. O IPTG é um tiogalactosídeo que age como um indutor gratuito do promotor *lac*, ou seja, induz a expressão da proteína, mas não é metabolizado na célula. Tanto a célula hospedeira quanto o vetor estão sintetizando moléculas represoras, codificadas por *lac I*, que vão se ligar ao sítio operador para impedir a transcrição da T7 RNA polimerase (no fago λ DE3) e da proteína heteróloga (no vetor). Na presença de IPTG, a molécula repressora fica inativa e incapaz de se ligar ao operador, permitindo a transcrição dos genes sob o controle do promotor T7.

3. pPIC9K (Invitrogen, EUA) contendo o promotor AOX para clonagem e expressão em *P. pastoris* (Mapa3).

Mapa 3:



O vetor pPIC9k desenvolvido e patenteado pela empresa Invitrogen é um dos mais utilizados para clonagem em *P. pastoris* [47, 52].

O gene de interesse é clonado na região do cassete de expressão em um dos sítios de clonagem que se localizam logo após o sinal de secreção, nesse caso, o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae*. O cassete de expressão é liberado pela digestão do plasmídeo com a enzima de restrição *BglII* e uma cepa *his4* de *P. pastoris* é transformada por eletroporação o DNA linearizado pode gerar transformantes estáveis quando se integra no genoma por recombinação homóloga, sendo que o cassete de expressão pode se integrar várias vezes no locus *AOX1*, o que pode ser confirmado por análise de Southern blotting [47, 52, 53].

A amplificação do gene de lipase de *X. fastidiosa* lipXF1 foi realizada por reações de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos listados na Tabela VII, para clonagem em *E. coli* e em levedura.

Tabela VII: Seqüência dos oligonucleotídeos para a amplificação da lipase de *X. fastidiosa*, incluindo os sítios de restrição para a clonagem.

Nome*	Seqüência (5'-3')	Tamanho(pb)	Enzima de Restrição
XF-PréLipF	<u>GGA ATT CAT GAG AAT CAT TTC CTT AG</u>	26	<i>EcoRI</i>
XF-PréLipR	<u>CCG CTC GAG TCA AAG ACC CTG CAT TTT C</u>	28	<i>XhoI</i>
LipXF-Not1R	<u>TGC GGC CGC TCA AAG ACC CTG CAT TTT C</u>	28	<i>NotI</i>

* A seqüência XF-PréLipF foi utilizada tanto na clonagem em *E. coli* como em *P. pastoris*, sendo a seqüência XF-PréLipR exclusiva de *E. coli* e LipXF-Not1R exclusiva de *P.pastoris*.

3.4 – Obtenção do DNA genômico de *Xylella fastidiosa*

A extração foi efetuada utilizando-se uma cultura com crescimento saturado em meio de cultura líquido. 1,5 ml dessa cultura foi centrifugado a 10.000 rpm durante 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado celular foi ressuspenso em 567 μ L de TE através de repetidas pipetagens. Adicionou-se 30 μ L de SDS 10% (concentração final de 0,5%) e 3 μ L de proteinase K 20mg/ml (concentração final de 100 μ g/ml) e a mistura foi incubada a 37°C por 1 h. Adicionou-se 100 μ L de NaCl 5M e 80 μ L de CTAB 10% e misturou-se bem para incubar a 65°C durante 10 minutos. Adicionou-se 700 a 800 μ L de clorofórmio/álcool isoamilico (24:1 respectivamente), misturou-se invertendo o tubo 80 vezes e centrifugou-se a 10.000 rpm durante 5 minutos. Removeu-se a fase superior para outro eppendorf sem mexer com a

interface e Adicionou-se igual volume de fenol: clorofórmio:álcool isoamilico (25:24:1, respectivamente). Mistura-se vigorosamente e centrifuga-se a 10.000 rpm durante 5 minutos.

Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo e adicionou-se 0,6V de isopropanol ou 2V de etanol 100%, misturando-se por inversão do tubo e acondicionou-se a -20°C durante 2 horas ou a -80°C durante 20 minutos. Centrifugou-se a 12.000 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente.

Ao fim do processo descartou-se o sobrenadante e o precipitado contendo o DNA foi lavado com 600 μL de etanol 70%. Centrifuga-se a 12.000 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e nova lavagem é feita com 300 μL de etanol 100% e centrifugando-se a 12.000rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Secou-se o precipitado e ressuspendeu-se em 50 μL de TE contendo RNase.

3.5 – Clonagem do gene *lipXF1* em *E. coli*

As manipulações corriqueiras de DNA foram feitas seguindo Ausubel e colaboradores (2001). O isolamento e purificação dos fragmentos de DNA a partir de géis de agarose seguiram o protocolo Glass Max (Gibco BRL) ou foi utilizado o kit de extração concert (Concert rapid gel extration system – GibcoBRL – Life Technologies).

3.6 – Transformação

As transformações das linhagens de levedura e de bactérias foram realizadas por eletroporação segundo o protocolo que acompanha o equipamento Micro Pulser Eletroporation Apparatus (BioRad).

A eletroporação consiste em se aplicar um pulso elétrico de alta voltagem por frações de segundos ao meio contendo as bactérias ou leveduras mais o vetor que se quer introduzir nesses organismos. Esse pulso elétrico produz poros na membrana das células o que permite a entrada do DNA. [50, 54]. No caso de *E. coli* o pulso é de 1,8 KV e em *P. Pastoris* é de 2,0 KV ambos não apresentam uma constante de tempo em milisegundos da aplicação dos pulsos.

3.7 – Seqüenciamento

Para o seqüenciamento foi utilizado *kit* Bigdye terminator (Perkin Elmer). E o seqüenciador automático ABI Prism 377-36 (Applied Biosystems).

O seqüenciamento partiu de DNA plasmideal utilizando os oligonucleotídeos específicos para a amplificação. A análise das seqüências foram feitas por alinhamento com a seqüência original de *X. fastidiosa* e contra o banco de dados do NCBI utilizando os programas Blastx, Blastp e Blastn (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.8 – Comparação da seqüência de lipase de *X. fastidiosa*

Para a comparação da seqüência de DNA de *X. fastidiosa* contra outras lipases e análise dos sítios ativos foi utilizado o programa Clustal W (<http://www.es.embl.org/cgi-bin/clustal.cgi>) e as lipases dos microorganismos descritas no trabalho de Arpigny e colaboradores (1999). Também foram utilizados os programas ipSORT e pSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>), assim como o programa pFAM (<http://pfam.wustl.edu/index.html>) para a análise da existência de peptídeo sinal e dos domínios de atividade.

3.9 – Clonagem do gene *lipXF1* no vetor de expressão pET32a em *E. coli*

Após a extração e amplificação do gene *lipXF1*, de *X. fastidiosa*, este foi isolado em gel de agarose 0,8%, e o fragmento correspondente ao tamanho desejado foi purificado utilizando o kit Concert de extração de gel (GibcoBRL). Após a purificação o inserto foi clivado utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, seguindo as instruções do produtor para cada enzima. O vetor pET32a também foi clivado com as mesmas enzimas de restrição. O gene foi inserido no vetor pPIC9k através de reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase, segundo orientação do fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram transformados por eletroporação em células competentes *E. coli* DH10b. Os transformantes foram selecionados em meio de cultura LB sólido contendo ampicilina (150µg/ml).

Alguns clones foram selecionados e o vetor extraído para seqüenciamento e confirmação do inserto. Os clones positivos foram utilizados na transformação de linhagens de *E. coli* BL21.

3.10 – Clonagem do gene *lipXF1* no vetor de expressão Ppic9k em *P. pastoris*

Após a extração e amplificação do gene *lipXF1*, de *X. fastidiosa*, este foi isolado em gel de agarose 0,8%, e o fragmento correspondente ao tamanho desejado foi purificado utilizando o kit Concert de extração de gel (GibcoBRL). Após a purificação o DNA foi inserido no plasmídeo pGEM-T (Promega, USA) utilizando o Kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega, USA). A ligação obtida foi então transformada em células competentes *E. coli* DH10b, pelo método de eletroporação. As bactérias que continham os plasmídeos recombinantes foram selecionadas em meio LB contendo Ampicilina (150µg/ml), X-Gal (0,025µg/µl) e IPTG (0,2µg/µl), segundo Sambrook e colaboradores (1989).

Os vetores pGEM-T-lipXF1 positivos foram extraídos e seqüenciados. Apenas um clone foi, então, selecionado e utilizado para a construção com pPIC9k.

O vetor pGEM-T-lipXF1 selecionado foi então, clivado com as enzimas de restrição EcoRI e NotI (segundo a instrução do fabricante de cada enzima). Os insertos foram recuperados através de eletroforese e nova purificação utilizando o Kit Concert (GibcoBRL). O vetor pPIC9k foi clivado pelas mesmas enzimas de restrição. O gene foi inserido no vetor pPIC9k através de reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase, segundo orientação do fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células competentes *E. coli* DH10b. Os transformantes foram selecionados em meio de cultura LB sólido contendo Ampicilina (150µg/ml).

Alguns clones positivos tiveram seu DNA plasmídeo extraído e seqüenciado. Foram escolhidos 2 clones para a transformação das leveduras GS115.

3.11 – Indução da Expressão em *E. coli*

Para a expressão do gene que codifica a lipase de *X. fastidiosa* em *E. coli* foi utilizado o sistema pET de expressão de proteínas heterólogas com proteína de fusão, seguindo-se as instruções de indução e manipulação do fabricante do sistema (Novagen, USA). Para a indução da expressão do gene da lipase de *X. fastidiosa* em *P. pastoris* seguiu-se as indicações contidas no manual do vetor pPIC9k (Invitrogen, USA).

Para a indução em *E. coli* um pré-inóculo, contendo ampicilina (150µg/ml), é preparado previamente e deixado crescer “overnight” a 37°C a 300rpm. No dia seguinte uma nova cultura é iniciada com O.D.₆₀₀ de 0,1. Essa cultura é deixada crescer (37°C e 300rpm) até atingir O.D.₆₀₀ de 0,6 quando é adicionado IPTG 1mM ou 1% de lactose o que induz o promotor T7

do vetor pET32a a produzir o gene e a expressar a proteína de interesse. Essa cultura é deixada nessas condições por 4 horas quando então é centrifugada e o precipitado pode ser sonificado para a obtenção da proteína de interesse.

Na levedura a indução é feita pelo metanol no meio de cultura. Um pré-inóculo é feito utilizando-se meio YNB e deixado crescer "overnight" a 30°C a 300 rpm. No dia seguinte uma cultura nova é iniciada em meio BMG (glicerol) com O.D.₆₀₀ iniciando em 0,1 a 30°C e 300 rpm. Essa cultura é deixada crescer até O.D.₆₀₀ de 0,6 quando é centrifugada (6000 rpm por 10 minutos) em tubos estéreis e lavada com água e uma nova centrifugação (6000 rpm por 10 minutos) é feita para se peletar as células que, então, são ressuspensas em meio MM (metanol) que induz o promotor AOX e a produção do gene de interesse.

3.12 – Teste de Atividade da lipase

Os testes de atividade foram realizados quantificando-se a hidrólise do azeite de oliva comercial (Galo) pela enzima lipase produzida heterologicamente, utilizando como controle positivo a lipase purificada de *Pseudomonas fluorescens* (Aldrich) e como controles negativos os extratos dos controles que não expressam a enzima clonada e o tampão onde a enzima foi ressuspensa, assim como os próprios extratos protéicos induzidos e paralizados antes do tempo de reação.

Em erlenmeyers de 125ml foram adicionados 9ml de tampão fosfato de potássio 0,1M pH7,0, 1ml de óleo de oliva comercial (galo) e 10 pérolas de vidro. A esse sistema foi acrescentado 1ml de tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,5 contendo a enzima lipase purificada ou o precipitado obtido com a sonicação e centrifugação (14000 rpm, 30 minutos) de 50ml de meio de cultura induzido como descrito na seção 3.2.8. O sistema é incubado a 37°C por 30 minutos, com agitação que pode variar de 150 a 200 rpm.

Após a incubação a reação foi paralizada pela adição de 15 ml de solução acetona:etanol 1:1 vol/vol e os ácidos graxos liberados acidificam o meio. Essas moléculas de ácido são tituladas contra solução de NaOH 0.01N utilizando-se fenolftaleína 1% em etanol como indicador. A mudança de cor da fenolftaleína ocorre em pH 7,0, quando a neutralidade é atingida. Portanto, a quantidade de moléculas de NaOH adicionada é proporcional a quantidade de moléculas de ácido graxos liberados. O cálculo da atividade foi feito seguindo-se a fórmula: $\mu\text{Mol}/\text{min} = M * \Delta * 1000 / T * P$

M= molaridade do NaOH (neste teste é de 0,05)

Δ = diferença de valor na titulação entre o controle e o teste

T = tempo de reação em minutos

P = peso da enzima (em mg) ou volume (em ml) utilizado.

3.13 – Determinação do pH e temperatura de atuação da lipase de *X. fastidiosa*

Foram preparadas soluções tampões nos seguintes valores: Tampão fosfato de potássio 0,1M pH7.0, 8.0 e tampão tris-HCl 0,1M pH 9.0.

Em Erlenmeyers de 125ml foram preparados sistemas de reação contendo 5 ml de emulsão goma arábica 7% (preparada em água) e óleo de oliva na proporção de 75%:25% respectivamente, 5 ml da cada solução tampão descritas acima, 1ml de $MgCl_2$ 110mM e 1ml do extrato de proteína bruto.

Esse extrato foi obtido pelo crescimento de 1 litro de meio de cultura induzido (contendo a bactéria recombinante, BL21pet-lipXF1-5 ou a bactéria sem o vetor chamada apenas de BL21) segundo as indicações no item 3.11, esse meio é centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, lavado e recentrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. O precipitado obtido é pesado e ressuspenso em tampão fosfato de potássio 0,1M pH7,0 para a sonicação. Centrifuga-se o sonicado a 14000 rpm por 30 minutos e pesa-se o precipitado que é então ressuspenso em 40 ml de tampão fosfato de potássio 0,1M pH7.0. As reações foram feitas em triplicata nas temperaturas de 30°C, 50°C e 65°C, por 30 minutos a 160 rpm.

A reação foi paralisada com a adição de 10 ml de acetona:etanol (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,01N utilizando-se azul de timol 0,1% etanol:água (4:1) como indicador.

3.14 – Solubilização da proteína

As células foram rompidas mediante sonicação em tampão fosfato de sódio pH 7.5, 0.1M. Primeiramente se determina o peso úmido e se adiciona tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,5, em uma proporção de 5ml de tampão para 1,5 gramas de peso úmido. As células foram sonicadas em banho de gelo por tempos de 20 segundos com intervalos e 20 segundos entre os tempos de sonicação. Após este procedimento, se centrifuga a 14000 rpm, a 4 °C durante 30 minutos. O precipitado de ruptura foi ressuspenso nas mesmas condições usadas

previamente para a sonicação. Quantidades equivalentes de sobrenadante e precipitado de ruptura foram aplicadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) para determinar fracionamento da proteína de interesse.

3.15 – Purificação da proteína

Uma vez que as proteínas estavam solubilizadas, se procede a purificação. As colunas usadas foram HiTrap™ de 1ml (Pharmacia Biotech). A capacidade destas colunas é de 12mg de proteína de fusão.

A coluna foi lavada com 10 ml de água. Se a coluna já foi usada, passar 10ml da solução de limpeza [NaCl 0,5M; EDTA 0,05M, pH 7,4], lava-se novamente a coluna com 10 ml de água e carrega-se a coluna com 0,5 ml de uma solução de NiSO₄ 1M elimina-se o excesso de níquel passando 5 ml de água, através da coluna e equilibra-se a coluna com o tampão de solubilização (Tampão fosfato pH7.5/0.1M Uréia 6M imidazole 30mM), por fim passa-se a proteína de interesse (sobrenadante da ruptura, centrifugado duas vezes a 14000 rpm por 30 minutos). Após isso lava-se a coluna com 10 ml de tampão de solubilização e elui-se a proteína com Tampão de eluição [Tris-HCl 0,01M; NaCl 0,1M; Imidazol 0,2M]. Coleta-se a proteína em alíquotas de 1 ml em eppendorfs. O procedimento todo é desenvolvido no gelo (4°C), usando-se uma bomba peristáltica (Pump P1, Pharmacia Biotech) para garantir um fluxo constante (1ml/min) à coluna.

A quantidade de proteína foi determinada por ensaio de Bradford. O método Bradford utiliza o Coomassie que se liga a proteínas em pHs ácidos e trifenilmetano que se liga a estruturas não polares da proteína, grupos sulfonados interagem com cadeias eamínicas e isso pode ser detectado usando-se o espectrofotômetro. A curva padrão de proteína foi obtida com BSA (10mg/ml) diluída em diversas concentrações (1,0 à 12 µg/ml) e a concentração foi determinada em espectrofotômetro na O.D.₅₉₅.

Para a diálise utilizou-se membranas de celulose regenerada, tubos permeáveis à água que permitem a passagem de compostos de baixo peso molecular (menor do que 12 KDa) em soluções aquosas, permitindo a troca de tampões com concentrações mais baixas de sais.

As membranas de diálise foram submersas em água e em seguida em 50% de Etanol para remover o glicerol usado como umectante. Depois foram incubadas em EDTA 10 mM, 0,05M NaHCO₃ e várias lavagens foram feitas com água destilada.

Para a diálise das amostras, utilizou-se 1000X o volume da amostra. Incubou-se a 4°C, em agitação constante durante o período de 2 horas a 12 horas.

3.16 – Extração de RNA total de levedura para Northern blotting

Toda vidraria a ser utilizada foi queimada (mantida numa estufa a 180 °C por 8 horas pelo menos) ou tratada com água oxigenada 13 volumes por 15 minutos, para que ficassem livres de RNase.

As células mantidas a -70° C, foram descongeladas em gelo, e ressuspendidas em 400 µL de solução TES (2 ml de Tris HCl 10 mM, 4 ml de EDTA 10 mM, 10 ml de SDS 0,5% para um volume final de 200 ml, pH 7,5) e homogeneizadas com agitador magnético. Foi adicionado 400 µL de fenol ácido e vortexou-se vigorosamente por 10 segundos. Os tubos foram incubados por 1h a 65°C e ocasionalmente agitados manualmente. Após incubação, os tubos foram mantidos em gelo por 5 minutos e centrifugados em seguida a 14.000 rpm, por 5 minutos a 4°C. A fase aquosa (topo) foi transferida para novo tubo eppendorf, e 400 µL de fenol ácido foi adicionado.

O tubo foi homogeneizado com agitador magnético, novamente centrifugado, e a fase aquosa transferida para novo eppendorf. Foi adicionado 40 µL de acetato de sódio 3 M, pH5,3 e 1 ml de etanol absoluto gelado, homogeneizado com agitador magnético e centrifugado a 14.000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o RNA lavado com 1 ml de etanol 70% gelado, e novamente centrifugado, nas mesmas condições. O etanol foi descartado, e o RNA secado em centrífuga a vácuo. O RNA foi então ressuspendido com 20 µL de água tratada com 0,1 % de DEPC e autoclavada. Posteriormente, o RNA foi quantificado em gel de agarose/formaldeído/MOPS.

Após a eletroforese, o gel foi fotografado em UV, e então transferido para uma membrana de nitrocelulose, por capilaridade, utilizando-se SSC 20X. Após a transferência a membrana foi incubada a 80°C por 2h e/ou colocada por 2 minutos sob U.V. baixa para a fixação do RNA à membrana.

3.17 – Reação de PCR para detecção dos genes nas colônias de leveduras

Para confirmação da presença dos genes nos plasmídeos recombinantes, uma amostra das colônias de leveduras transformantes foi transferida, com o auxílio de uma ponteira estéril

de pipeta automática, para tubos eppendorfs contendo 40 μL de água Milli Q. A reação se procedeu com a adição de 5 μL da mistura de suspensão celular, 2,5 μL de tampão da enzima 10x, 1 μL da mistura dos 4 dNTPs 10mM, 1 μL do oligo-sense 10mM, 1 μL do oligo-antisense 10mM, e 0,5 μL da enzima Taq DNA Polymerase, para um volume final de 25 μL . O programa da reação de PCR foi 97°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos (95°C por 60 segundos; 60°C por 50 segundos e 72°C por 80 segundos), 72°C por 7 minutos, terminando com 4°C. O produto da reação foi separado em gel de agarose, 0,8%, em tampão TAE 1x.

3.18 Preparação de placas contendo rodamina

As placas para seleção de transformantes de leveduras que expressam a lipase de *X. fastidiosa* foram preparadas com meio MM adicionando-se 2% de óleo de oliva comercial (galo), 0,2% de Fosfato de potássio, 0,1% de sulfato de magnésio, 1% Acetato de sódio e 0,001% de rodamina B (esterilizada por filtração), o meio foi autoclavado e feita uma emulsão com o óleo e todos os outros componentes e vertido em placas de petri.

3.19 – Hibridização com sonda de DNA (Northern Blotting)

A membrana contendo o RNA fixado, descrito no item 3.2.14, foi utilizada para a verificação da existência de mRNA para o gene da lipase de *X. fastidiosa* em *P. pastoris*.

As membranas foram pré-hibridizadas em solução de pré-hibridização (50% formamida, 25% SSPE 20X, 5x Denhardt's, 1% SDS, e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA de esperma de salmão desnaturado), por 4 horas a 42°C (se for a primeira pré-hibridação) e 2 horas nas outras vezes, com agitação leve, de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Foram utilizados cilindros de hibridação, calculando um volume de 12,5 ml por membrana pequena e 25 ml para membranas grandes.

Para a síntese da sonda foi utilizada a seqüência amplificada a partir do DNA genômico de *X. fastidiosa* utilizando-se os oligonucleotídeos descritos no item 3.1.2.1. Esses fragmentos foram purificados com o kit Concert Rapid Gel Extraction System (GibcoBRL – Life Technologies) e marcados com dATP $\alpha^{32}\text{P}$. O DNA foi adicionado a um volume final de 15 μL de água tratada com 0,1 % de DEPC e autoclavada, e então desnaturado a 95°C por 10 min. Foi acrescentado 1 μL de dATP $\alpha^{32}\text{P}$, 1 μL de Klenow, 2 μL de oligonucleotídeo PdN6 (11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 2,5 μL tampão da Klenow (React2) e 3 μL de dNTPs não marcados.

A hibridação foi realizada adicionando-se a solução de pré-hibridação a solução contendo o DNA marcado, deixando-se “overnight” a membrana nessa solução a temperatura de 42°C.

Após hibridação, as sondas foram descartadas e as membranas lavadas em condições de alta estringência, de acordo com protocolo de Desprez e colaboradores (1998) [50]. Foi utilizado aproximadamente 200ml de solução pré-aquecida. Foram feitas duas lavagens com 2x SSPE, 0,1% SDS; uma lavagem com 1x SSPE, 0,1% SDS e duas lavagens com 0,1x SSPE, 0,1% SDS; as duas últimas por 15 minutos a 65°C.

3.20 – Hibridização com sonda de DNA (Southern Blotting)

A preparação das amostras foi feita com a digestão com *EcoRI* do DNA genômico extraído de diversas colônias de leveduras contendo o vetor Ppic9kprelip.

18µg de DNA genômico foram digeridos por 2 horas a 37°C com 15U da enzima *EcoRI*. A reação foi paralisada pela adição de “loading buffer” também utilizado como indicador durante a corrida do gel.

Após a corrida o gel de agarose (0,8%) foi lavado em água destilada e transferido para cuba de vidro contendo 10V de HCl 0,25M e colocado sob agitação por aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente para a depuração parcial dos fragmentos de DNA. Após esse tratamento o gel foi lavado com água destilada e adicionou-se 10V de solução de desnaturação (NaCl 1,5M:NaOH 0,5M) por 20 minutos sob agitação, esse processo foi repetido com nova solução por mais 20 minutos.

Descartou-se a solução de desnaturação e lavou-se com água destilada. Adicionou-se 10V de solução neutralizante por 20 minutos agitando suavemente. Trocou-se essa solução uma vez e incubou-se novamente por mais 20 minutos.

Montou-se a torre de transferência usando-se SSC 20X. A transferência para a membrana de nitrocelulose se dá por capilariedade e pode ser deixada “overnight” para uma transferência eficiente dos fragmentos.

Após a transferência o DNA foi fixado à membrana colocando-se a membrana por 2 horas a 80°C e/ou 2 minutos em U.V. A pré-hibridação se dá a 65°C por 4 horas, utilizando uma solução contendo 6,25 ml de SSPE 20X, 1,25 ml de Denhart's, 16, 25ml de água milliQ autoclavada, 1,25ml de SDS 10% e 200µL de DNA de salmão (10mg/ml). Hibrida-se a

membrana “overnight” com sonda preparada como descrita no item 3.2.17.2. As lavagens são idênticas as utilizadas no Northern blotting, com exceção da temperatura que deve ser sempre de 65°C.

3.21 – Hibridização com anticorpo Anti-His para a detecção da proteína recombinante (Western Blotting)

Para a detecção da proteína recombinante um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi corrido com as amostras de proteína obtidas a partir de extrato sonificado e ressuspenso em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,5.

As amostras foram aplicadas ao gel na proporção 1:1 de amostra:Cracking buffer (60mM de tris-HCl 0,5M, pH6,8; 2-βMercapto etano 1%; SDS 1%; glicerol 10%; bromofenol blue 0,01%) num total de 20 a 30 µL por pocinho e corridos a 100V em tampão de corrida (24,8mM tris base, 192mM glicina, 0,1%(w/v) SDS)

Incubou-se o gel por 15 minutos em tampão de transferência gelado(10% de metanol, 0,192M de glicina e 8mM de Tris-HCl 0,1M, pH8.0) e montou-se o “sandwich” composto por uma espuma de suporte, papel filtro, o gel com as proteínas, a membrana de nitrocelulose, nova camada de papel filtro e a espuma de suporte todos devidamente umedecidos e sem bolhas para uma melhor transferência. O equipamento foi montado e cobriu-se com tampão de transferência gelado. A transferência ocorreu por 1 hora a 100volts (400mA)

Retirou-se a membrana que foi lavada com TBS 1X para retirar restos do gel. A membrana foi colocada em contato com leite 5% (leite desnatado em TBS 1X) por 1 hora a 37°C sob fraca agitação.

A membrana foi, então, hibridada com o anticorpo anti-his que se liga a cauda de histidina encontrada na proteína de fusão expressa. Essa reação se dá a 37°C por 1 hora ou “overnight” a 4°C colocando-se em contato o conjugado anti-his peroxidase diluído em 10 ml de leite 5%. A membrana foi lavada com TBS 1X duas vezes e com TBS 1X Tween 20 0,05%.

A revelação foi feita adicionando-se AEC contendo H₂O₂ na membrana e agitando-se até o aparecimento das bandas na membrana, que foi lavada em água, scaneada ou armazenada em papel celofane.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Análise da seqüência de Lipase de *X. fastidiosa*

A partir dos dados obtidos com o projeto genoma da bactéria *X. fastidiosa*, identificou-se uma ORF (XF1181) apontada como possível gene codificador de uma proteína precursora de uma lipase triacilglicerol (Fig. 3)

DNA:	ATG	AGA	ATC	ATT	TCC	TTA	GAA	TTT	TCT	GAT	CTA	AAT	TTT	TCG	GGG	TGT	GTT
	M	R	I	I	S	L	E	F	S	D	L	N	F	S	G	C	V
DNA:	GAA	TTG	ATT	AAT	TTT	ATT	TCT	TAT	AAA	TTA	ATG	AAG	AAA	ATG	CTT	GCG	TGC
	E	L	I	N	F	I	S	Y	K	L	M	K	K	M	L	A	C
DNA:	GTG	ATG	AGC	ACA	GTT	TTT	TTC	GTT	AAT	ATG	ATT	GCT	TTA	GTA	ATG	CTG	ACG
	V	M	S	T	V	F	F	V	N	M	I	A	L	V	M	L	T
DNA:	GGT	ATG	GGG	GTT	GCG	TCG	GCT	GCA	TCC	AAA	GAC	AGT	TAT	GCG	GCG	ACA	AAA
	G	M	G	V	A	S	A	A	S	K	D	S	Y	A	A	T	K
DNA:	TAT	CCG	ATC	ATT	TTC	GAG	CCT	GGT	TTT	GGG	GGA	GTC	GAT	AGG	CTA	TTT	GTT
	Y	P	I	I	F	E	P	G	F	G	G	V	D	R	L	F	V
DNA:	TTG	ATT	GAT	TAT	TTT	TAC	CGC	ATT	CCC	GAG	GAT	TTG	CGG	GCA	CAT	GGT	GCA
	L	I	D	Y	F	Y	R	I	P	E	D	L	R	A	H	G	A
DNA:	AAT	GTC	TAT	CTA	TCC	ACT	TCG	TCT	GCT	TTT	CAG	AGA	CCA	GAT	GGC	CCA	AAT
	N	V	Y	L	S	T	S	S	A	F	Q	R	P	D	G	P	N
DNA:	GGT	CGT	GGT	GAG	CAA	TTA	CTC	GCA	TAC	GTT	AAG	GCA	GTC	CTT	GCT	ATT	ACC
	G	R	G	E	Q	L	L	A	Y	V	K	A	V	L	A	I	T
DNA:	GGG	GCG	GAG	AAG	GTT	AAT	TTG	ATT	GGC	TAT	AGT	CAG	GGT	GGA	TTG	ACT	GTC
	G	A	E	K	V	N	L	I	G	Y	S	Q	G	G	L	T	V
DNA:	CGT	TAC	GTA	GCG	GCT	GTT	GCA	CCC	AGT	CTC	GTT	GCT	TCA	GTG	ACG	ACT	ATG
	R	Y	V	A	V	A	V	A	P	S	L	V	A	S	V	T	M
DNA:	GGT	ACG	CCT	CAT	CAT	GGT	TCG	GAA	TTG	GCA	GAT	TAC	CTT	GAT	GAG	ACC	TTT
	G	T	P	H	H	G	S	E	L	A	D	Y	L	D	E	T	F
DNA:	AAT	CAA	GGT	CTA	ACT	GGG	CTG	CTG	TCA	CCG	GTG	TGG	GCC	GGG	CTT	AAT	AAT
	N	Q	G	L	T	Q	L	L	S	P	V	W	A	G	L	N	N
DNA:	GCG	TTT	GCC	TCC	ATG	ACA	ACT	GGC	AAT	CCG	AAC	CAG	GAT	ATG	CTT	GCT	GCA
	A	F	A	S	M	T	T	G	N	P	N	Q	D	M	L	A	A
DNA:	TTT	AAG	AGT	CTA	ATG	ACT	TCG	CAA	GTG	GCG	CTC	TTC	AAT	AAG	AAT	TAT	CCA
	F	K	S	L	M	T	S	Q	V	A	L	F	N	K	N	Y	P
DNA:	AGT	GCT	GGC	CTC	GGT	AAA	CGT	GGT	TCA	TGC	CAG	AGT	GGG	GCA	GAA	TTT	GAA
	S	A	G	L	G	K	R	G	S	C	Q	S	G	A	E	F	E
DNA:	ACT	GTC	GGG	GGA	GAG	CGT	CAA	TAC	CTA	TAC	TCA	TGG	GGC	GGT	GCA	GCG	ATA
	T	V	G	G	E	R	Q	Y	L	Y	S	W	G	G	A	A	I
DNA:	AAG	GAA	AAA	AAA	TCA	CTC	TTT	GGT	ACC	AAA	GTT	ATT	GAT	ACA	AGC	GTG	TTT
	K	E	K	K	S	L	F	G	T	K	V	I	D	T	S	V	F
DNA:	CCT	TTT	ATT	GAT	GCC	GCA	AAT	TTT	ATC	GAT	CCG	ACT	ACA	AAA	ATT	TTG	TAT
	P	F	I	D	A	A	N	F	I	D	P	T	T	K	I	L	Y
DNA:	CAC	TTA	GGT	AGT	GTG	ATG	ATC	AAT	CAC	GAC	TCT	GGT	ACC	AAT	GAT	GGC	ATG
	H	L	G	S	V	M	I	N	H	D	S	G	T	N	D	G	M
DNA:	GTC	TCT	ACG	TGT	AGC	TCC	ATG	TTC	GGT	AAG	GTA	ATA	AGC	AGT	AAC	TTT	AAT
	V	S	T	C	S	S	M	F	G	K	V	I	S	S	N	F	N
DNA:	TGG	AAC	CAT	TTT	GAT	GAA	ATA	AAT	CAA	GTT	CTT	GCT	ATC	CGC	GGT	GCG	TAT
	W	N	H	F	D	E	I	N	Q	V	L	A	I	R	G	A	Y
DNA:	GCG	GAG	GAT	CCT	TTA	GCA	GTA	ATA	CGC	ACT	CAT	GTG	AAT	CGT	CTG	AAA	ATG
	A	E	D	P	L	A	V	I	R	T	H	V	N	R	L	K	M
DNA:	CAG	GGT	CTT	TGA													
	Q	G	L	*													

Figura 3: Seqüência de nucleotídeos do gene putativo (ORF XF1181) de lipase traduzido para aminoácidos.

A seqüência foi analisada utilizando o programa Blastp [55] e os dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). A maior similaridade encontrada foi com as lipases do gênero *Pseudomonas*. O melhor resultado do Blastp (E-value = $7e^{-99}$) está apresentado na figura 4. O

resultado obtido da comparação realizada com o programa Blast revelou que essa seqüência mantinha alta similaridade com o domínio de acetiltransferase e hidrolase de domínio alfa/beta hidrolase (presente em todas as lipases) (E-value=9e-46), com o domínio α/β -hidrolase (com alfa/beta hidrolase e E-value=1e-06) e com o domínio próprio de lipases da classe 2 (E-value=0.003). Essa análise demonstra que os domínios estão sendo conservados nessa proteína hipotética.

```

X.fas: 32  LACVMSTVFFVNMIALVML--TGMGVASAASKDSYAATKYPIIFEPGFGGVDRFLFVLIDY 89
      +AC MS  F    A++ L T  +A+ A D YAAT+YPII  G G D+  +++Y
Sbjct: 14  VACAMSIAPFAGTTAVMTLATTHAAMAATAPADGYAATRYPIIILVHGLSGTDKYAGVVEY 73

X.fas: 90  FYRIPEDLRAHGANVYLSTSSAFQRPDGPNGRGEQLLAYVKAVLAITGAEKVNLIGYSQG 149
      +Y I EDL+ +GA VY++  S FQ  DG NGRGEQLLAYVK VLA TGA KVNL+G+SQG
Sbjct: 74  WYGIQEDLQQNGATVYVANLSGFQSDDGANGRGEQLLAYVKTVLAATGATKVNLVGHSQG 133

X.fas: 150 GLTVRYXXXXXXXXXXXXTTMGTPHHGSELADYLDDET FNQGLTGLLSPVWAGLNNAFASM 209
      GLT RY          TT+GTPH GSE AD++          TGL S V A  N F  +
Sbjct: 134 GLTSRYVA AVAPDLVASVTTIGTPHRGSEFADFVQNVLAYDPTGLSSSVIAAFVNVFGIL 193

X.fas: 210 TTG--NPNQDMLA AFKSLM TSQVALFNKNYPSAGLGKRGSCQSGAEFETVGGERYLYSW 267
      T+  N NQD LAA ++L T++ A +N+NYPSAGLG  GSCQ+GA  ETVGG  LYSW
Sbjct: 194 TSSSHNTNQDALAALQTLTTARAATYNQNYPSAGLGAPGSCQTGAPTETVGGNTHLLYSW 253

X.fas: 268 GGAAIKEKKS LFG-TKVIDTSVFPFIDAANFIDPTTKILYHLG SVMINHDSGTNDGMVST 326
      G AI+  S+FG T  DTS P +D AN +DP+T  L+  G+V MIN  SG NDG+VS
Sbjct: 254 AGTAIQPTLSVFGITGATDTSTVPLVDLANVLDPSTLALFGTGTVMINRSGSQNDGLVSK 313

X.fas: 327 CSSMFGKVISSNFNWNHFDEINQVLAIRGAYAEDPLAVIRTHVNRLKMQGL 377
      CS+++GKV+S+++  WNH DEINQ+L +RGAYAEDP+AVIRTH NRLK+ G+
Sbjct: 314 CSALYGKVLSTSYKWNHLDEINQLLGVRGAYAEDPVAVIRTHANRLKLAGV 364
    
```

Figura 4 – Alinhamento da seqüência do gene da lipase de *X. fastidiosa* com o gene da lipase (GenBank number - gi:126329) de *Pseudomonas sp* (E-value= 7e⁻⁹⁹ e Score = 362 bits)

As lipases verdadeiras têm sido divididas em 8 famílias de acordo com as características de atividade e de similaridade das seqüências como descrito no trabalho de Arpigny e colaboradores (1999) (Tabela IV, item 1.2 da introdução). Comparações foram feitas visando enquadrar a proteína *lipXF1* (orf Xf1181) dentro dessas famílias. Concluindo-se que a mesma se enquadra dentro da família I. Nas figuras 5 e 6 observa-se os resultados de alinhamento com representantes das subfamílias 1 e 2 da família 1.



Figura 5: Alinhamento da lipase de *X. fastidiosa* (lipxylella) com as lipases das espécies *Pseudomonas aeruginosa* (lipaeru), *Pseudomonas fluorescens* (lipflu), *Proteus vulgaris* (lipproteu) e *Pseudomonas fragi* (lipfrag) pertencentes à **subfamília 1**. (**Em vermelho**: resíduos de aminoácidos que pertencem a tríade do sítio catalítico da lipase; **em verde**: resíduos de ácido aspártico envolvidos no sítio de ligação ao Ca⁺⁺; **em roxo**: resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto; **em azul**: regiões conservadas e relacionadas aos sítios catalíticos).

lipcep	-----MARTMRSRVVAGAVACAMS IAPFAGTTAVMTLATHAAMAAT
lipluteo	-----MRSRVVAGAVACAMSVAPFAGSAAALMMAATHVAMAAT
lipburk	-----MVRSMRSRVAARAVALAVMPLAGAAAGLTMAAS-----PAA
lipchro	-----
lipxyll	MRIISLEFSDLNFSGCVELINFISYKLMKKMLACVMSTVFFVNMIALVMLTG--MGVASA
lipcep	APAAGYAATRYPIILVHGLSGTDKYAGVLEYWYGIQEDLQQNGATVYVANLSGFSQSDGDP
lipluteo	APADNYATRYPIILVHGLTGTDKYAGVLEYWYGIQEDLQQHGATVYVANLSGFSQSDGDP
lipburk	VAADTYAATRYPVILVHGLAGTDKDFANVVDYWYGIQSDLQSHGAKVYVANLSGFSQSDGDP
lipchro	--ADTYAATRYPVILVHGLAGTDKDFANVVDYWYGIQSDLQSHGAKVYVANLSGFSQSDGDP
lipxyll	ASKDSYAATKYPPIIFEPGGVDRLEFLIDYFYRIPEDLRAHGANYVLSSTSAFQRPDGP *:*:*:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:*
lipcep	NGRGEQLLAYVKTVLAATGATKVNLVGHSQGGLSRRYVAAPDLVASVTTIGPADRGSE
lipluteo	KGRDEQLLAYVKTVLAATGATKVNLVGHSQGGLSRRYVAVAPDLVASVTTIGAADRGSE
lipburk	NGRGEQLLAYVKQVLAATGATKVNLVGHSQGGLSRRYVAAPQLVASVTTIGTPHRGSE
lipchro	NGRGEQLLAYVKQVLAATGATKVNLVGHSQGGLSRRYVAAPQLVASVTTIGTPHRGSE
lipxyll	NGRGEQLLAYKAVLAITGAEKVNLVGHSQGGLSRRYVAAPSLVASVTTMGTPHHGSE :*:*:*:*:*:* *:*:* *:*:* *:*
lipcep	FADFVQDVLAYDPTGLSSSVIAAFVNVFGILTSSSHNTNQDALAALQLTTARAATYNQN
lipluteo	FADFVQGVLAYDPTGLSSSVIAAFVNVFGILTSSSNANQDALAGLKLTTAQAATYNQN
lipburk	FADFVQDVLKTDPTGLSSSVIAAFVNVFGTLVSSSHNTDQDALAALRLTTAQTATYNRN
lipchro	FADFVQDVLKTDPTGLSSSVIAAFVNVFGTLVSSSHNTDQDALAALRLTTAQTATYNRN
lipxyll	LADYLDFTFNQGLTGLLSPVWAGLNNAFASMTG--NPNQDMLAAFKSLMSTQVALFNKN :*:*:*:*:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:*
lipcep	YPSAGLGAPGSCQTGAPTETVGGNTHLLYSWAGTAIQPTLSVFGVTGATDTSPLPLVDP
lipluteo	YPSAGLGRPGSCQTGRPTETVGGNTHLLYSWAGTAIQPTLSVFGVTGATDTSPLIDPA
lipburk	FPSAGLGAPGSCQTGAATETVGGSQHLLYSWGGTAIQPTSTVLGVTGATDTSFG-TLDVA
lipchro	FPSAGLGAPGSCQTGAATETVGGSQHLLYSWGGTAIQPTSTVLGVTGATDTSFG-TLDVA
lipxyll	YPSAGLGKRGSCQSGAEFETVGGERQYLYSWGGAAIKEKKS LFG-TKVIDTSVFPFIDAA :*:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*
lipcep	NVLDLSTLALFGTGTVMINRSGQNDGLVSKCSALYKVLSTSYKWNHLDEINQLLGVRG
lipluteo	NVLDLSTLALFGTGTVMINRSGQNDGLVSKCSALYKVLSTSYKWNHLDEINQLLGVRG
lipburk	NVTDLSTLALLATGAVMINRSGQNDGLVSRCSLFGQVISTSYHWNHLDEINQLLGVRG
lipchro	NVTDLSTLALLATGAVMINRSGQNDGLVSRCSLFGQVISTSYHWNHLDEINQLLGVRG
lipxyll	NFIDPTTKILYHLGSMINHDSTNDGMVSTCSSMFGKVISSNFNWNHLFDEINQVLAIRG *
lipcep	AYAEDPVAVIRTHANRLKLAGV
lipluteo	ANAEDPVAVIRTHANRLKLAGV
lipburk	ANAEDPVAVIRTHVNRLKQGV
lipchro	ANAEDPVAVIRTHVNRLKQGV
lipxyll	AYAEDPLAVIRTHVNRLKMQGL *

Figura 6: Alinhamento da lipase de *X. fastidiosa* (lipxyll) com as lipases das espécies *Chromobacterium viscosum* (lipchro), *Burkholderia glumae* (lipburk), *Pseudomonas luteola* (lipluteo) e *Pseudomonas cepacia* (lipcep) pertencentes à **subfamília 2**. (**Em vermelho**: resíduos de aminoácidos que pertencem a tríade do sítio catalítico da lipase; **em verde**: resíduos de ácido aspártico envolvidos no sítio de ligação ao Ca⁺⁺; **em roxo**: resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto; **em azul**: regiões conservadas e relacionadas aos sítios catalíticos).

Apesar da seqüência de nucleotídeos não apresentar similaridade com as lipases de *Pseudomonas* a comparação baseada nos aminoácidos revelou uma alta similaridade. Essa

similaridade foi comprovada com o uso do programa Clustal W (<http://www.es.emblnet.org/cgi-bin/clustal.cgi>) o qual foi utilizado nas análises descritas nas figuras 5 e 6, que demonstram claramente a similaridade com as lipases do gênero *Pseudomonas*. A maior similaridade foi obtida com as lipases pertencentes à subfamília 2, pois, embora os domínios mais importantes para a atividade lipolítica alinhem nos dois casos, a precisão do alinhamento das demais regiões é muito maior com as proteínas da subfamília 2, chegando-se a conclusão que *lipXF1* deve pertencer a essa subfamília

Os aminoácidos pertencentes ao sítio ativo e os que formam as pontes dissulfetos são conservados nessa lipase. A falta de similaridade no início da seqüência poderia ser devido à presença do peptídeo sinal, responsável pelo direcionamento da enzima dentro da célula ou para fora dela (secreção), e esse peptídeo pode variar de acordo com a espécie.

Sabendo-se que as lipases pertencentes à subfamília 2 são secretadas, logo, possuem peptídios sinais de secreção, houve a necessidade de se analisar a porção inicial da proteína. Para avaliar esse ponto, a seqüência putativa *lipXF1* foi analisada com o programa ipSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>) que calcula a probabilidade do endereçamento de proteínas a partir dos perfis de hidrofobicidade dos seus aminoácidos. Essa análise indicou que a *lipXF1* é direcionada para a membrana plasmática da célula, ao contrário da sua homóloga de *Pseudomonas* (GenBank number - GI:126329), que é nitidamente secretada. Essas análises foram refeitas pois o projeto genoma foi finalizado em 2000, sendo portanto importante se atualizar essas informações, já que novas proteínas e domínios são adicionados ao banco de dados mundial (GenBank).

As figuras 7 e 8 apresentam, respectivamente, um gráfico demonstrativo do resultado do iPSort e os valores para as predições.

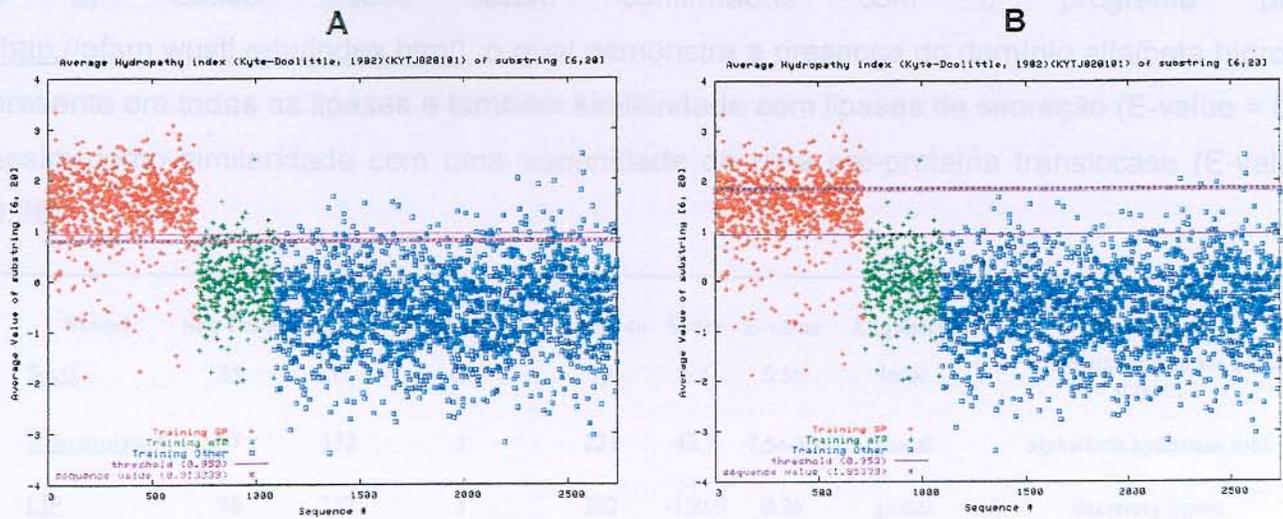


Figura 7: Predição do iSort para as seqüências: A) lipase de *X. fastidiosa* (*lipXF1*) e B) lipase de *P. luteola* (GI-126329) demonstrando a alta hidrofobicidade (pontilhado roxo) encontrada na lipase de *Pseudomonas* e a baixa em *Xylella* sendo mais um dado que demonstra que essa não é uma lipase tipicamente secretada (gráfico gerado pelo programa [gnuplot](#)).

Predicted as: *not having signal or mitochondrial targeting peptide*
 Sequence *lipXF1* (Type: nonplant)
 Values used for reasoning

Node	Answer	View	Substring	Value(s)	Plot
1. Signal peptide?	No	Average Hydrophathy (KYTJ820101)	[6,20]	0.813333 (>= 0.953? No)	show

Predicted as: *having a signal peptide*
 Sequence *LipPI* (Type: nonplant)
 Values used for reasoning

Node	Answer	View	Substring	Value(s)	Plot
1. Signal peptide?	Yes	Average Hydrophathy (KYTJ820101)	[6,20]	1.853333 (>= 0.953? Yes)	show

Figura 8: Valores da predição para as lipases de *X. fastidiosa* (*lipXF1*) e de *P. luteola* (*lipPI*)

Uma análise mais detalhada da seqüência para avaliar a presença de peptídeos sinais também foi realizada com o programa pSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>). Esse programa demonstrou que a seqüência tem uma maior probabilidade de ser uma proteína de membrana (valor da análise 0,368, interpretado pelo programa como certeza de localização), enquanto não existe um valor confiável que diga que essa proteína possua um peptídeo sinal para o transporte até o meio extracelular, como pode ser observada na análise do ipSORT (Figuras 7

e 8). Esses dados foram confirmados com o programa pFAM (<http://pfam.wustl.edu/index.html>), o qual demonstra a presença do domínio alfa/beta hidrolase presente em todas as lipases e também similaridade com lipases de secreção (E-value = 0,26) assim como similaridade com uma subunidade de uma pré-proteína translocase (E-value = 0,36).

Model	Seq-from	Seq-to	HMM-from	HMM-to	Score	E-value	Alignment	Description
<u>SecG</u>	35	52	62	79	6.5	0.36	local	Preprotein translocase SecG subunit
<u>Abhydrolase</u>	97	352	1	231	42.7	7.5e-10	glocal	alpha/beta hydrolase fold
<u>LIP</u>	98	352	1	302	-150.9	0.26	glocal	Secretory lipase
<u>Lipase_2</u>	131	150	77	96	9.9	0.0073	local	Lipase (class 2)

Figura 9: Valores da predição do pFAM para domínios na lipase de *X. fastidiosa*.

```

➡ SecG: domain 1 of 1, from 35 to 52: score 6.5, E = 0.36

      *->iLavlFfvlslvLsylvns<-*
      +++++Ffv++++L+ l+
query 35  VMSTVFFVNMIALVMLTG 52

➡ abhydrolase: domain 1 of 1, from 97 to 352: score 42.7, E = 7.5e-10

      *->frvillDlrGfGeSsp..pdlaeyrfdldaedlealldalglekpv
      r +++++ + S +++++pd ++ r+++l +++++a+l+ +g+ek v+
query 97  LRAHGANVYLSTSSAFqrPDGPNGRGEQLLAYVKAVLAITGAEK-VN 142

      lvGhSmGGaialayaakyPelrvkalvlvspplpaglssdlfprq..gnl
      l+G+S+GG+++++ aa +P+ +v+++++++p+ + +d + ++ +++l
query 143  LIGYSQGGTLVRYVA AVAPS-LVASVTMGTPHHGSELADYLD EtfnQGL 191

      eglllanfrnrllrsveallgralkq.....ffllgrplvsd
      gll- ++ l++ ++++++ ++q+ ++ +++++l++ + s+
query 192  TGLLSPVWAG-LNNAFASMTTGNPNQdmlaafkslmtsqVALFNKNYPSA 240

      flkqaedwlsalirqaeddgadgllgy...aaqlgkllawdvsalkdik
      l+ + +++++ +e++g+ + + y+ +aa ++k + +++ + ++
query 241  GLGKRG--SCQSGAEFETVGERQYLYswggAAIKEKKS LFGTKVIDTSV 288

      vPtlviwgtDpvlvpldaseklsalipn...aevvviddagHla.....
      P + + Dp +++++ ++ s +l+++++++ + +++++ +++++ +
query 289  FPFIDAANFIDP-TTKILYHLG-SVMINHdsgTNDGMVSTCSSMFgkvis 336

      ...llekpeevaelik<-*
      ++ + + +e+++++
query 337  snfNWNHFDEINQVLA 352
    
```

Figura 10: Os dois melhores alinhamentos encontrados com o programa pFAM para a lipase de *X. fastidiosa*.

4.2 – Clonagem do gene *lipXF1*

Utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir da seqüência da lipase de *X. fastidiosa* (Fig. 3) amplificou-se o fragmento denominado neste projeto de *lipXF1*, a partir do DNA genômico deste organismo. À porção 5' destes oligonucleotídeos foram acrescentados sítios de restrição (Tabela VII), que possibilitaram a inserção do produto de PCR direcionalmente no plasmídeo pET32a. A escolha das enzimas de restrição foi realizada com o auxílio do programa Clone (1993) analisando a seqüência do gene e a região de policlonagem do plasmídeo.

A Figura 11A mostra o resultado da amplificação de dois genes da lipase em *X. fastidiosa*, o primeiro codifica o gene denominado LipP de 978 pb, o segundo codifica a proteína de interesse *lipXF1*, com 1134 pb. A figura 10B comprova a clonagem do gene *lipXF1* em pET32a por meio do PCR das colônias obtidas após a transformação.

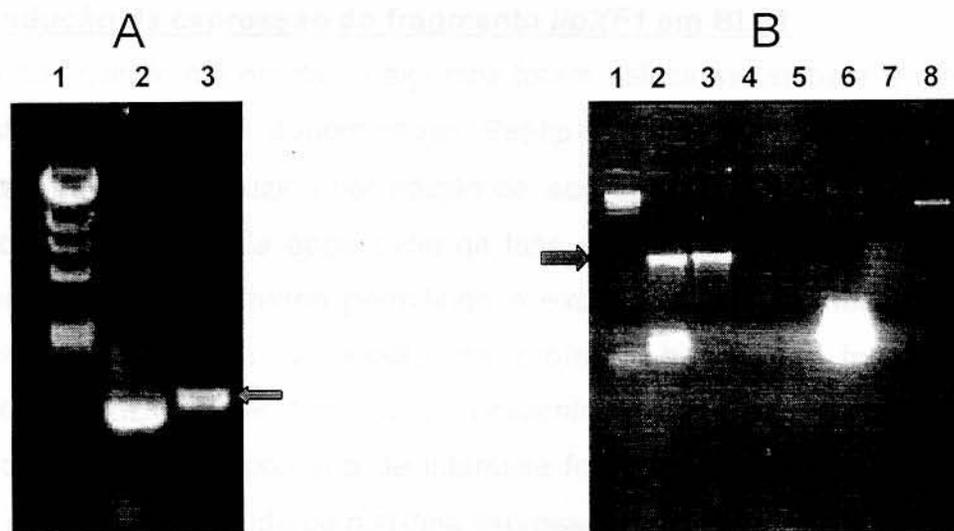


Figura 11: **A:** PCR do DNA genômico para amplificação do gene de lipase de *X. fastidiosa*. 1. DNA λ HindIII 2. LipP 3. *lipXF1*. A seta indica o fragmento de aproximadamente 1.132pb correspondente ao gene de interesse. **B:** PCR das colônias selecionadas contendo *lipXF1*. 1. DNA λ HindIII 2. PCR de DNA genômico de *X. fastidiosa* 3. DNA plasmidial Pet/*lipXF1*-6 4. DNA plasmidial Pet/*lipXF1*-14, 5. DNA plasmidial Pet/*lipXF1*-17 6. DNA plasmidial pET-32a 7. controle negativo 8. pET-32a digerido *Eco*RI e *Xho*I. A seta indica a posição do gene *lipXF1*.

Utilizando-se oligonucleotídeos para a porção 3' do plasmídeo pET32a e também os oligonucleotídeos usados na amplificação do gene *lipXF1* de *X. fastidiosa* realizou-se o seqüenciamento do fragmento obtido. Tendo-se confirmada a identidade do fragmento obtido através do programa Blast-two-sequences.

Após a ligação do fragmento *lipXF1* e o vetor pET32a, a construção foi utilizada para a transformação de células de *E. coli* DH10b competentes. As colônias transformantes foram selecionadas em meio LB contendo ampicilina (150µg/ml). Posteriormente o DNA plasmideal foi extraído destas células e digerido com as enzimas utilizadas para a clonagem. Esta análise mostrou que apenas o plasmídeo denominado pETlipXF1-6 continha o inserto desejado (Figura 11B), o que foi comprovado por novo seqüenciamento.

O segundo passo foi, então a transformação de *E. coli* BL21(DE3) com o plasmídeo pETlipXF1-6 para expressão da proteína heteróloga.

4.3 – Indução da expressão do fragmento *lipXF1* em BL21

Muitas colônias foram obtidas e algumas foram selecionadas para a indução por IPTG (em especial duas colônias denominadas Pet-lipXF1-5 [XF5] e Pet-lipXF1-7 [XF7]). A expressão da proteína foi induzida por adição de isopropil- Δ -D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) ao meio de cultura da bactéria após início da fase estacionária. IPTG age desreprimindo o operon *lac* presente no plasmídeo permitindo a expressão do fragmento de interesse. Os ensaios para verificação da expressão da proteína heteróloga foram realizados por visualização em gel SDS-PAGE 12% (SDS – *poliacrilamide gel eletrophoresis*) (Figura 12) e a confirmação da presença da proteína de interesse foi realizada por *Western blotting* (Figura 13) com anticorpo contra a cauda de histidina expressa em fusão com a proteína de interesse.

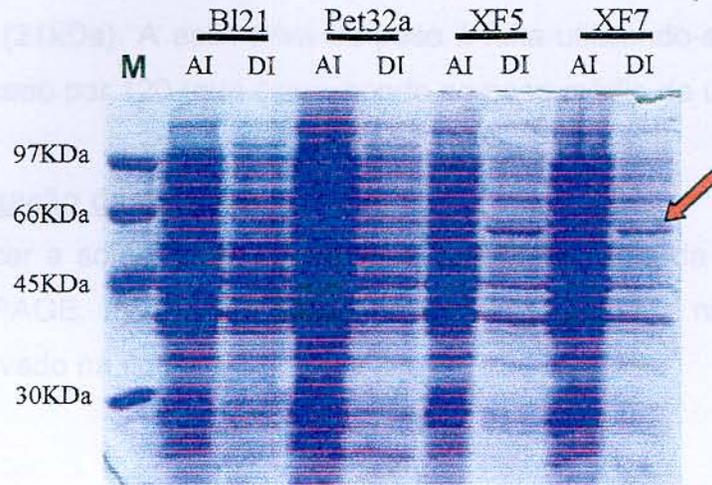


Figura 12: Indução de expressão da lipase de *X. fastidiosa* em pET32a. M padrão de peso molecular, AI antes da indução e DI depois da indução, BI21 bactéria sem ser transformada, pET32a bactéria transformada somente com o vetor pET32a, XF5 e XF7 colônias transformantes expressando a proteína recombinante *lipXF1*. A seta indica a proteína heteróloga *lipXF1*.

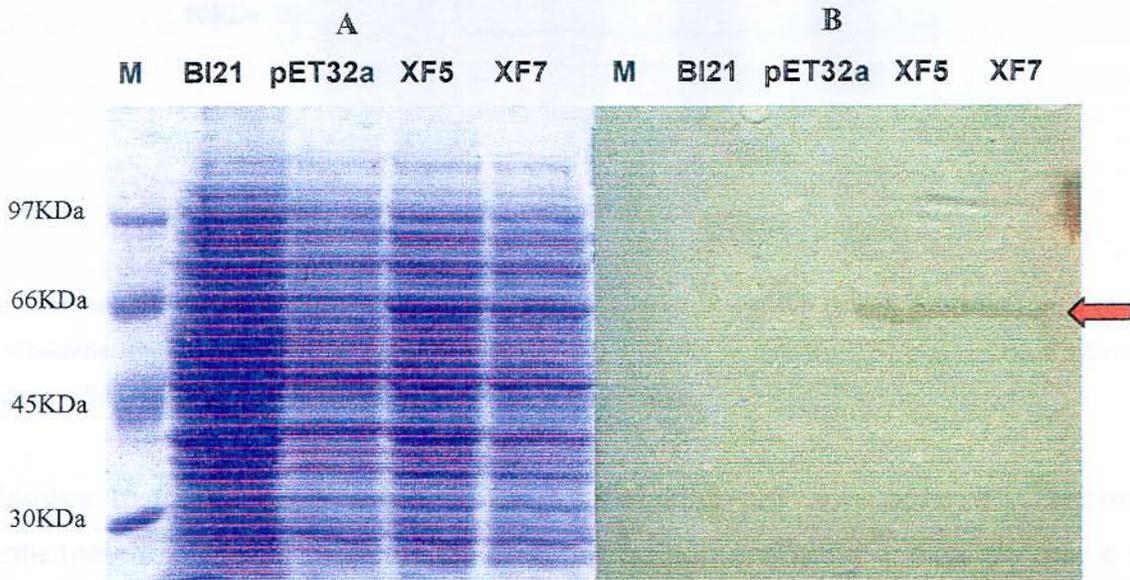


Figura 13: A. gel SDS-PAGE de indução, B. *Western blot* com as mesmas amostras de A. M - Padrão de peso molecular. BI21, pET32a, XF5 e XF7 são amostras de depois da indução. A seta indica a proteína *lipXF1*

O peso molecular de 66KDa observado no gel de SDS-Page para a proteína recombinante está de acordo com a estimativa de peso molecular obtida para a lipase de *X. fastidiosa* (45kDa) somada aos aminoácidos que formam a cauda de histidina na porção C-

terminal da proteína (21kDa). A estimativa do peso é feita utilizando-se o cálculo: número de aminoácidos multiplicado por 120 (que corresponde ao peso médio de um aminoácido).

4.4 – Solubilização da proteína

Para se verificar a solubilidade da proteína o sobrenadante da cultura de bactérias foi analisado por SDS-PAGE, mostrando que a proteína se manteve na maior parte insolúvel como pode ser observado na figura 14.

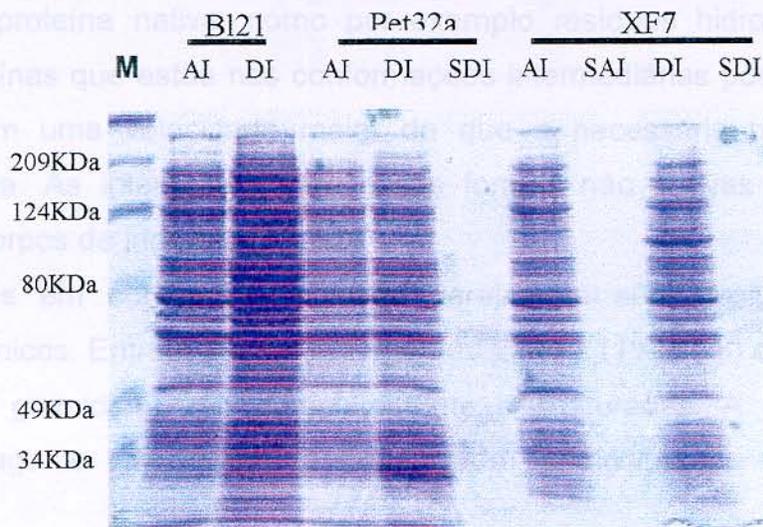


Figura 14: Teste com o sobrenadante das culturas induzidas de: Bactéria hospedeira (BI21); Bactérias com o vetor pET32a (pET32a) e bactéria transformante (XF7). Antes da indução (AI) e depois da indução (DI) assim como o sobrenadante de antes da indução (SAI) e depois da indução (SDI) da colônia transformante.

Células expressando a proteína foram rompidas por sonicação e o sobrenadante novamente testado. Não foi detectada a proteína no sobrenadante, indicando que a mesma, aparentemente, permanece insolúvel ou não foi possível a sua detecção por gel SDS-PAGE e Western Blotting.

Para purificar ou caracterizar proteínas intracelulares, um método eficiente é a disrupção da célula com a liberação da proteína em forma solúvel. O passo da disrupção é ponto de partida para todos os procedimentos subsequentes. A sonicação das células, um dos procedimentos mecânicos pelo qual se rompem as células, é feito através de vibrações que provocam um choque mecânico da parede celular.

Às vezes o procedimento de ruptura da célula não é suficiente para liberar a proteína ativa na solução. É o caso dos corpos de inclusão, que não são mais do que a acumulação de proteína insolúvel; geralmente se formam em bactérias quando a célula tem sido induzida para super expressar uma proteína em altos níveis.

As causas exatas da formação dos corpos de inclusão não são conhecidas. A cadeia polipeptídica nascente de uma proteína, enquanto está sendo sintetizada na célula, pode adotar diferentes conformações intermediárias até chegar à correta. Algumas destas conformações intermediárias podem expor resíduos que normalmente não são apresentados na superfície da proteína nativa, como por exemplo resíduos hidrofóbicos. Quando isso acontece, as proteínas que estão nas conformações intermediárias podem se associar umas com as outras em uma velocidade maior do que a necessária para que assumam a conformação nativa. As interações entre essas formas não nativas fazem com que elas precipitem como corpos de inclusão [56, 57].

As proteínas em corpos de inclusão geralmente são insolúveis em sais e em detergentes não iônicos. Entretanto, em detergentes iônicos (1% SDS) ou agentes caotrópicos (uréia, cloreto de guanidina) são completamente desnaturadas. A renaturação acontece removendo-se o agente denaturante e propiciando condições que favoreçam o "folding" completo [56, 57].

A Figura 15 (gel SDS - PAGE 12%) mostra a solubilização realizada utilizando-se o detergente TritonX-100. O resultado não foi satisfatório. Experimentos utilizando-se guanidina em várias molaridades também não foram conclusivos por não solubilizarem a proteína heteróloga produzida após a indução (dados não apresentados).

A Figura 16 (gel SDS - PAGE 12%) mostra a solubilização parcial da proteína heteróloga utilizando-se uréia 6M em tampão fosfato (setas). Em experimentos posteriores, obteve-se solubilização completa da proteína de interesse (lipXF1) deixando-se as células por um tempo maior em tampão com uréia 6M. Com a proteína solubilizada foram realizados teste preliminares de atividade e a purificação da proteína.



Figura 15 Teste solubilização de lipase de *X. fastidiosa* com Triton X-100. M -Padrão de peso molecular. Após a mistura com Triton X-100 tanto o extrato celular (EC) como o sobrenadante (S) das células; sem vetor (BI21), com vetor (pET32a) e recombinante (XF5) foram testados . A seta indica a proteína lipXF1.

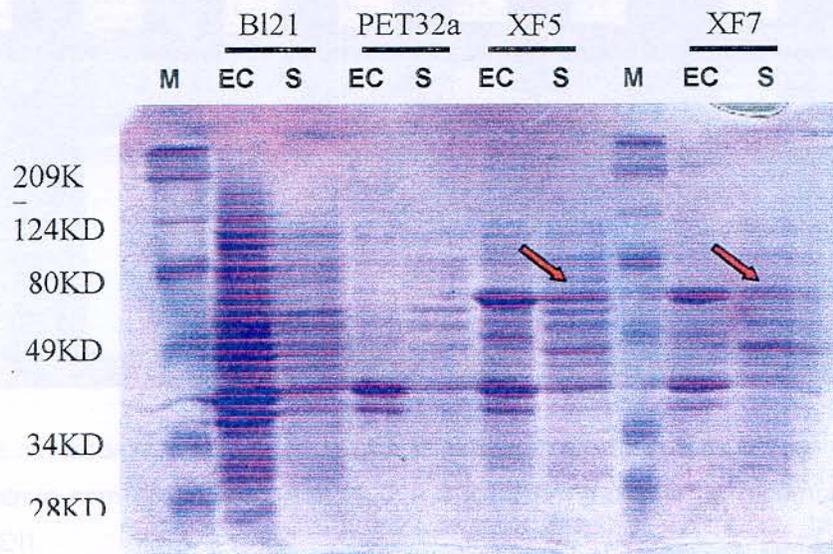


Figura 16: Teste solubilização de lipase de *X. fastidiosa* com Uréia 6M. M - Padrão de peso molecular. Após a mistura com Uréia 6M a amostra foi centrifugada e tanto o extrato celular (EC) centrifugado como o sobrenadante (S) das células; sem vetor (BI21), com vetor (pET32a) e recombinante (XF5 e XF7). Setas indica proteína heterologa solubilizada parcialmente.

Geralmente as proteínas mostram algum grau de fracionamento entre corpos de inclusão e proteína solúvel. No caso da proteína em estudo, apesar dela não ser visível nos géis de SDS-PAGE, é muito provável que parte dela esteja se dissociando sozinha, pois houve a verificação de atividade lipolítica no extrato de células como será demonstrado a seguir.

4.5 Testes preliminares de atividade com extrato celular

O primeiro teste de atividade foi executado com a proteína ainda nos corpos de inclusão, utilizando o precipitado celular (Fig. 17).

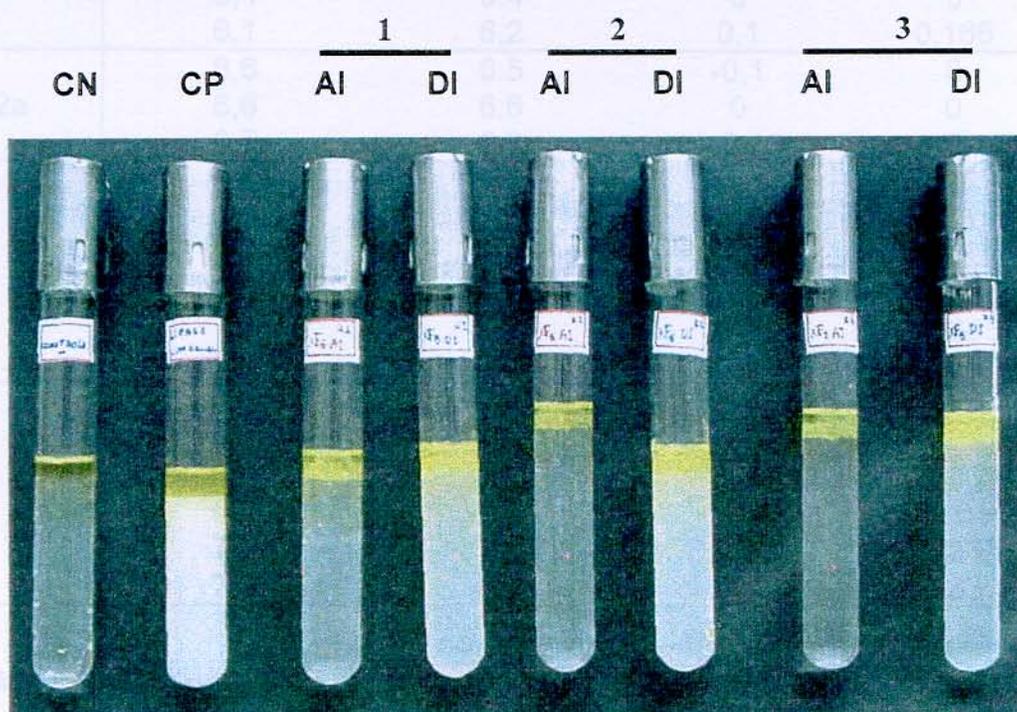


Figura 17: Teste de atividade da lipase de *X. fastidiosa* feita com precipitado de células rompidas. CN - Controle negativo, CP - Controle com lipase comercial, 1, 2 e 3 teste em triplicata do recombinante XF5 antes (AI) e depois da indução (DI).

Os precipitados celulares foram pesados e o peso ajustado para que não houvesse maior número de células no controle do que no teste.

Os resultados obtidos demonstraram que a lipase, mesmo sem a remoção da proteína de fusão, foi capaz de degradar glicerídeos de óleos, fato este demonstrado pela turbidez do meio onde os ácidos graxos são liberados. Esses dados foram confirmados com os valores

das correspondentes titulações efetuadas a partir de reações decorridas à 37°C durante 30 minutos (Tab. VIII).

Tabela VIII: Valores das titulações e da atividade das amostras induzidas de bactérias hospedeiras (BL21), bactérias com vetor (pET32a) e células recombinantes (XF5 e XF7), Δ é a diferença de volumes da titulação com NaOH 0.05N utilizada na fórmula $\mu\text{Mol}/\text{min} = M * \Delta * 1000 / T * P$ para determinação da atividade, onde T é o tempo em minutos da reação e P é peso de proteína (g) utilizada ou o volume (ml).

	Valores em mL das titulações		Δ	Atividade
	Antes da Indução	Depois da Indução		
BL21	6,7	6,7	0	0
	6,4	6,4	0	0
	6,1	6,2	0,1	0,166
PET32a	6,6	6,5	-0,1	0
	6,6	6,6	0	0
	6,7	6,6	-0,1	0
XF5	6,6	7,5	0,9	1,5
	6,6	7,6	1	1,6
	6,4	7,4	1	1,6
	7,0	7,7	0,7	1,1666
	7,0	7,7	0,7	1,1666
	7,1	7,7	0,6	1
XF7	6,5	7,1	0,6	1
	6,8	7,3	0,5	0,8333
	6,8	8,2	1,4	2,3333
	6,8	7,7	0,9	1,5
	7,0	7,8	0,8	1,3333
	7,5	8,0	0,5	0,8333

A partir dos dados apresentados na figura 17 e os valores de atividade obtidos (Tabela VIII) comprovou-se a atividade lipolítica mesmo no precipitado do extrato celular de células rompidas.

4.6 – Purificação da proteína

Um procedimento para a purificação de proteínas em um passo só é a cromatografia de afinidade a metais quelados. Este procedimento se baseia na hipótese de que um peptídeo específico com alta afinidade por íons metálicos, imobilizados em uma matriz, pode ser usado para purificar uma proteína recombinante fusionando-a ao peptídeo específico.

Foi-se atribuída a propriedade de proteínas se ligarem a íons metálicos imobilizados, à presença de His, Cis, e Trp. O número destes aminoácidos que estão sendo expostos determina a força da interação. O metal (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}) é imobilizado a uma resina inerte através da ligação a um ácido. O método de Cromatografia de afinidade a metais quelados (CAMQ) identifica de 6 a 10 resíduos de histidina, tanto na porção amino quanto carboxi-terminal da proteína de fusão. A cauda de His vai se ligar aos íons metálicos formando enlaces de coordenação. Para a eluição da proteína de fusão se utiliza um reagente de maior afinidade por metais. A figura 18 apresenta a purificação da proteína solubilizada e a sua confirmação por Western Blot.

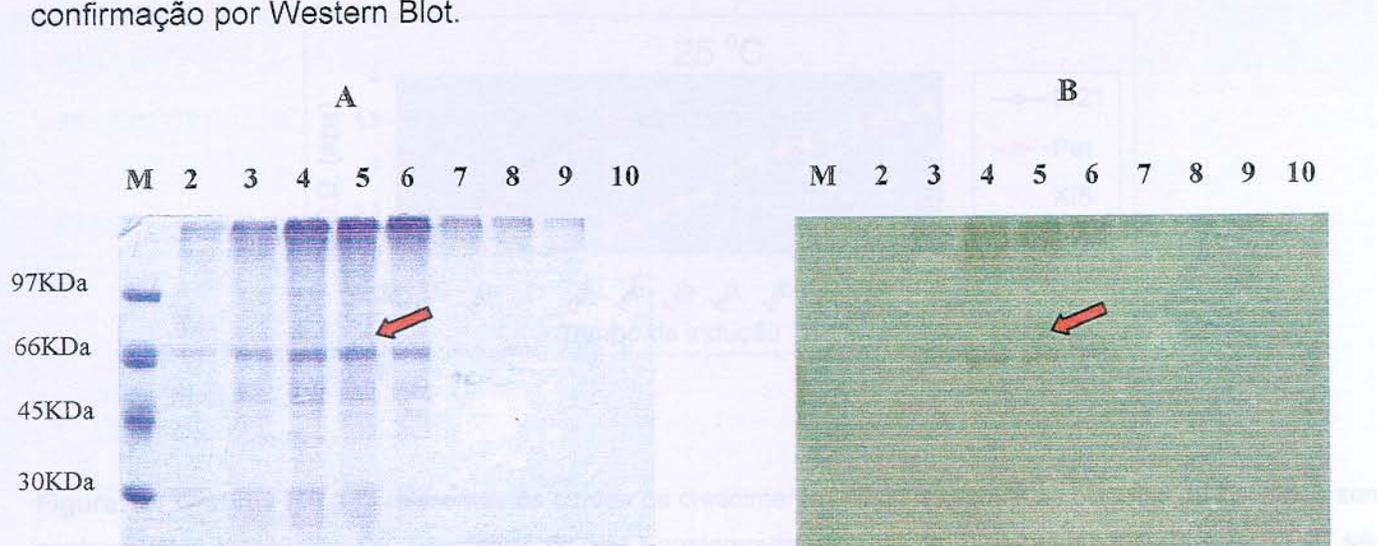


Figura 18: A. gel SDS –PAGE 12% mostrando a purificação da lipase de *X. fastidiosa*. B. *Western blotting* utilizando anticorpo anti-cauda de histidina com proteína solubilizada em tampão Uréia 6M e imidazol 30mM. 1. Marcador de peso molecular (M). 2 à 10 correspondem as aliquotas eluídas em tampão Uréia 6M e imidazol 80mM. A seta indica a presença da proteína após a purificação e a sua detecção em *Western blotting*.

4.7 – Curvas de crescimento com indução em diferentes temperaturas

Observando-se as baixas concentrações de lipase obtidas durante o crescimento celular e sabendo que a concentração de proteína solúvel e ativa poderia ser influenciado pela temperatura na qual as colônias foram crescidas, curvas de crescimento foram feitas em três temperaturas para avaliar a produção da enzima nas diferentes temperaturas (Figura 19).

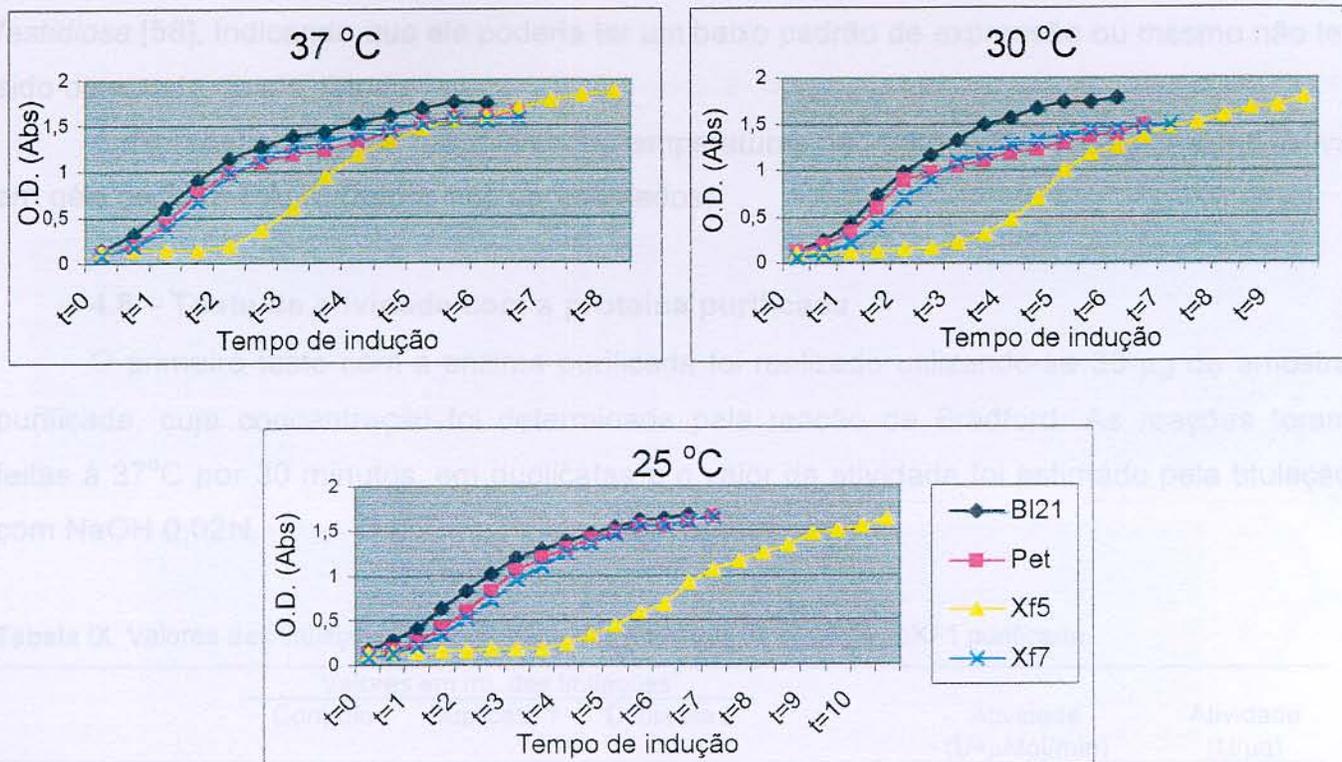


Figura 19: Gráficos I, II e III referentes às curvas de crescimento – BI21 se refere as colônias de bactérias sem nenhum vetor introduzido. Pet se refere à colônia transformada apenas com o vetor sem inserto e Xf5 e Xf7 são duas colônias selecionadas e que expressam o gene da lipase

Com estas curvas observou-se que existe um padrão no crescimento das colônias. Quando em temperatura mais baixa o crescimento inicial é um pouco mais demorado. É curioso notar que a transformante XF5, a qual expressa a proteína de forma mais constante ao longo das diversas induções feitas, apresenta uma redução na curva de crescimento em todas as condições analisadas. Isso poderia indicar que essa proteína apresenta alguma toxidez para as células, o que faria sentido uma vez que trata-se de uma lipase de amplo espectro que está sendo produzida intracelularmente. Lipídios da própria membrana talvez estejam sendo degradados. Essa toxidez explicaria a baixa expressão dessa proteína na bactéria e o fato dela permanecer em corpos de inclusão, evitando-se assim concentrações letais da proteína solúvel.

A expressão dessa proteína não foi encontrada nas análises de proteoma feitas com *X. fastidiosa* [58], indicando que ela poderia ter um baixo padrão de expressão ou mesmo não ter sido detectada nesse estudo.

A expressão do gene nas diferentes temperaturas não apresentou variação significativa em géis de SDS-PAGE (dados não apresentados).

4.8 – Teste de atividade com a proteína purificada

O primeiro teste com a enzima purificada foi realizado utilizando-se 30 µg de amostra purificada, cuja concentração foi determinada pela reação de Bradford. As reações foram feitas à 37°C por 30 minutos, em duplicatas e o valor da atividade foi estimado pela titulação com NaOH 0,02N.

Tabela IX: Valores das titulações e da atividade das amostras de proteína lipXF1 purificada.

	Valores em mL das titulações ¹			Δ^2	Atividade (U=µMol/min)	Atividade (U/µg)
	Controle	Duplicata 1	Duplicata 2			
Lipase de <i>P.aeruginosa</i>	7,0	8,0	8,1	1,05	11,666U	0,3888
Lipase de <i>X. fastidiosa</i>	6,5	7,0	7,0	0,5	5,55U	0,1851

¹ Volume de NaOH utilizado na titulação; ² Diferença entre valores de titulação dos controles e a média das duplicatas

Foram realizados testes com a proteína purificada na tentativa de se estabelecer uma concentração ideal dessa proteína para efetuar estudos de pH ótimo e temperatura. A proteína foi quantificada utilizando-se o método de Bradford e o teste foi realizado utilizando-se várias concentrações de proteína purificada.

Uma nova purificação foi feita e a concentração estimada pela reação de Bradford foi de 0,5µg/µl.

O teste continha 268 µl de tampão fosfato pH 7,5, 30 µl de óleo de oliva e as diferentes concentrações de proteína, que correspondiam para cada teste: 1µg, 5µg, 10µg, 15µg, 20µg, 25µg, 30µg, 35µg e 40 µg. O controle negativo foi feito com 220 µl de tampão fosfato pH 7,5, 30 µl de óleo de oliva e 80 µl de tampão contendo proteína purificada (o equivalente a 40µg de proteína), sendo que efetua-se a adição de Acetona/Etanol (1:1) antes para depois se incubar a 37°C por 30 minutos. O controle positivo foi feito utilizando-se 50µg de proteína pura de

Pseudomonas aeruginosa (Alkimia) e a titulação foi feita com NaOH 0,01N o tempo de reação foi de 30 minutos à temperatura de 37°C.

Todos os testes foram feitos em duplicatas e os resultados se seguem abaixo (Figura 20).

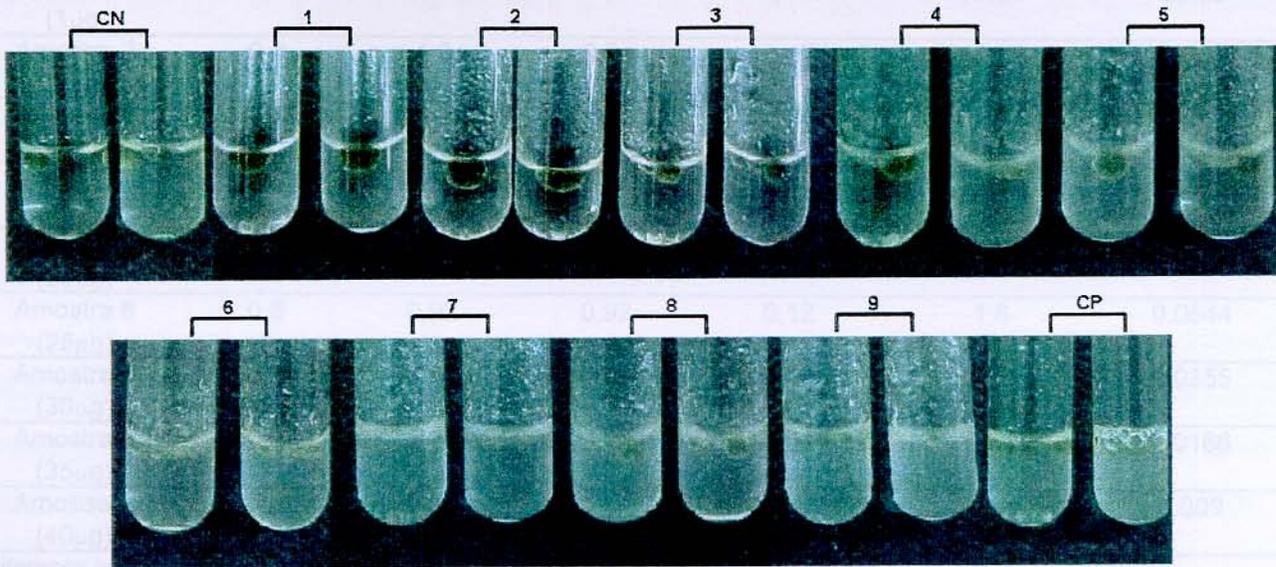


Figura 20: Teste em duplicata da atividade utilizando várias concentrações de proteína purificada. CN controle negativo, 1 teste contendo 1 μg de proteína, 2 teste contendo 5 μg de proteína, 3 teste contendo 10 μg de proteína, 4 teste contendo 15 μg de proteína, 5 teste contendo 20 μg de proteína, 6 teste contendo 25 μg de proteína, 7 teste contendo 30 μg de proteína, 8 teste contendo 35 μg de proteína, 9 teste contendo 40 μg de proteína, CP controle positivo contendo 40 μg da proteína comercial.

Os resultados desse experimento demonstraram a atividade lipolítica da enzima, sendo o aumento da turbidez causado pela liberação de ácidos graxos no meio. Esse incremento foi proporcional ao aumento da concentração da proteína purificada na reação. Entretanto, os valores das titulações feitas para determinar a atividade específica da enzima não refletiram esse resultado (tabela X). Ao contrário, a titulação apresentou um resultado inverso, ou seja uma menor quantidade de NaOH era necessária para a virada de pH quanto maior a quantidade de proteína purificada.

Tabela X: Determinação da concentração ótima de atividade da lipase de *X. fastidiosa*.

	Valores em mL das titulações			Δ^*	Atividade (U= μ Mol/min)	Atividade (U/ μ g)
	Controle	Duplicata 1	Duplicata 2			
Lipase de <i>P. aeruginosa</i>	0,8	2,4	2,0	1,4	9,33	0,1866
Amostra 1 (1 μ g)	0,8	1,01	1,0	0,205	68,33	68,33
Amostra 2 (5 μ g)	0,8	1,0	0,94	0,17	11,33	2,266
Amostra 3 (10 μ g)	0,8	1,0	1,0	0,2	6,666	0,666
Amostra 4 (15 μ g)	0,8	0,95	0,95	0,15	3,333	0,222
Amostra 5 (20 μ g)	0,8	0,94	0,94	0,14	2,333	0,1166
Amostra 6 (25 μ g)	0,8	0,92	0,92	0,12	1,6	0,0644
Amostra 7 (30 μ g)	0,8	0,91	0,88	0,095	1,05	0,0355
Amostra 8 (35 μ g)	0,8	0,85	0,86	0,06	0,5714	0,0166
Amostra 9 (40 μ g)	0,8	0,85	0,84	0,045	0,375	0,009

*Diferença entre valores de titulação dos controles e a média das duplicatas

A razão provável para isso deve ser o tratamento agressivo feito com uréia para a solubilização da proteína. Embora a mesma tenha sido purificada e dialisada, é possível que as quantidades que permaneceram perturbem a titulação. Nos experimentos feitos com extrato protéico, embora a solubilidade da proteína seja reduzida, não foi adicionado nenhum agente denaturante. Talvez por isso medidas de atividade tenham sido possíveis.

Assim sendo, a atividade apresentada na tabela X tem que ser observada com reserva, considerando esse complicador. Possivelmente a presença de contaminantes deve afetar a atividade da enzima, não devendo esse experimento ser usado para uma avaliação acurada da atividade específica da mesma.

Os testes realizados com extratos protéicos demonstraram a diferença entre os controles e os induzidos (Fig. 20), comprovando que, apesar de não ser possível se observar proteína no sobrenadante, uma pequena porcentagem estava ativa no meio de cultura. Com isso, em vista da dificuldade de se proceder os testes de atividade com a enzima purificado, decidimos avaliar as condições para atividade ótima da enzima (temperatura e pH) usando o extrato bruto.

4.9 – Teste com diferentes pHs e temperaturas utilizando o extrato bruto da lipase de *X. fastidiosa*

Testes de atividade utilizando o extrato bruto (precipitado celular sonificado e ressuspenso em tampão fosfato de potássio pH 7.0) foram realizados utilizando as temperaturas 30, 50 e 65°C, e os pHs 7,0; 8,0 e 9,0, como descrito no item materiais e métodos. Esses valores de temperaturas e pHs foram escolhidos de acordo com a observação do trabalho de Gilbert (1993), que faz um resumo das propriedades bioquímicas das diversas lipases de *Pseudomonas*.

Para o teste foi utilizado extrato do transformante XF5 induzido, sendo a bactéria BL21 não transformada utilizada como controle negativo. Células foram crescidas a 37°C até OD 0,6 e induzidas. Após 4 horas as células foram precipitadas, ressuspenso em tampão fosfato de potássio pH 7,0 na proporção de 5 ml para cada 1,5 g de células. As células foram sonificadas, novamente precipitadas e o sobrenadante descartado. O precipitado foi então ressuspenso como na etapa anterior, sendo ajustados para a concentração de 0,07g/ml, e submetido aos testes de atividade (Tabela XI e XII).

Tabela XI: Atividade do extrato bruto sonificado em triplicata de BL21 nas temperaturas de 30°C, 50°C e 65°C utilizando os pHs 7.0; 8.0 e 9.0.

		Valores em mL das titulações				Δ^*	Atividade (U= μ Mol/min)	Atividade (U/g)
		Controle	1	2	3			
30°C	BI21 pH 7,0	33,8	33,7	33,8	33,4	-0,16	0	0
	BI21 pH 8,0	16,8	17,1	17,1	16,9	0,23	0,07	0,8
	BI21 pH 9,0	22,7	22,6	22,8	22,8	0,033	0,011	0,1
	BI21 pH 7,0	30,3	30,3	30,2	30,3	-0,033	0	0
50°C	BI21 pH 8,0	15,8	15,6	15,8	15,9	-0,033	0	0
	BI21 pH 9,0	21,5	21,6	21,6	21,4	0,033	0,011	0,10
	BI21 pH 7,0	30,1	30,2	30,2	30,4	0,16	0,0533	0,7
	BI21 pH 8,0	15,9	16,2	16	16,1	0,2	0,0666	0,9
65°C	BI21 pH 9,0	20,5	22*	20,6	20,5	0,53	0,1766	2,56

*Diferença entre valores de titulação dos controles e a média das duplicatas

Tabela XII: Atividade do extrato bruto sonificado em triplicata do clone XF5 nas temperaturas de 30°C, 50°C e 65°C utilizando os pHs 7.0; 8.0 e 9.0.

		Valores em mL das titulações				Δ^*	Atividade (U= μ Mol/min)	Atividade (U/g)
		Controle	1	2	3			
30°C	PETXF5 pH 7,0	30,8	30,9	30,6	31,2	0,1	0,033	0,476
	PETXF5 pH 8,0	16,9	16,5	16,9	17,3	0	0	0
	PETXF5 pH 9,0	21,5	21,0	25,4	24,5	2,1	0,7	10
50°C	PETXF5 pH 7,0	32,5	35,5	36	35,2	3,066	1,02	14,60
	PETXF5 pH 8,0	17,8	19,3	19	19,1	1,3	0,4333	6,19
	PETXF5 pH 9,0	24,8	26,4	26,5	27,4	1,9	0,6333	9,0476
65°C	PETXF5 pH 7,0	30	31,2	31,5	31,4	1,3	0,4333	6,19
	PETXF5 pH 8,0	16,5	17,1	18,1	17,3	1	0,3333	4,7619
	PETXF5 pH 9,0	24,5	25,5	25,6	26	1,2	0,4	5,7142

*Diferença entre valores de titulação dos controles e a média das duplicatas

Estes resultados indicam que a lipase de *X. fastidiosa* clonada em *E. coli* apresenta uma atividade ótima em pHs alcalinos e temperaturas mais altas, comprovando ainda mais a sua semelhança com as lipases de *Pseudomonas sp.*

Sendo assim passamos para a segunda fase da clonagem do gene da *X. fastidiosa*, só que agora em levedura, esperando assim uma maior produção de proteína, o que facilitaria os testes de caracterização já que os níveis de expressão em *E. coli* se mostraram abaixo de esperado.

4.10 –Clonagem no vetor pPIC9K

O primeiro passo foi a subclonagem do gene da lipase em pGEM-T Easy para facilitar a sua digestão com as enzimas de restrição específicas que direcionariam a sua clonagem no vetor de expressão pPIC9K.

A figura 21A mostra a amplificação do gene *lipXF1* de *Xylella* e o PCR para confirmação do inserção do fragmento em pGEM-T.

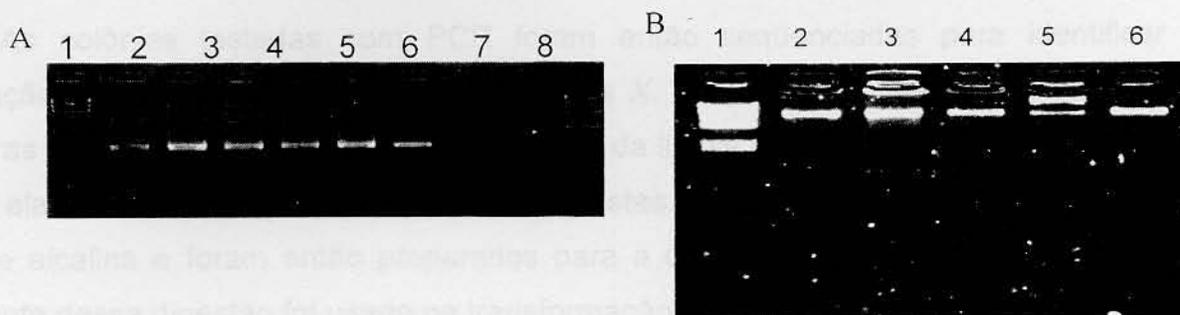


Figura 21: A - Amplificação do gene *lipXF1* utilizando oligonucleotídeos específicos. 1e10 - Marcador de peso molecular λ HindIII 2 - Colônia azul 3 a 6 - Colônias brancas 7 - PCR de DNA genômico de *Xylella* 8 - ligação pGEM-T lipXF1 e 9 – lipXF1 purificado por concert a partir de PCR. B- Digestão de alguns clones pPIC9k-lipXF1. 1 - Marcador de peso molecular λ HindIII 2 – pPIC9k digerido 3 – colônia 54 4 – colônia 55 5 – colônia 56 6 – colônia 57

As colônias positivas foram digeridas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* e o fragmento ligado ao vetor pPIC9K. Esses vetores foram transformados em *E.coli* e alguns foram escolhidos para teste de restrição com as mesmas enzimas utilizadas na clonagem (Figura 21B).

Um PCR com colônias positivas foi realizado para comprovar a existência do inserto (Figura 22).

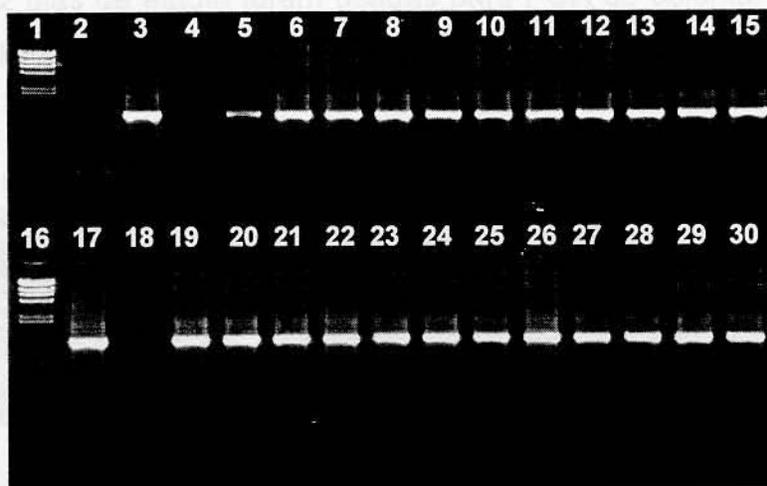


Figura 22: PCR de alguns clones pPIC9k-lipXF1. 1 e 16- Marcador de peso molecular λ HindIII 2 – H₂O 3 – DNA genômico de *X. fastidiosa* 4 – pPIC9K; 5 – *lipXF1* purificado; 6 ao 15 colônias E1 – E10 e na segunda linha do 17 ao 30 colônias E11 até F12 referentes a uma placa de 96 pocinhos

As colônias testadas com PCR foram então seqüenciadas para identificar se a orientação do gene e a identidade da lipase de *X. fastidiosa*. No seqüenciamento algumas amostras não mostraram identidade com o gene da lipase e foram escolhidas quatro colônias, sendo elas denominadas de 57, 58, 59 e 60. Estas colônias tiveram seus vetores extraídos por lise alcalina e foram então preparados para a digestão ou com *Sall* e/ou com *BglII*. O resultante dessa digestão foi usado na transformação de *P. pastoris*.

Para diferenciar os clones de levedura transformantes é necessário crescer as células em dois tipos de meio de cultura, contendo glicose e metanol (indutor do promotor *pAOX*) e observar o seu crescimento. Os clones positivos têm um crescimento mais lento em metanol pelo fato do gene *Aox* estar inativado com a introdução do gene de interesse.

Somente algumas colônias de *Pichia* foram obtidas a partir da clonagem com o vetor pPIC9K-lipXF1 extraído das colônias de *E. coli* e digeridos com *BglII* para transformação. Essas colônias foram então selecionadas.

4.11 – PCR de colônia das leveduras transformadas

Após a transformação as leveduras foram plaqueadas em meio mínimo YNB contendo sem o aminoácido Histidina, que é a marca de seleção para os clones positivos. As colônias que cresceram em 2 dias de estufa foram usadas para PCR de colônia. A figura 23 mostra o resultado com o PCR de colônia.



Figura 23: PCR de colônia das leveduras transformantes com pPIC9K-LipXF. **Primeiro gel:** 1 - Marcador de peso molecular λ HindIII 2 ao 9 colônias controle negativo, transformadas só com o vetor pPIC9K 9 ao 15 – colônias transformadas com o vetor proveniente da colônia 59 de *E. coli* digerida com *BglII*. **Segundo gel:** 1 - Marcador de peso molecular λ HindIII 2 ao 6 do terceiro gel continuação de colônias positivas transformadas com o vetor proveniente da colônia 59 de *E. coli* digerida com *BglII*. **Terceiro gel:** 1 - Marcador de peso molecular λ HindIII 7 ao 19 colônias positivas transformadas com o vetor proveniente da colônia 60 de *E. coli* digerida com *BglII*

4.12 – Teste de atividade em placas de rodamina

A Rodamina B é um corante que detecta a presença de ácidos graxos livres no meio de cultura e foi aqui utilizado para detectar a atividade lipolítica da lipase de *X. fastidiosa*.

As colônias positivas foram repicadas em placas YNB contendo Rodamina B, óleo de oliva comercial (galo) que servirá como substrato para a degradação pela lipase e metanol como agente indutor da atividade do promotor *pAOX*.

O resultado destas placas foi negativo, ou seja não houve formação do halo de degradação indicando que caso a proteína estivesse sendo produzida, não estava sendo exportada para fora da célula. Isso era esperado, uma vez que esse vetor de expressão possui no seu início o peptídeo sinal fator α , responsável por sinalizar a exportação da proteína para o meio de cultura.

4.13 – Confirmação da presença do inserto no genoma das leveduras transformantes

Para confirmar se o vetor transformado nas leveduras havia se integrado ao genoma foi extraído o DNA genômico de 18 colônias e uma hibridização foi realizada com esse material (Figura 24).

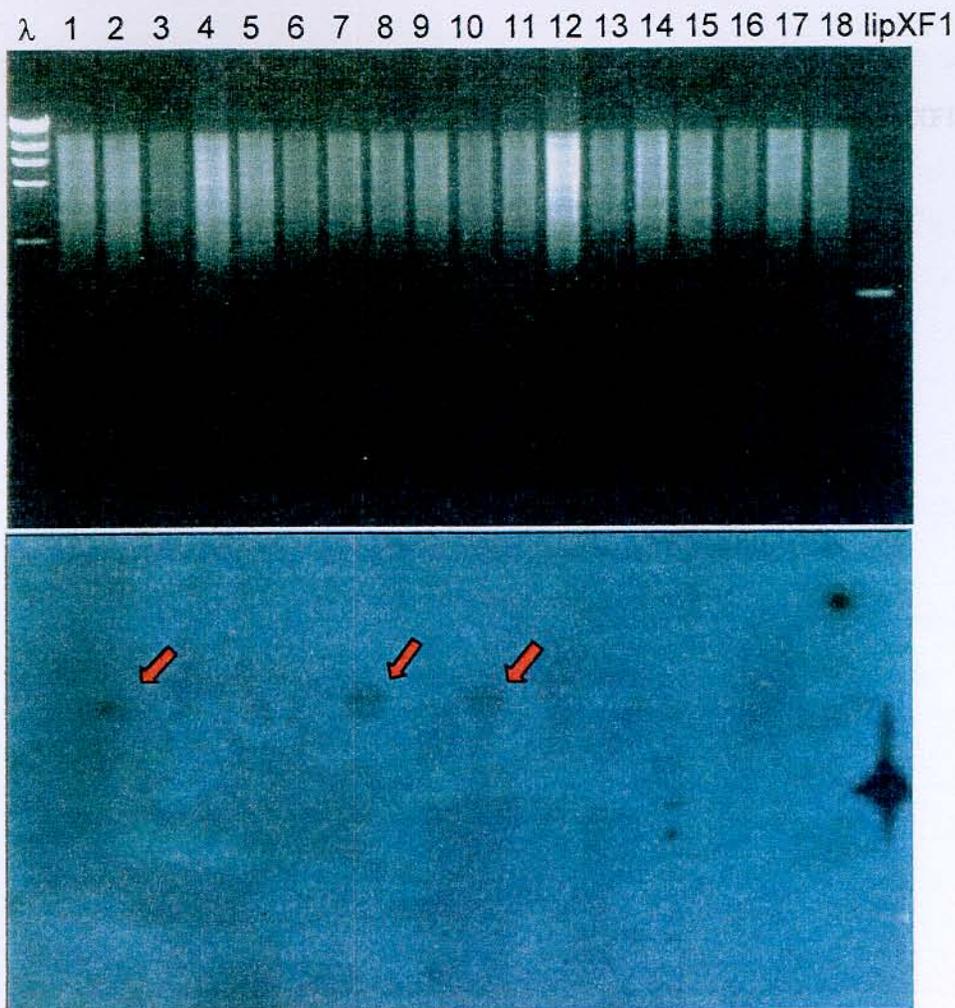


Figura 24 – Hibridização de 18 colônias de levedura transformantes. As setas indicam hibridização positiva.

Como se pode observar na figura 24, somente 3 colônias (2, 7 e 10) apresentaram o inserto. Isso pode ser devido a não baixa pureza da sonda ou por ser um método menos sensível que o PCR. Mas não se pode descartar que as outras colônias que não deram sinal no Southern Blotting não possuam o gene dentro do seu genoma em número de cópias baixo e insuficiente para ser detectado.

4.14 Northern Blotting das leveduras transformantes

Com a confirmação de que as colônias 2, 7 e 10 apresentavam o gene *lipXF1* no seu genoma foi realizada uma cinética para se analisar a transcrição do gene *lipXF1* em diferentes tempos: 0min, 60 min, 120 min; 180min.

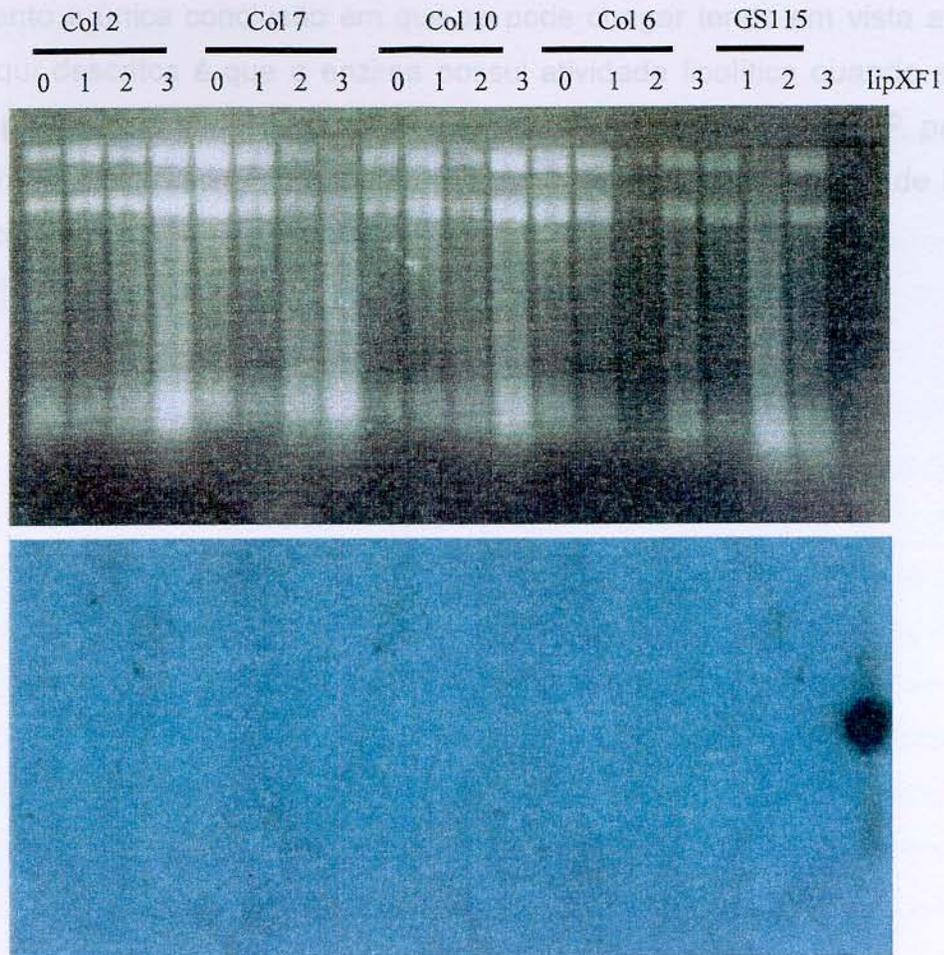


Figura 25: Hibridização utilizando-se amostras de RNA extraído das colônias 2, 7, 10, e 6 e RNA de levedura sem vetor(GS115), nos tempos de indução $T_0=0$, $T_1=60\text{min}$, $T_2=120\text{min}$ e $T_3=180\text{min}$ após a indução com metanol. O controle positivo é o produto de PCR de *lipXF1*.

A hibridização do Northern Blot obtido a partir dessas coletas não apresentou nenhum traço de produção de mRNA como é observado na figura 25.

4.15 Testes de atividade com as leveduras

Os testes de atividade com levedura foram feitos utilizando o precipitado celular e o meio de cultura restante da centrifugação. Para as colônias selecionadas para Southern Blot e Northern Blot, após 3 horas e 6 horas de indução não foram observados traços de atividade, sendo que o valor da titulação ficou igual ao obtido com precipitado celular e o sobrenadante provenientes de leveduras controles sem o inserto.

No momento a única conclusão em que se pode chegar tendo em vista a análise dos experimentos aqui descritos é que a enzima possui atividade lipolítica quando expressa em bactérias tendo preferência por pHs alcalinos e temperaturas mais altas. Em *P. pastoris* ainda não foi comprovado a expressão do gene *lipXF1* tanto no teste com a placa de Rodamina B como na hibridização por Northern Blotting.

5 – CONCLUSÕES

1. A ORF identificada como uma provável lipase em *X. fastidiosa* apresenta o sítio catalítico formado pela tríade AXSXG, sendo encontrado conservado como se pode observar pelas comparações da sua seqüência de aminoácidos com as de outras lipases através de estudos de similaridade. As análises comparativas utilizando os programas pSORT e pFAM assim como os alinhamentos com outras lipases utilizando o programa ClustalW confirmam as predições de ser uma lipase, porém não apresenta peptídeo sinal para secreção e sim para endereçamento interno na bactéria. O programa pFAM caracteriza essa lipase como uma da subfamília 2 reconhecida como de enzimas secretadas.

2. A expressão em do gene *lipXF1* em *E. coli* demonstrou que esse gene possui atividade lipolítica. A baixa expressão e sua provável inativação pelo uso de uréia como agente caotrópico para sua solubilização não permitiu um estudo mais detalhado da atividade da enzima pura. No entanto, o uso de extrato de lipase bruta (contida no precipitado sonificado das células induzidas) permitiu avaliar a preferência dessa lipase por meios alcalinos e temperatura elevada, o que era esperado devido a sua grande similaridade com as lipases produzidas pelas bactérias do gênero *Pseudomonas*, as quais também apresentam essas características.

3. Por ser uma proteína muito similar as proteínas de *Pseudomonas* que apresentam complexos sistemas de secreção e dobramento de suas enzimas um fato que deve ser considerado é a possível ineficiência da bactéria *E. coli* em processar corretamente a transcrição dessa enzima, além da cauda de histidina da proteína de fusão produzida pelo vetor pET32a aumentar a dificuldade de processamento e dobramento correto e secreção da mesma. Mesmo assim a proteína apresentou atividade, demonstrando a sua capacidade de ter o seu sítio ativo mesmo em condições fora das ideais.

4. A expressão em *P. pastoris* se mostrou ineficiente, fato esse que pode ser atribuído ao pouco tempo de indução analisado (apenas 3 horas de indução total). Como pode ser observado em outros trabalhos com essa levedura, a produção de RNA é obtida às vezes somente 24 horas após a indução. Para comprovar a ineficiência na produção da proteína em *P. pastoris* ensaios mais longos, com 24 a 48 horas de indução devem ser efetuados.

6 – PERSPECTIVAS FUTURAS

A enzima denominada lipXF1 (ORF 1181) apresenta um grande potencial de utilização industrial devido as suas propriedades muito similares àquelas das lipases de *Pseudomonas*, conhecidas por serem empregadas principalmente na indústria de detergentes e química fina. Entretanto, para a sua utilização industrial estudos adicionais são necessários visando a produção da enzima em uma forma secretada e por organismos mais adequados que a *E. coli*. Possivelmente, na própria *P. pastoris*, cujo potencial não foi esgotado neste trabalho. É ainda possível que o uso dessa enzima exija a co-expressão de genes auxiliares visto que as lipases produzidas pelas *Pseudomonas* possuem três tipos de secreção e dois deles dependem de proteínas adicionais que ajudam no processamento da modelagem correta como é o caso dos genes *Lifs* que cooperam com a correta modelagem da proteína e com a sua secreção da bactéria via os complexos de secreção Sec e Xcp.

Outra perspectiva para esse novo gene é a utilização em estudos que empregam a evolução direcional de proteínas, onde sua seqüência poderá ser combinada a de outras proteínas e uma seleção por um gene que expresse a característica desejada de lipase em conjunto com peptídeo sinal responsável pela sua secreção na forma ativa independente da necessidade de outros genes para o seu processamento.

Em resumo, o presente trabalho indica o potencial biotecnológico da lipase da *X. fastidiosa*, recomendando que sejam feitos esforços para a sua produção em larga escala utilizando vetores para a secreção em organismos mais eficientes que *E. coli*.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Panke, S. and M.G. Wubbolts, *Enzyme technology and bioprocess engineering*. Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(2): p. 111-6.
2. Schmid, A., et al., *The use of enzymes in the chemical industry in Europe*. Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(4): p. 359-66.
3. Burgess, R.R. and B. Witholt, *Protein Research, Proteomics and Applied Enzymology*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. **13**: p. 289-291.
4. Kauffmann, I. and C. Schmidt-Dannert, *Conversion of Bacillus thermocatenulatus lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design*. Protein Eng, 2001. **14**(11): p. 919-28.
5. Jaeger, K.E. and T. Eggert, *Lipases for biotechnology*. Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(4): p. 390-7.
6. Jaeger, K.E. and M.T. Reetz, *Microbial lipases form versatile tools for biotechnology*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(9): p. 396-403.
7. Jaeger, K.E., B.W. Dijkstra, and M.T. Reetz, *Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases*. Annu Rev Microbiol, 1999. **53**: p. 315-51.
8. Yamane, T., *Enzyme Technology for lipids Industry: An Engineering Overview*. JAOCS, 1987. **64**(12): p. 1657-1662.
9. Reetz, M.T., *Lipases as practical biocatalysts*. Curr Opin Chem Biol, 2002. **6**(2): p. 145-50.
10. Winkler, F.K., A. D'Arcy, and W. Hunziker, *Structure of human pancreatic lipase*. Nature, 1990. **343**(6260): p. 771-4.
11. Brandy, L., et al., *A Serine Protease Triad Forms The Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase*. Nature, 1990. **343**(6260): p. 767-770.
12. Ollis, D.L., et al., *The alpha/beta hydrolase fold*. Protein Eng, 1992. **5**(3): p. 197-211.
13. Schrag, J.D. and M. Cygler, *Lipases and alpha/beta hydrolase fold*. Methods Enzymol, 1997. **284**: p. 85-107.
14. Arpigny, J.L. and K.E. Jaeger, *Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties*. Biochem J, 1999. **343 Pt 1**: p. 177-83.
15. Woolley, P. and S.B. Petersen, *Lipases: Their structure, biochemistry and application*. 1994: Cambridge University Press.
16. Svendsen, A., *Lipase protein engineering*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1543**(2): p. 223-238.
17. Abigor, R.D., et al., *Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(6): p. 979-81.
18. Patel, R.N., *Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(6): p. 587-604.
19. Reetz, M.T. and K.-E. Jaeger, *Directed molecular evolution of protein*. Brakmann, S. Johnsson. 2002, Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
20. Pandey, A., et al., *The realm of microbial lipases in biotechnology*. Biotechnol Appl Biochem, 1999. **29 (Pt 2)**: p. 119-31.
21. Simpson, A.J., et al., *The genome sequence of the plant pathogen Xylella fastidiosa. The Xylella fastidiosa Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis*. Nature, 2000. **406**(6792): p. 151-7.
22. Rosenau, F. and K. Jaeger, *Bacterial lipases from Pseudomonas: regulation of gene expression and mechanisms of secretion*. Biochimie, 2000. **82**(11): p. 1023-32.

23. Frenken, L.G., et al., *Cloning of the Pseudomonas glumae lipase gene and determination of the active site residues*. Appl Environ Microbiol, 1992. **58**(12): p. 3787-91.
24. Tan, Y. and K.J. Miller, *Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from Pseudomonas fluorescens B52*. Appl Environ Microbiol, 1992. **58**(4): p. 1402-7.
25. Jaeger, K.E., et al., *Bacterial lipases*. FEMS Microbiol Rev, 1994. **15**(1): p. 29-63.
26. Shinkai, A., A. Hirano, and K. Aisaka, *Substitutions of Ser for Asn-163 and Pro for Leu-264 are important for stabilization of lipase from Pseudomonas aeruginosa*. J Biochem (Tokyo), 1996. **120**(5): p. 915-21.
27. Soberon-Chavez, G. and B. Palmeros, *Pseudomonas lipases: molecular genetics and potential industrial applications*. Crit Rev Microbiol, 1994. **20**(2): p. 95-105.
28. Stead, D., *Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses*. J Dairy Res, 1986. **53**(3): p. 481-505.
29. Beven, C.A., M. Dieckelmann, and I.R. Beacham, *A strain of Pseudomonas fluorescens with two lipase-encoding genes, one of which possibly encodes cytoplasmic lipolytic activity*. J Appl Microbiol, 2001. **90**(6): p. 979-87.
30. Duong, F., et al., *The Pseudomonas fluorescens lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system*. Mol Microbiol, 1994. **11**(6): p. 1117-26.
31. Martinez, A., P. Ostrovsky, and D.N. Nunn, *LipC, a second lipase of Pseudomonas aeruginosa, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components*. Mol Microbiol, 1999. **34**(2): p. 317-26.
32. Kim, E.K., et al., *Lipase and its modulator from Pseudomonas sp. strain KFCC 10818: proline-to-glutamine substitution at position 112 induces formation of enzymatically active lipase in the absence of the modulator*. J Bacteriol, 2001. **183**(20): p. 5937-41.
33. Wilhelm, S., J. Tommassen, and K.E. Jaeger, *A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 1999. **181**(22): p. 6977-86.
34. Litthauer, D., A. Ginster, and E.V.E. Skein, *Pseudomonas luteola lipase: A new member of the 320-residue Pseudomonas lipase family*. Enzyme and microbial Technology, 2002. **30**: p. 209-215.
35. Gilbert, E.J., *Pseudomonas lipases: biochemical properties and molecular cloning*. Enzyme Microb Technol, 1993. **15**(8): p. 634-45.
36. Schmidt-Dannert, C., J. Pleiss, and R.D. Schmid, *A toolbox of recombinant lipases for industrial applications*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **864**: p. 14-22.
37. Gellissen, G., et al., *Progress in developing methylotrophic yeasts as expression systems*. Trends Biotechnol, 1992. **10**(12): p. 413-7.
38. Lima, B.D., , *A produção de insulina por engenharia genética: bactéria transgênica produz insulina humana*. 2001.
39. Gellissen, G., et al., *Heterologous protein production in yeast*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1992. **62**(1-2): p. 79-93.
40. Hockney, R.C., *Recent developments in heterologous protein production in Escherichia coli*. Trends Biotechnol, 1994. **12**(11): p. 456-63.
41. Mierendorf, R., K. Yeager, and R. Novy, *The pET system: Your Choice for Expression*. InNovations, 1994. **1**(1): p. 1-3.
42. Studier, F.W., et al., *Methods in enzymology*. Vol. 185. 1990. 60-89.
43. Baneyx, F., *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(5): p. 411-21.

44. Cregg, J.M., T.S. Vedvick, and W.C. Raschke, *Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(8): p. 905-10.
45. Hollenberg, C.P. and G. Gellissen, *Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts*. Curr Opin Biotechnol, 1997. **8**(5): p. 554-60.
46. Gellissen, G., *Heterologous protein production in methylotrophic yeasts*. Appl Microbiol Biotechnol, 2000. **54**(6): p. 741-50.
47. Cereghino, J.L. and J.M. Cregg, *Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, 2000. **24**(1): p. 45-66.
48. Cereghino, G.P. and J.M. Cregg, *Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(5): p. 422-7.
49. Gellissen, G. and M. Veenhuis, *The methylotrophic yeast Hansenula polymorpha: its use in fundamental research and as a cell factory*. Yeast, 2001. **18**(3): p. i-iii.
50. Ausubel, F.M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 1-4. 2001, USA: John Wiley & Sons, Inc.
51. Sambrook, J., E.F. Fritsh, and T. Maniatis, *Molecular cloning - A laboratory manual*. 1989, San Diego: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
52. Torres, F.A.G. and L.M.P. Moraes, *Proteínas recombinants produzidas em leveduras*. 2001.
53. Cregg, J.M., et al., *Recombinant protein expression in Pichia pastoris*. Mol Biotechnol, 2000. **16**(1): p. 23-52.
54. Miller, E.M. and J.A. Nickoloff, *Escherichia coli electrotransformation*. Methods Mol Biol, 1995. **47**: p. 105-113.
55. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**: p. 3389-3402.
56. Rudolph, R. and H. Lilie, *In vitro folding of inclusion body proteins*. Faseb J, 1996. **10**(1): p. 49-56.
57. Yasukawa, T., et al., *Increase of solubility of foreign proteins in Escherichia coli by coproduction of the bacterial thioredoxin*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25328-31.
58. Smolka, M.B., et al., *Proteome analysis of the plant pathogen Xylella fastidiosa reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution*. Proteomics, 2003. **3**(2): p. 224-37.