UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE LIPASE RECOMBINANTE EM *PICHIA PASTORIS*

MANAUS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC

ANDRÉ DA FONSECA VIEIRA

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE LIPASE RECOMBINANTE EM *PICHIA PASTORIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR: PROF. Dr. SPARTACO ASTOLFI FILHO

CORIENTADOR: PROF. Dr. EDSON JUNIOR DO CARMO

MANAUS

2019

ANDRÉ DA FONSECA VIEIRA

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE LIPASE RECOMBINANTE EM *PICHIA PASTORIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Junior do Carmo, Presidente (Presidente)

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Nei Pereira Junior

Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

Prof. Dr. Augusto Bucker

Centro de Biotecnologia da Amazônia- CBA

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Bom Deus pela amabilidade com que me tratou nesses anos de estudo, junto com minha noiva, suportanto todas minhas impaciências e imperfeições. Agradeço a minha família que me apoiou em todos os momentos para que este trabalho ocorresse.

Agradeço ao Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia, ao Instituto de Ciências Biológicas e a Universidade Federal do Amazônas pelo apoio institucional, junto com a Divisão de Biotecnologia do Centro de Apoio Multi-Institucional (CAM) pelo espaço cedido ao projeto.

Agradeço a orientação do professor Spartaco Altolfi Filho em conjunto, com o professor Edson Junior do Carmo pela formidável sabedoria e proficiência em companhia de todos os professores e alunos que colaboraram no decorrer deste projeto.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superio financiadores (CAPES), pela concessão da bolsa, sem o qual, não seria possível a realização deste projeto.

A todos meu muito obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO _____ *15*

1.1 Sistema de expressão heteróloga _____ *17*

1.2 Pichia pastoris como sistema de expressão heteróloga _____ *19*

1.3 Lipase: características gerais _____ *21*

1.4 Aplicação de lipase _____ *27*

1.5 Fontes de lipases _____ *29*

1.6 Lipases bacterianas _____ *30*

2 JUSTIFICATIVA _____ *32*

3 OBJETIVOS _____ *33*

3.1 Objetivo geral _____ *33*

3.2 Objetivos específicos _____ *33*

4 MATEIAL E MÉTODOS _____ *34*

4.1 Estudos da sequência de aminoácidos da proteína codificada. _____ *34*

4.2 Isolamento do gene de lipase da biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio _____ *34*

4.3 Ligação do gene de lipase no vetor de clonagem pGEM-T _____ *35*

4.4 Preparo de Escherichia coli DH5α eletrocompetentes para transformação genética _____ *37*

4.5 Transformação e seleção das bactérias recombinantes _____ *37*

4.6 Extração plasmidial (pGEM-T/Lip) _____ *38*

4.7 Digestão do vetor de clonagem e recuperação do inserto _____ *38*

4.8 Ligação do gene de lipase no vetor de expressão e secreção pPIC9 _____ *39*

4.9 Linearização do vetor de expressão e secreção de lipase para transformação de Pichia pastoris _____ *40*

4.10 PCR analítica do vetor de expressão 40

4.11 Preparo de Pichia pastoris GS115 eletrocompetente e tranformação genética 41

4.12 Análise da integração do gene lip no genoma da levedura 42

4.13 Produção de lipase recombinante 43

4.13.1 Seleção dos clones produtores de lipase funcional 43

4.13.2 Indução dos clones recombinantes para produção de lipase em fermentação submersa 43

4.12.3 Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE 44

4.12.4 Precipitação de proteínas extracelulares no sobrenadante e cultura 44

4.14 Caracterização enzimática de lipase recombinante produzida por Pichia pastoris. 44

4.14.1 Caracterização da lipase recombinante 44

4.14.2 Reação de hidrolise em fase aquosa (adaptado de Kumar et al 2012) 44

4.14.3 Efeito do pH sobre a atividade enzimática de lipase 45

4.14.4 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de lipase 45

5 RESULTADOS E DISCURSÃO 46

5.1 Análise da sequência de aminoácidos 46

5.2 Isolamento do gene de lipase por PCR 46

5.3 Clonagem do gene lip no vetor pGEM-T 47

5.4 Subclonagem do gene lip no vetor de expressão e secreção pPC9 49

5.5 Seleção dos fenótipos Mut^+ e Mut^s dos clones recombinantes 54

5.6 Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE 55

5.7 Atividade de hidrólise da lipase recombinante 57

5.8 Efeito do pH sobre a atividade enzimática de lipase: determinação do pH ótimo da atividade catalítica 58

5.9 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de lipase 60

5.10 Determinação de K_m e V_{max} aparentes da lipase recombinante 61

6 CONCLUSÃO _____ *63*

7 REFERÊNCIAS _____ *64*

8.1 Meios de cultivo de Levedura P. pastoris _____ *77*

8.2 Meio de cultivo para Bactérias. _____ *79*

9 APÊNDICE _____ *80*

9.1 Alinhamento da sequência nucloetidica BLASTN _____ *80*

9.2 Alinhamento da sequência BLASTT _____ *82*

9.3 Alinhamento da sequencia protéica verificando possíveis pontos de glicolização. _____ *86*

Resumo

As triacilglicerol lipases, (E.C.3.1.1.3), usualmente chamadas de lipases, catalisam reações de ésteres carboxílicos em triacilglicerol formando ácidos graxos livres, possuem a característica de exercer atividade catalítica em meio aquoso de hidrólise. Fora do meio aquoso, ocorrem reações, de esterificação, interesterificação ou transesterificação. Devido ao grande potencial biotecnológico, as enzimas lipolíticas tem ganhado enorme destaque para uso industrial devido ao seu abrangente leque de aplicações, constituindo um dos grupos de maior importância em biocatálise, favosrescendo maior eficácia no processo. Justifica-se o estudo de novas moléculas com alto potencial biotecnológico para suprir novas necessidades do mercado mundial, especialmente as que provém da Amazônia, região ímpar em diversidade biológica. Com o objetivo de caracterizar enzimaticamente uma lipase recombinante expressa em *Pichia pastoris,* o gene codificador de lipase foi isolado de uma biblioteca metagenômica de terra preta de índio por PCR e integrado no genoma da levedura *P. pastoris* no vetor de expressão pPIC9. A transformação ocorreu por eletroporação com 10 µg do cassete de expressão linearizado e clones foram selecionados em meio minimo em aminoácidos. A seleção de clones recombinantes ocorreu em BMMY sólido contendo 1% de tributirina em meio BMMY com clones positivos cultivados em fermentação submersa induzida com metanol 0,5% para a produção de lipase. A região estrutural do gene de lipase foi amplifica com aproximadamente 1200 pb. Foram observados halos de degradação aos redores das colônias. Averiguou-se a presença da enzima com 50 kDa no gel de SDS PAGE. A caracterização enzimática foi último passo para verificar as possibilidades biotecnológicas desta lipase por meio de ensaios colorimétricos, que resultou positivamente para atividade enzimática de 50,80 U/mL temperatura ótima de 50°C e pH de 7 sendo o melhor tempo de reação de 5 minutos

1. INTRODUÇÃO

As aplicações práticas da engenharia genética tem superado as expectativas, no controle e eliminação de doenças, produção de enzimas e biomoléculas para o benefício humano, não se imagina os limites das possibilidades desta ciência. Na indústria passou a ser possível o uso de microrganismos recombinantes na síntese em larga escala de insulina, hormônios de crescimento, interferon alfa com atividade biológica contra infecções virais e alguns tumores malignos (CANDEIAS 1991; BROWN, 2010). A engenharia genética auxiliou a indústria alimentícia com o melhoramento de culturas vegetais aumentando a colheita e diminuindo a competição de alimento por produto vegetal, tendo em consideração que, em muitos países, como no Brasil parte da cultura vegetal destina-se produção de outros recursos necessários (CANDEIAS 1991; CARRER *et al.*, 2010). Nos setores médicos, químicos e farmacêuticos, proporcionou maior escala de medicamentos como vacinas para o controle de doenças, fármacos complexos, diagnósticos de doenças genéticas com: Anemia falciforme, diabetes, doença de Alzheimer, hemofilia, retinite pigmentosa, etc (CANDEIAS 1991; DINIZ e FERREIRA, 2010). Em aplicações terapêuticas é notável o uso de anticorpos monoclonais para identificação ou tratamento de tumores malignos que graças a engenharia genética é possível a clonagem em bactérias dos genes capazes de codificar anticorpos, estes modificados para favorecer a purificação, são capazes de reconhecer antígenos da superfície de células tumorais malignas e associados a fármacos lesar mais especificamente o tumor (CANDEIAS 1991; CORDEIRO *et al.*, 2014).

Este patamar de desenvolvimento só foi possível graças à tecnologia do DNA recombinante (TDR). No ano de 1993 quando o mercado de enzimas era aproximadamente 140 milhões de dólares por ano, perto de 50% dos produtos enzimáticos eram recombinantes (HODGSON, 1994; OLIVEIRA, 2012). Atualmente o uso de enzimas cresce progressivamente, com um mercado de bilhões de doláres, especialmente em setores de bioenergia, bem estar, alimentação sendo estimado um crescimento de 8% ao ano para o ano de 2018 (KUMAR *et al*., 2014; SINGH *et al*., 2016; SANROMÁN *et al.* 2017).

Em 1898, Heinrich Winterberg, descreveu que havia discrepância no número de microrganismos entre cultiváveis em meio de cultura e bactérias totais presentes no solo capazes de ser contadas pela microscopia. Desde então, a incapacidade de cultivo microbiano foi chamado 'Grande anomalia na contagem de placas'. Apesar do fenômeno não ser compreendido plenamente tem-se progredido graças às técnicas de engenharia genética chamada Metagenômica (HANDELSMANL *et al*, 1998; LEE, 2013). A fim de acessar os microrganismos não cultiváveis esta técnica reúne vários métodos *in vitro* proporcionando o acesso a genes da população microbiana antes inacessíveis ao cultivo em placa (PEREIRA, 2011). Teoricamente, uma biblioteca metagenômica contém clones representando todo o complemento genético de um único hábitat, embora isso dependa da eficiência da extração e clonagem de DNA. A informação mantida dentro de uma biblioteca metagenômica pode ser usada para determinar a diversidade e atividade da comunidade, a presença de microrganismos específicos ou vias bio-sintéticas, bem como presença de gene individuais (HANDELSMANL *et al*, 1998; STEELE e STREIT, 2005; PEREIRA, 2011; GHOSH *et al*, 2018). As análises metagenômica podem se dar de duas formas distintas: Em um alvo específico a ser amplificado e sequenciado em regiões não seletivas conhecida como *'shotgun metagenomics'* se baseia na amplificação e/ou seqüenciamento de todas as sequências de uma amostra de solo tem a capacidade de identificar a maioria dos organismos na amostra ambiental (AMRANE e LAGIER 2018; GHOSH *et al*, 2018).

A análise *shotgun metagenomics* é subdividida em dois tipos: (1) Tabelas baseadas em sequências relatando a diversidade microbiana de uma amostra ambiental específica; (2) e telas funcionais que identificam os produtos gênicos funcionais, mas não determinam de que espécie o material genético originou. É de fundamental importância conhecer a diversidade microbiana e a abundância relativa de espécies na amostra ambiental para averiguar o resultado.

As análises de RNA-Seq de comunidades bacterianas complexas são conhecidas como Metatranscriptômica. É eficiente para elucidar e descobrir novos genes, mas existe limitações em obter RNA de alta qualidade a partir de amostras ambientais. O estudo da atividade microbiana no meio complexo juntamente com as vias catabólicas é chamado metaproteômica, associado aos estudos de metagenômica e Metatranscriptômica fornece luzes à dinâmica funcional elucidando atividade microbiana e capacidade de produção. (GHOSH *et al*, 2018).

A técnica metagenômica utilizando em *amplicons* 16S se baseia nas regiões variáveis do gene bacteriano 16S rRNA para fazer atribuições taxonômicas de toda a comunidade. As análises em alvo utilizam *amplicons* que incluem RNA ribossomal 16S para bactérias e espaçador interno transcrito (ITS) para fungos e apara eucariotos a região ribossomal 18S (GHOSH *et al*, 2018). É utilizada também para análises clínicas como método mais eficiente para detecção de patógenos em comparação ao método de diagnostico padrão. Amrane e Lagier relatam a detecção de leptospirose, encefalite e outras infecções detectadas por metagenômica, e não relatadas por métodos convencionais. Existe limitação na técnica devido a semelhança da sequência 16 rRNA entre cepas de diferentes microrganismos podendo ser confundidos. Como a análise 16S em alguns casos não é possível diferenciar espécies intimamente relacionadas, por exemplo, *Echerichia coli* O157, H7 e K-12 não podem ser diferenciadas (AMRANE e LAGIER 2018).

1.1 Sistema de expressão heteróloga

O sistema de expressão heteróloga mais comum é *Escherichia coli*, bactéria gram negativa em forma de bastonete, e classificada como membro da família *Enterobacteriaceae* dentro da classe *Gammaproteobacteria*. Está entre os organismos mais estudados que podem crescer rapidamente tendo duplicado sua população por volta de 20 minutos nas condições ideais, seu baixo custo e alta densidade celular são vantagens desejadas. Entre suas desvantagens a baixa secreção de produtos recombinante e ou a produção de proteínas inativas na forma de corpos de inclusão (CHEN, 2012). Muitos genes foram clonados em *E.coli* produzindo inúmeros produtos industriais. Esta bacéria foi isolada pela primeira vez em 1917 como *Escherichia coli Nissle* durante a primeira guerra mundial pelo Dr. Alfred Nissle provando ser terapeuticamente segura por não produzir enterotoxinas ou citotoxinas e eficaz para o tratamento de patógenos intestinais (OU *et al*, 2016; JANG *et al* 2017).

E. coli como um sistema de expressão heteróloga favoreceu vantagens para uso biotecnológico e industrial, mas para realização de diferentes métodos e funções, em algumas situações, não é possível se liminar a *E.coli* apesar da abrangência de vetores existentes em bactérias. Como outra forma de clonagem em microganismos as leveduras são hospedeiros atrativos para produção de proteínas heteróloga. Diferente das bactérias, sua organização celular permite que eles realizem muitos dos eventos pós-traducionais, processamento e modificações necessárias na síntese de proteínas 'autênticas' e bioativas de mamíferos. Além disso, eles retêm vantagens de um microrganismo unicelular, com crescimendo rápido e facilmente manipulavel geneticamente. A grande maioria dos trabalhos de expressão de leveduras tem se concentrado na bem caracterizada levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, com o desenvolvimento de tecnologias do DNA recombinante, outras leveduras foram utilizadas como hospedeiro produtores de proteína recombinante, incluindo: *Hansenula polymorpha, Kluyveromyces lactis, Pichia pastoris, Schizosaccharomyces pombe, Schwanniomyces occidentalis* e *Yarrowia lipolytica* . (BUCKHOLZ E GLEESON 1991).

A maior parte dos vetores de levedura codifica a enzima envolvida na síntese de um aminoácido, sendo, por exemplo LEU2 codificadora de β-isopropil-malato desidrogenase enzima envolvida na conversão de ácido pirúvico em leucina. Para seleção dos recombinantes é necessário a utilização de clones mutantes auxotróficos com LEU2 não funcional, logo, não sobreviverão se não houver disponibilidade de nutriente no meio celular, como é o caso do uso de meio mínimo sem aminoácidos, cresceram apenas os clones possuidores do plasmídeo recombinante contendo o gene codificador LEU2 (BROWN, 2010).

Neste trabalho o vetor utilizado para expressão em *Pichia pastoris* foi o pPIC9 (Figura 6) possui origem de replicação de *E.coli* (pBR322), a região promotora do gene *aox1*, sendo o marcador de seleção o gene Histidinol desidrogenase (*HIS4*), esta marcação permite a seleção auxotróficas de transformantes, e sítio de integração no genoma da levedura. Contém sequência codificadora de ampicilina e multissítio de clonagem ao final da região codificadora do peptídeo sinal (SS), do fator-alfa de *Sacaromices cerevisiae*, logo após o terminador de transcrição de *aox1*.

1.2 *Pichia pastoris* como sistema de expressão heteróloga

O isolamento de *Pichia pastoris* se deu em 1920 por um exsudato de castanha na França, sendo descrita por A. Guilliermond como *Zygosaccharomyces pastori*. Outras cepas foram isoladas por H. Phaff, em 1956, de árvores da Califórnia, desde então, foi nomeada de *Pichia pastoris* (PHAFF 1956). Com bases nas sequências de genes ribossômicos, *P. pastoris* foi reclassificada, em 1995, para *Komagataella pastoris*, outro gênero distinto (YAMADA 1995). Atualmente são descritos seis membros do gênero Komagataella: *K. pastoris, K. phaffii, K. pseudopastoris, K. poluli, K. ulmi* e *K. Kurtzmanii* (NAUMOV, 2013), mas para os fins desta dissertação será utilizado *Pichia pastoris,* seguindo a literatura especializada.

Em 1985, foi usada como sistema de produção proteica (CREGG 1985) e atualmente tem sido amplamente utilizada como sistema de expressão alternativo, devido ao baixo custo de produção e fortes níveis de expressão, sendo utilizada para expressão de mais de 5.000 mil proteínas diferentes (SCHWARZHANS 2017). As vantagens de se usar *P. pastoris* como sistema de expressão são: a transcrição da proteína heteróloga é rigorosamente regulada por repressão/desrepressão; altos níveis de expressão podem ser obtidos, a indução é facilmente alcançada pelo acréscimo de metanol que não é tóxico para a levedura quando em concentrações controladas (CEREGHINO 2000; MACAULEY-PATRICK 2005).

Desta forma, é possível crescer a levedura em altas densidades celulares e posteriormente realizar a indução da produção de proteínas heterólogas, favorável, à produção de proteínas tóxicas para a própria levedura (DE-SOUZA, BRÍGIDO E MARANHÃO, 2016). Outra característica interesse deste sistema é a capacidade de realizar modificações pós-traducionais.

A maioria das proteínas secretadas por *P. pastoris* são glicosiladas, o que pode ou não afetar a atividade biológica da proteína recombinante. O tamanho da cadeia de carboidratos adicionados por *P. pastoris* é bem menor que aquele adicionado por *Saccharomyces cerevisiae*. A estrutura destes oligossacarídeos é muito similar à adicionada em mamíferos e, por não ser capaz de adicionar manoses terminais com

ligações α-1,3, como *S. cerevisiae*, as proteínas produzidas em *P. pastoris* são menos imunogênicas (CARMO, NEIVA e ASTOLFI FILHO, 2015).

P. pastoris utiliza metanol como fonte de carbono o gene *aox*1 que codificam Álcool oxidase, tem como produto da reação formaldeído e peróxido de hidrogênio (CREGG 1985; CEREGHINO 2000, WANG 2016). Este produto é convertido em água e oxigênio por catalases. No cromossomo da levedura existem dois genes que codificam as duas formas da álcool oxidase, *aox1* e *aox2*. Apesar de os produtos desses genes serem similares quanto as sequências e funções, a maior parte da atividade de álcool oxidade na célula é atribuída ao produto do gene *aox1*. O promotor do gene codificador de *aox1* é induzido por metanol e utilizado em diversos vetores de expressão de *P.pastoris*. Dessa forma, é possível crescer a levedura em altas densidades celulares e posteriormente realizar a indução da produção de proteínas heterólogas, favorável, principalmente, à produção de proteínas tóxicas para a própria levedura (DE-SOUZA, BRÍGIDO E MARANHÃO, 2016).

Diferentes linhagens de *P. pastoris* podem ser classificadas com relação aos fenótipos que utilizam metanol como fonte de carbono, sendo estas de três tipos normalmente nomeados: (1) Mut^{+} utiliza metanol de forma metabolicamente mais ativa; (2) Mut^{s} metaboliza metanol em taxa moderada; e (3) Mut^{-} não utiliza metanol no metabolismo celular. O fenótipo Mut^{+} possui ambos genes *aox* íntegros, enquanto, Mut^{s} possui apenas o *aox*2. Por sua vez, Mut^{-} não adquire a capacidade de utilizar metanol como fonte de carbono, por não possuir ambos genes *aox* (CREGG, 2000; WANG, 2016).

A expressão de qualquer gene em *P. pastoris* requer três etapas básicas: (1) a inserção do gene em um vetor de expressão; (2) introdução da expressão vetor no genoma de *P pastoris*; e (3) exame de potenciais cepas de expressão (CEREGHINO 2000).

1.3 Lipase: características gerais

As enzimas lipolíticas podem ser caracterizadas em três grandes grupos baseados na especificidade do substrato: lipases (EC.3.1.1.3), esterases/carboxiesterases (EC.3.1.1.1) e fosfolipases (EC.3.1.1.3). As triacilglicerol éster hidrolases (EC.3.1.1.3), usualmente chamadas simplesmente de lipases, são carboxilesterases que catalisam reações de hidrólise de ésteres carboxílicos longos (≥ 10 átomos de carbono) formando ácidos graxos livres (JAEGER e EGGERT, 2002). Além de sua característica de exercer atividade hidrolítica na interface óleo/água (CHEN *et al* 2016), quando em condições não aquosas, catalisam reações reversas como esterificação, interesterificação ou transesterificação, produzindo acilgliceróis (SALIHU e ALAM, 2012). As esterases (EC. 3.1.1.1) agem em substratos hidrofílicos e catalisam hidrólise de esterogliceróis com cadeia curta (< 10 átomos de carbono) em glicerídeos parciais e ácidos graxos. As fosfolipases catalisam a hidrólise de vários tipos de fosfolipídeos (JAEGER *et al*, 1999; TIRAWONGSAROJ *et al* 2008; PEREIRA 2011; PASCOAL *et al*, 2018). Assim, lipase catalisa hidrólise e síntese de longas cadeia de acilglicerois em reações conforme mostrado na Figura 1.

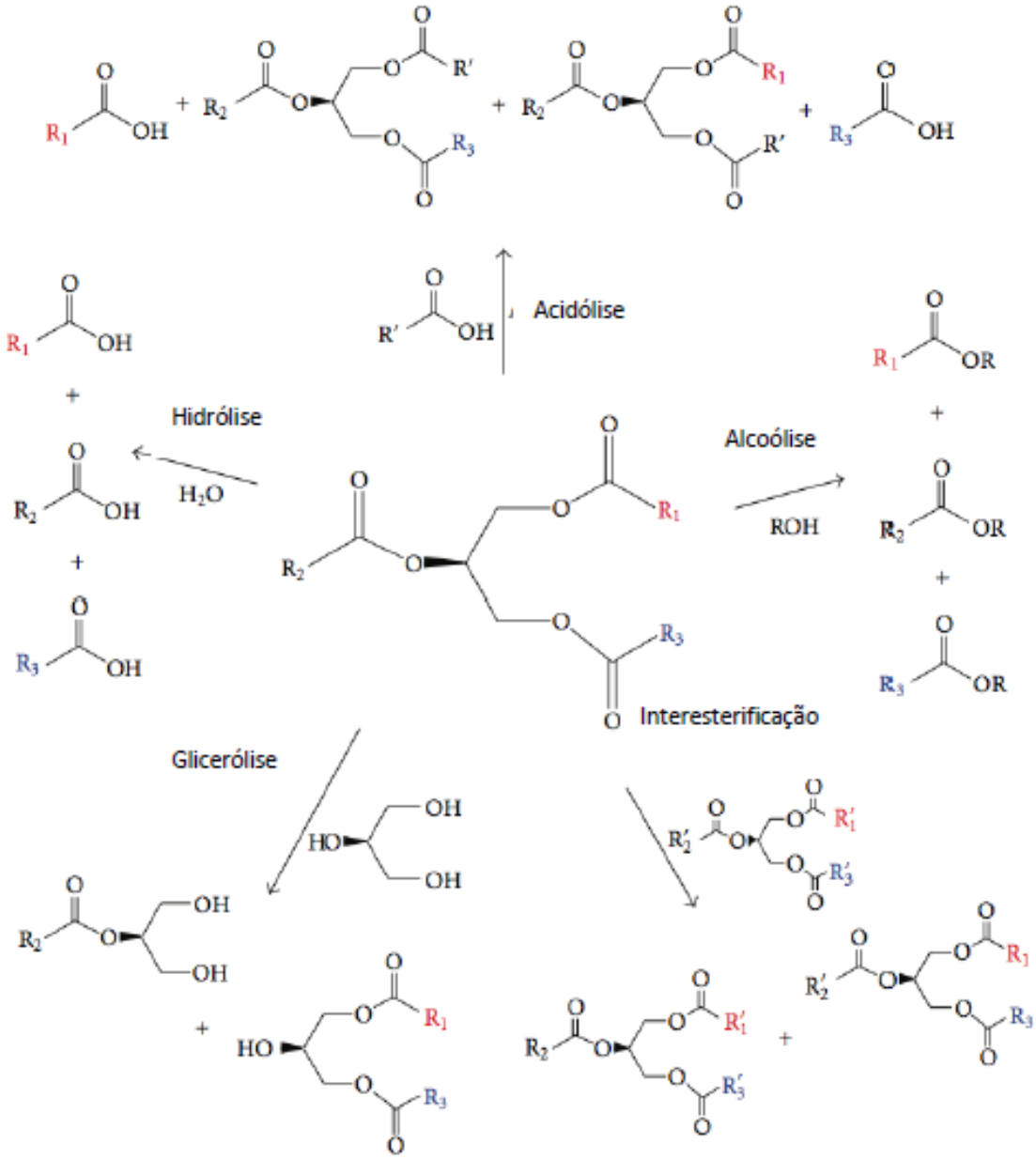


Figura 1. Representação das principais reações catalisadas por lipases. (RIBEIRO et al 2011)

As lipases são geralmente glicoproteínas, com massa molecular entre 20 a 60 kDa e ponto isoelétrico podendo variar entre 4 a 5. A faixa ótima de atividade e resistência é sob os valores de pH entre 6,0 e 8,0 e temperatura entre 30 e 40°C. No entanto, essas propriedades podem variar de acordo com a fonte ou com a isoforma de diferentes microrganismos. As lipases são enzimas hidrossolúveis que atuam no metabolismo na digestão de triacilgliceróis, desta forma as reações catalisadas por lipase ocorrem quando substrato está emulsificado (ALOULOU *et al* 2006; PASCOAL *et al*, 2018).

Esta atividade pode ser intensificada com a formação de emulsões micelares dando-se o nome de ativação interfacial ocorrendo devido a capacidade de interação interacial da enzima ao substrato agregado. Estas reações podem responder a mudança conformacional sofridas pelas lipases não podendo ser descritas por uma reação de Michaelis-Menten. (PASCOAL *et al*, 2018)

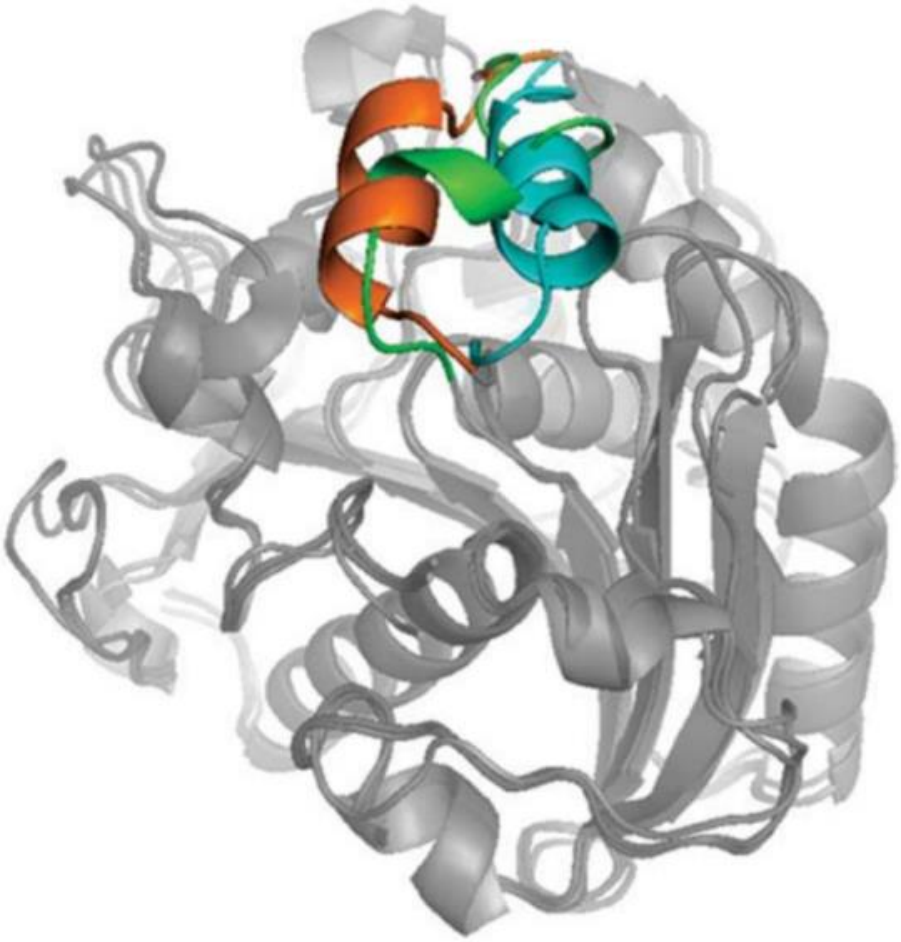


Figura 2: Representação da estrutura tridimensional de lipase mostrando os estados da *lid* (tampa) aberto e fechado. A tampa aberta está representada de laranja e a tampa na conformação fechada é representada em azul sobre o sítio catalítico (Extraído de Rehm *et al*., 2010).

Quando uma lipase na fase aquosa está abaixo do limite de solubilidade ou a ausência de/ ou em emulsão de baixa concentração de substrato, existe tipicamente uma estrutura (Figura 2) de oligopeptídeos cobrindo o sítio ativo denominada '*lid*'(tampa) que cobre o sítio ativo (WILLEMS *et al.,* 2018). Esta cobertura consiste em aminoácidos polares no lado externo e aminoácidos não polares no lado interno, em contato com o sítio ativo. É relatado que as lipases com tampa cobrindo o sítio ativo estão em conformação fechada e, na presença de uma interface formada pela lipases (emulsão) sofrem mudanças conformacionais expondo seu sítio ativo. O mecanismo de mudança conformacional é chamado ativação interfacial (*interfacial activation*) (PASCOAL *et al,* 2018)

O sítio ativo das lipases é geralmente caracterizado por uma tríade serina, histitina e um resídio ácido (ácido aspártico ou glutâmico), classificados como serina hidrolases, que são essenciais para todas as reações catalogadas por essas enzimas (TREVISAN, 2014; PASCOAL *et al,* 2018) Esta sequência conservada desempenha papel chave no mecanismo geral da reação de hidrólise em que lipases atuam clivando ligações éster presentes em acilglicerois para liberar ácidos graxos e glicerol que é realizado em várias etapas.

O mecanismo inicia por uma acilação que consiste em transferência de um próton entre os resíduos de aspartato e histidina, causando a ativação do grupo hidroxila da serina catalítica. A hidroxila da serina com aumento de nucleofilicidade ataca o grupo carbonila do substrato. O primeiro intermediário tetraédrico é formado com uma carga negativa no oxigênio do grupo carbonila. Formações de ligações de hidrogênios estabilizam a distribuição de cargas e reduz a energia do intermediário tetraédrico. Ocorre então a etapa desacilação, onde um ataque nucleofílico da enzima libera o produto e regenera o biocatalisador. O nucleófílo pode ser água nas reações de hidrólise ou um álcool nas reações de alcoólise (CASAS-GODOY *et al.,* 2012; EGGERT *et al*., 2000). O mecanismo de hidrólise é representado na Figura 3.

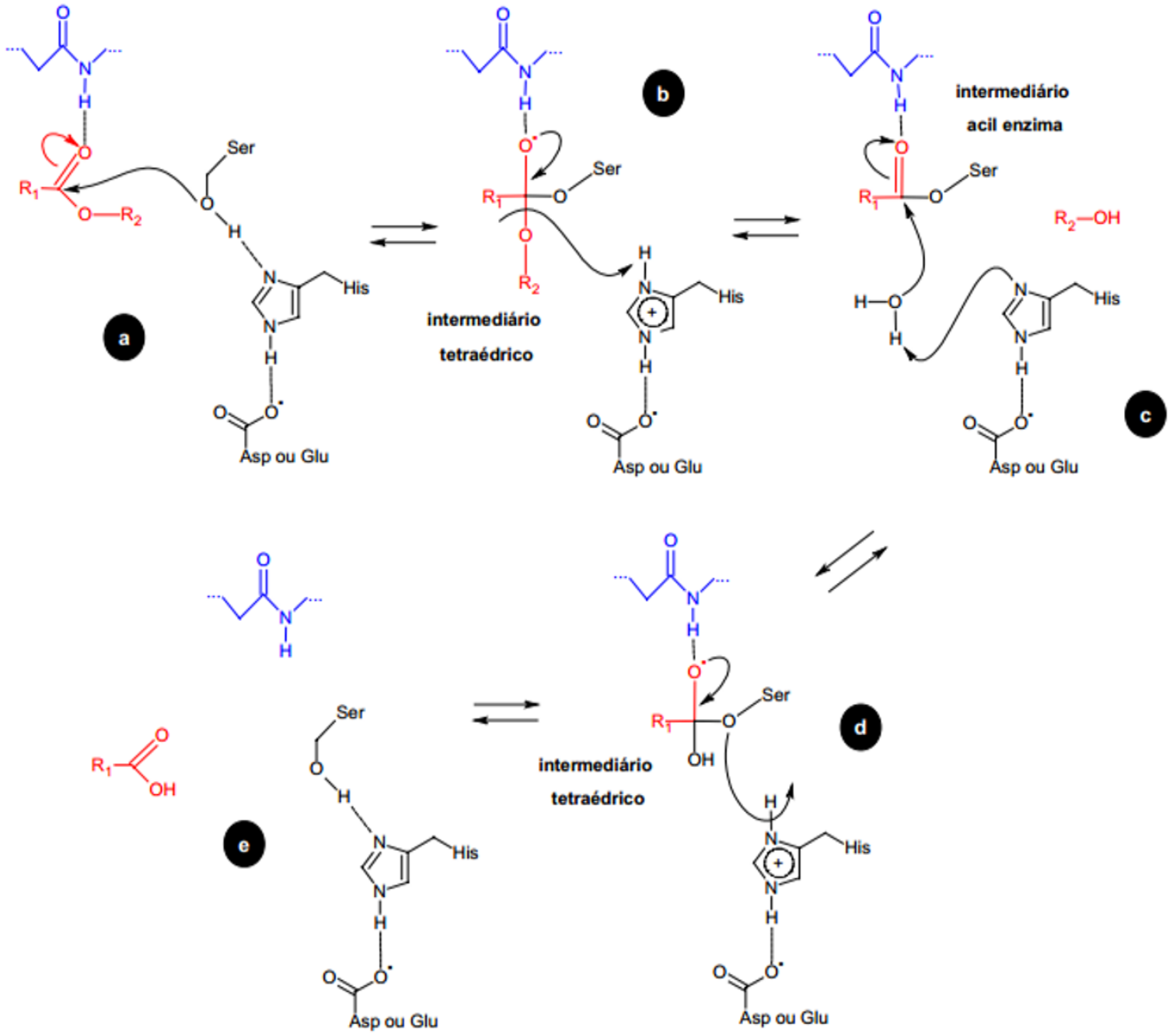


Figura 3. Mecanismo da reação de hidrólise de ligações éster catalisada por lipases. (a) ataque nucleofílico da hidroxila da serina ao carbono suscetível da ligação éster; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acila enzima e ataque nucleofílico da água; (d) intermediário tetraédrico; (e) enzima livre. Modificado de JAEGER *et al.*, 1999)

Foi observado que todas as estruturas terciárias resolvidas com lipase possuem a configuração α / β hidrolase comparando cinco enzimas com funções catalíticas distintas: dienelactone hidrolase, haloalkane dehalogenase, serina carboxipeptidase II, acetilcolinesterase de trigo e lipase de *Geotrichum candidum*. Estas enzimas, mesmo não possuindo as mesmas funções catalíticas tem semelhanças estruturais conservadas denominado dobra de α / β hidrolase. (JAEGER *et al*, 1999).

A dobra padrão consiste em uma folha central com os dois primeiros filamentos antiparalelos. As cadeiras β3 a β8 estão ligadas por hélices α, que se acumulam por ambos os lados da folha β central. A folha β tem uma torção superhelical com a mão esquerda, de modo que a superfície da folha cobre cerca de meio cilindro e a primeira e a última das cordas se cruzam no ângulo de 90°. Tanto a curvatura da folha β quanto as posições espaciais da hélice α podem variar significativamente em detrimento sua origem. A configuração das α / β hidrolases pode favorecer um arcabouço estável para os sítios ativos localizados. A tríade catalítica se posiciona da seguinte forma: Histidina após a folha β5; Serina após a folha β7; O resíduo ácido ao final da cadeia (Figura 4). Esta configuração é bastante comum, encontrada também em outras famílias de enzimas como Epóxi hidrolase microssomal. (EC3.3.2.9) e haloperoxidases (EC.1.1.1.1) (JAEGER *et al*, 1999; PASCOAL *et al* 2018).

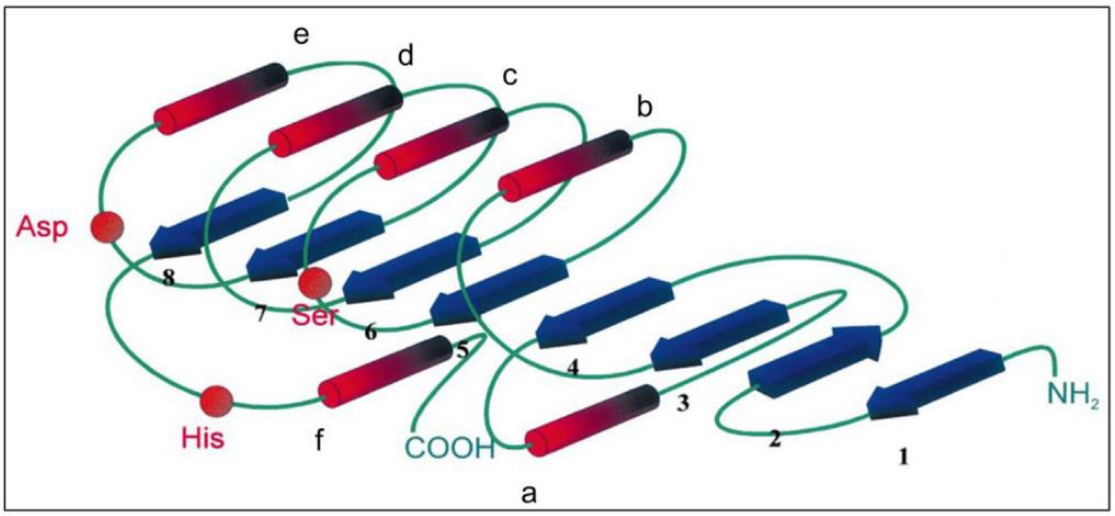


Figura 4: Representação esquemática da estrutura família de enzimas conservadas com motivos de α / β hidrolase. Os filamentos que formam a estrutura em folha plissada (1-8) são indicados por setas azuis e as estruturas em hélices α (a - f) são indicadas por colunas vermelhas. As posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica são indicadas por contas vermelhas. A região amino-terminal é indicada por NH2 no início da cadeia e por COOH para a região carboxi terminal para o final da cadeia. Extraído de PASCOAL *et al* 2018.

Com base a especificidade posicional (regioespecificidade) lipases podem ser subdivididas em três grupos: (1) as não específicas; (2) 1,3 específicas; (3) e específicas para cadeias longas. O primeiro grupo catalisa triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol mono e diglicerideos como intermediários podendo remover o ácido graxo de qualquer posição do substrato. O segundo grupo catalisam ácidos graxos na posição 1 e 3 do triglicerídeo não podendo hidrolisar ligações éster em posições secundárias. A hidrólise de diglicerídeos é mais rápida em comparação aos monoglicerídeos. O terceiro grupo catalisa ácidos graxos de cadeia longa com ligações duplas na posição cis entre C-9 e C-10. Lipases, em comparação às esterases, possuem profundidade em seu sítio ativo, sendo esta a provável justificativa da capacidade em reconhecer substratos de cadeira variada (JAVED *et al*, 2018).

O consumo de todos os monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos e ácidos graxos livres nos processos industriais produção em meios não aquosos, baixo tempo reacional e resistência a baixo pH, podendo ser escalonáveis para indústria e representam a classe mais amplamente utilizada nas aplicações biotecnológicas, devido maior atividade catalítica e fácil manipulação genética. Estas são algumas das propriedades que tornam lipases desejáveis (PASCOAL *et al*, 2018).

1.4 Aplicação de lipase

As principais enzimas utilizadas na indústria são: lipases, amilases, hemicelulases, oxidases, asparginases, lactases e proteases (SANROMÁN *et al.* 2017). Dentre estas, lipases compõe um dos mais importantes catalisadores industriais, possuindo utilidades em muitos setores. Esta vasta aplicação pode ser justifica por: (1) suas propriedades de quimiosseletividade, regiosseletividade e esteriosseletividade, (2) abundância de organismos capazes de sintetizá-la, (3) atividade de hidrólise e de síntese de acilglicerol e (4) dispensa do uso cofator nas reações (JAEGER e EGGERT, 2002).

As enzimas lipolíticas têm ganhado enorme destaque para uso industrial devido seu potencial biotecnológico, constituindo um dos grupos de maior importância em biocatálise, promovendo maior sutileza nos processos. São amplamente utilizada para síntese de diversas moléculas usadas no cotidiano, especialmente, na seletividade de drogas estequiometricamente semelhantes (ZHENG *et al.*, 2016).

Durante a síntese química de alguns compostos ocorre formação de enantiómeros, estes compostos podem diminuir ou prejudicar a eficiência de uma formulação e um medicamento, por exemplo. A resolução desta solução chama-se resolução cinética, que é a transformação da mistura racêmica em enantiopuros. Os biocatalizadores mais utilizados para resolução de misturas racêmicas são as lipases, tendo vantagens na especificidade do substrato, condições de funcionamento brando e não produz resíduos prejudiciais (TSAI *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2016).

Com a utilização de lipase, soluciona-se a catálise da reação de interesterificação, utilizada na produção de derivados de manteigas, reações de interesterificação convencional, as quais são conduzidas por adição de catalisadores químicos como sódio ou metilato de sódio, resultando maior quantidade de resíduos no produto final (HASAN *et al* 2005). O uso de lipases para indústria de sebo também têm mostrado grande vantagens. A temperatura utilizada no processo é apenas para liquefazer o sebo, reduzindo o uso de combustíveis fósseis necessário para aquecer a reação. Devido à baixa temperatura, a qualidade do produto é favorecida, por causa da pouca degradação de ácidos graxos insaturados, promovendo facilidade na purificação final (YASSIN *et al* 2003; HASAN *et al* 2005).

A produção de polímeros biodegradáveis têm atraído interesse de diferentes empresas como: BioAmber, Succinity, Reverdia e Mitsubishi. Isto se deve a crescente preocupação de novos polímeros de alta eficiência que, durante sua produção, causam menor dano à saúde humana e ao meio ambiente. Os poliésteres alifáticos são produzidos principalmente por fusão de policondensação, necessitando de catalisador organometálico e altas temperaturas (DEBUISSY *et al.* 2016). Porém, estas condições podem causar reações secundárias como: decomposição, toxicidade e poluição; especialmente devido aos compostos metálicos presente no catalisador (MAHAPATRO *et al.* 2003). Entretanto, catalisadores biológicos podem mitigar esses problemas, especialmente as lipases, as quais possuem, em meio orgânico, capacidade de formar éster, tendo um fácil controle e alto grau catalítico. Algumas enzimas são comercializadas para esses fins, como a Lipase B de *Candida antarctica* chamada de Novozym® 435, sendo um dos melhores biocatalisadores para síntese de poliésteres devido a altos rendimentos ampla especificidade de substrato e ótima estabilidade térmica (DEBUISSY *et al.* 2017).

Na indústria têxtil as enzimas são utilizadas para reduzir características indesejáveis como formação de grânulos de tecido (*pilling*), baixa capacidade de tintura, dificuldade de acabamento e carga antiestática. As enzimas mais utilizadas para modificações em fibras sintéticas são: cutinases, lipases, proteases; as quais modificam superficialmente o tecido poliéster agregando qualidade em suas características físicas (MADHU, 2017).

Outro uso é o sistema enzimático misto, no qual, são utilizadas as enzimas: proteases, lipases, celulases, xilanases ou cutinases, que em determinada combinação melhoram a hidrofilicidade do tecido sem afetar suas propriedades físicas. A combinação de proteases e lipases favorecem a diminuição de peso do tecido, e permitem a mescla entre tecidos como Lã e Nylon. Dentre estas a lipase é utilizada para diversos fins, especialmente para remover gorduras e lubrificantes naturais, aumentar a hidrofilicidade em tecidos celulósicos, auxiliar na concentração da tinta no tecido, sintetizar polímeros *in vitro*, área qual possui grande promessa biotecnológica, podendo sintetizar poliésteres, poliamidas, policarbonatos, polissacarídeos, polipeptídios, polianilanas, polifenóis, poliestireno e metacrilato (MADHU, 2017).

Atualmente o maior campo de aplicação de lipases hidrolíticas é o de detergentes, favorecendo: baixa temperatura de lavagem, redução do uso de compostos químicos e não agredindo a saúde humana. A primeira empresa a produzir lipase para este fim foi Novo Nordisk, que em 1988 purificou lipase de fungo *Thermomyces lanuginosus*, contudo não foi possível levar o processo para escala industrial. Devido à necessidade de enzima em grande quantidade, foi clonado o gene de lipase em *Aspergillus oryzae*, e comercializado em 1994, a partir disso integrando o setor de detergente (HASAN *et al.*, 2005; LANGE 2017)

1.5 Fontes de lipases

A maioria das lipases comerciais é de origem microbiana, devido à simplicidade de produção e na diversidade de fontes. A enzima foi observada pela primeira vez em 1856, por Claude Bernard analisando um extrato de suco pancreático, que hidrolisou gotas de óleo insolúvel, tornando-as solúveis. As lipases analisadas posteriormente foram isoladas de pâncreas de animais, mas diversos seres vivos as utilizam em suas funções metabólicas, como: microrganismos, mamíferos, aves (FARIHA *et al.* 2005). Microrganismos produtores de lipase têm sido encontrados nos mais diversos habitats, como resíduos industriais, indústrias de óleo, sementes de oleaginosas, alimentos em

decomposição, solo de floresta, ambiente gélido (SHARMA *et al* 2001; FAORO *et al*., 2012; KIM *et al*., 2015; PETROVSKAYA *et al*., 2016). Uma extensa quantidade de microrganismos produtores de lipase, incluindo bactérias e fungos foi catalogada (BORRELLI e TRONO 2015). Entre as fontes bacterianas, as bactérias produtoras de lipases mais bem conhecidas atualmente são: *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* (FARIHA *et al.* 2005; BORRELI E TRONO 2015).

Para acesso e exploração de lipases muitos processos tem sido otimizados com a aplicação de biologia molecular e engenharia genética (SCHICHER *et al*. 2010). Em processos modernos, genes diversos de lipases são expressados em sistemas de expressão heterólogos, principalmente em bactérias e leveduras (BOU ALI *et al*., 2014; EMOND *et al*., 2010) com grandes vantagens nos rendimentos de produção e melhorias no processo fermentativo.

1.6 Lipases bacterianas

Os procariotos possuem diferentes classes de enzimas lipolíticas que são classificadas em oito famílias distintas: Lipases verdadeiras, Lipases hormônios-sensitivas (HSL) e as famílias III, V-VIII. O resíduo serina envolvido na tríade catalítica é tipicamente um pentapeptídeo com uma sequência de consenso conservada (Gly- X- Ser-X-Gli), em que X representa qualquer um dos 20 aminoácidos. As verdadeiras lipases apresentam seis subfamílias, todas apresentando as sequências Gly-X- Ser-X-Gli conservadas.

Dentro do grupo de lipases verdadeiras, a subfamília I.1 e I.2 possuem dois resíduos de aspartato e dois de cisteína, que auxiliam na formação do sítio de ligação do Ca^{2+} e pontes de sulfeto, além de serem secretadas da mesma forma. A família II não apresenta conservação do pentapeptideo da família I, tendo uma modificação para Gly-Asp-Ser-(Leu). A família III possui dobramento α/β hidrolase exibem a tríade catalítica padrão. JAEGER *et al*, 1999; TIRAWONGSAROJ *et al*, 2008; PEREIRA, 2011; PASCOAL *et al*, 2018)

Os membros da família IV apresentam um sítio conservado em HGGG seguido do pentapepitídeo GDSAG localizado no N-terminal da proteína. A característica da família V está na similaridade estrutural a outras enzimas (halopeoxidases e epoxide hidrolases) seus blocos conservados são GXSMGG, PTLV e GH. A família VI lista esterases presentes no citoplasma bacteriano com similaridade ás lisofosfolipases de

mamíferos. O sítio ativo é um dímero tendo o dobramento α/β hidrolase em suas subunidade. Possuí a tríade catalítica em semelhança a das famílias I e II (JAEGER *et al*, 1999).

A VII família é constituída por resíduos de aminoácidos, compartilhado similaridade com Beta-lactamases. A família VIII tem semelhança comβ-lactameses tendo seu sítio ativo a constituição Ser-Xaa-Xaa-Gly. (JAEGER *et al*, 1999; TIRAWONGSAROJ *et al*, 2008; PEREIRA, 2011)

2 JUSTIFICATIVA

Uso de enzimas cresce progressivamente, especialmente em, bioenergia, bem estar, alimentação e derivados. Estima-se o lucro do setor enzimático para o ano de 2018 em 1 bilhões de dólares, com crescimento de 8% ao ano (SANROMÁN *et al*. 2017). Esta crescente demanda requer novos produtos pautados em bioprospecção na biodiversidade global.

Se tratando de diversidade biológica, a Amazônia é o maior centro de busca do planeta (ANTONIO, 2007). Logo, foco do presente estudo está na análise do gene de lipase oriundo de metagenômica de Terra Preta de Índio, área de grande diversidade biológica na Amazônia, o qual, paradoxalmente ao solo amazônico, é extremamente rico em nutrientes, favorecendo a diversidade bacteriana, e, consequentemente, a possibilidade de encontrar novos produtos biotecnológicos (TEIXEIRA *et al.*, 2009). A produção de biomoléculas de alto nível, requer uma eficiente expressão dos genes correspondentes para cada hospedeiro, mas exige, da mesma forma, conhecimento detalhado do mecanismo de ação molecular, aplicando em novos métodos e técnicas para benefício social (JAEGER 2002).

A demanda por biomoléculas é crescente no mundo atual, tornando-se necessário a prospecção, identificação e caracterização de genes capazes de sintetizar compostos moleculares de interesse biotecnológico (MOTA, 2015). Desta forma, lipase que constitui o grupo mais importante em biocatalisadores para aplicações biotecnológicas realizando diversas reações e beneficiando vários setores industriais, (GANDHI 1997, JAEGER *et al* 2002, SALIHU 2012, BANSODEC 2017), assume um papel diferenciado de outras moléculas. Sendo assim, o presente estudo visa a clonagem, produção e caracterização de lipase recombinante em *Pichia pastoris*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Expressar em *Pichia pastoris* uma lipase bacteriana isolada de uma Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio e determinar suas propriedades catalíticas.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar o gene de lipase bacteriana de uma Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio previamente construída;
- Subclonar o gene de lipase no vetor de expressão e secreção pPIC9 formando o cassete de expressão de lipase para transformação de *P. pastoris;*
- Integrar o cassete de expressão em *P. pastoris* para produção de lipase ativa;
- Analisar o efeito do pH e da temperatura na função catalítica da enzima recombinante;
- Caracterizar a cinética de conversão do substrato p-nitrofenil palmitato e os parâmetros cinéticos aparentes Km_{ap} e $Vmax_{ap}$.

4 MATEIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foi produzida lipase rastreada em uma biblioteca metagômica previamente construída e seqüenciada no Laboratório de Tecnologia de DNA da Universidade Federal do Amazonas. O gene de lipase (gene *lip*) contido na biblioteca que teve sua sequencia determinada via sequenciamento de DNA metagenômico foi isolado por PCR e subclonado em um vetor de expressão e secreção funcional na levedura *P. pastoris* para a produção de lipase recombinante ativa.

4.1 Estudos da sequência de aminoácidos da proteína codificada.

A sequencia nucleotídica do gene *lip* predita na análise do sequenciamento da biblioteca metagenômica foi traduzida para sequência de aminoácidos utilizando a plataforma de bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no sitio (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) na modalidade BLASTN e BLASTP para previsão do possível organismo de origem. Para predição da massa molecular e ponto isoelétrico foi utilizado a ferramenta ExPASy (http://web.expasy.org/translate/) no domínio *Transaltion tools.* Para predição de possíveis pontos de glicolização se deu Servidor NetOGlyc 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0)

4.2 Isolamento do gene de lipase da biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio

O gene lip proveniente de uma biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio, clonado em vetores fosmídios (Copy Control^{TM} Fosmid Library Production EPICENTRE Biotechologies) foi isolado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com a utilização de *primers* específicos projetados a partir da análise do seqüenciamento de DNA da biblioteca.. Este par de *primer* possibilita a amplificação da sequência estrutural do gene de lipase com aproximadamente 1100 pares de bases flanqueadas por um sítio de restrição da endonuclease *Eco*RI (GGATTC) em sua extremidade 5’ e pela sequência de reconhecimento da endonuclease de corte raro *Not*I (GCGGCCGC) na extremidade 3’. Para o isolamento do gene de lipase da biblioteca metagenômica foi utilizado os iniciadores PLip F (5’ GACGAATTCATATGTGGATCCGCGTGACGT 3’) e PLip R (5’GACGCGGCCGCTTACTATGGGCAATCGGATACCG 3’)

Para amplificação do gene de lipase, a reação de PCR foi realzada em volume final de 50 µL em sistemas contendo 20 ng de DNA fosmidial (molde para amplificação), tampão 1X, 1 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 pmol de cada iniciador (*PLip*F e *PLip*R), 5,0 U de enzima Taq DNA polimerase *High-Fidelity*, completando o volume final com H_2O deionizada. A reação foi iniciada com temperatura de 95C por 1 min para desnaturação inicial, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 68°C por 2,5 minutos, por fim um ciclo de 5 minutos a 68°C. Para confirmar a amplificação, o produto de PCR foi resolvido em gel de agarose (0,8%), para separação dos amplicons corados com brometo de etídio 0,5 μg/mL e visualizados em luz ultravioleta (UV) 312 nm.

Após a amplificação da região estrutural do gene de lipase, o material amplificado foi purificado para eliminação de reagentes da PCR e eventuais sequencias inespecíficas. As amostras foram separadas em gel de agorese, a banda de DNA referente ao gene lip foi cortada do gel e purificada seguindo o protocolo do *Kit Illustra* ™ *GFX* ™ *PCR DNA and Gel Band Purification.* O gene lip purificado foi posterormente clonado no vetor pGEM-T.

4.3 Ligação do gene de lipase no vetor de clonagem pGEM-T

Para a clonagem da sequência codificadora de lipase foi utilizado o vetor comercial pGEM-T (pGEM®-T Vector Systems - Promega Corporation) para clonagem direta de insertos de DNA obtidos a partir da amplificação por PCR, como se observa na figura 5.

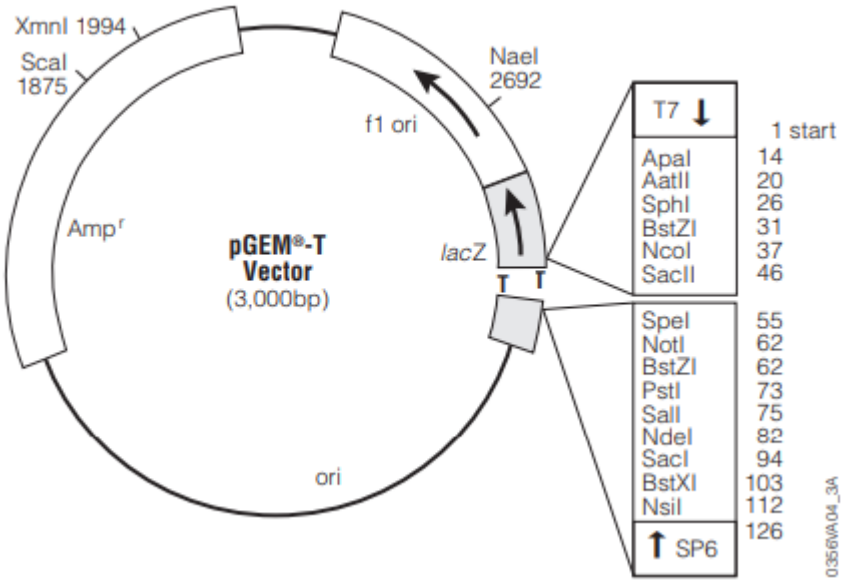


Figura 5: Mapa do vetor pGEM-T. O vetor é uma sequência linear de 3,0 kb, possuindo em cada uma de suas extremidade 3'uma desoxitimidina (T). Esta configuração é adequada para ligação do produto de PCR que possui em suas extreminadades 3' uma única desoxiadenosina (A).

Para a ligação, o gene lip foi previamente quantificado em massa (ng) de DNA por espectrofotometria para garantir a relação molar 3:1 (inserto/vetor) utilizando a Equação 1 para a determinação da concentração (ng) de amplicons utilizados na reação:

$$[inserto] = \frac{[V] * Kb\ inserto}{Kb\ de\ Vetor} * \frac{3}{1}$$

Eq. 01

Sendo:

[V] = concentração do vetor (ng);

Kb Inserto = quantidade de bases gene de lipase purificado (kb);

Kb Vetor = quantidade de bases de vetor (Kb).

[I] = concentração do inserto (ng)

No procedimento de ligação enzimática foram utilizados 50 ng de vetor pGEM-T, 60 ng de gene lip e 1U enzima T4 DNA ligase em uma reação com volume final de 10 µL incubada a 16 ºC durante 18 horas. O vetor pGEM-T com gene lip ligado em seu sítio de clonagem foi utilizado para transformação genética da bactéria *E. coli* DH5α para replicação do vetor de clonagem.

4.4 Preparo de *Escherichia coli* DH5α eletrocompetentes para transformação genética

Uma única colônia isolada de *E.coli* DH5α (F^- φ80 *lac* ZΔM15 Δ (*lac* ZYA-*arg* F) U169 *rec* A1 *final* A1 *HSD* R17 (R_K^-, m_K^+) *pho* Um*sup* E44 λ^- *thi* -1 *Gir* A96 *rel* A1) foi inoculada em 5 mL meio de cultura LB líquido e incubado no *shaker* sob agitação de 150 rpm, a 37°C, *overnight.* O volume de 1 mL desta cultura foi inoculado em 200 mL de meio LB mantendo em agitação até a densidade óptica 0,6 ($O.D_{600nm}$). Ao atingir o crescimento necessário, o frasco foi mantido no gelo por 30 minutos para desaceleração metabólica, seguido de fracionamento em tubos falcon (estéril) de 50 mL para centrifugação em 3.500 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram cuidadosamente ressuspendidas em 10 mL de glicerol 10% gelado e estéril. Este processo de lavagem foi repetido por mais 3 vezes, onde o *pellet* celular foi ressuspendido em 1 mL de glicerol 10%, aliquotadas em microtubos no volume de 80 µL e utilizadas no procedimento de transformação genética.

4.5 Transformação e seleção das bactérias recombinantes

Em uma cubeta de eletroporação gelada, transferiu-se 80 µL de *E.coli* eletrocompetentes, misturadas com 2 µL do produto de ligação (pGEM-T/lip). A cubaeta foi transferida para um eletrporador e aplicada uma tensão elétrica de 1900 mvolts. As células foram ressuspensas em 1 mL de meio LB liquido, e após a devida homogeneização, incubadas sob à rotação de 150 rpm, 37° C durante 60 minutos. O plaqueamento em meio LB sólido foi feito com ampicilina 100 µg/ml, espalhando volumes de 25 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL de concentrado celular, deixando na estufa a 37 °C por 18 horas. As colônias transformantes foram selecionadas pelo método de suas etapas e utilizadas para a recuperação do vetor de clonagem com lipase por método convencional (*home made*) de extração DNA plasmidial.

4.6 Extração plasmidial (pGEM-T/Lip)

Para extração plasmidial de células bacterianas em pequena escala foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook *et al*., (1989) com adaptações. Células transformantes de *Escherichia coli* foram crescidas em 5 mL de meio LB, durante 16h a 37°C, seguido por centrifugação de 3 mL de cultura a 10.000 rpm por 5 minutos descartando o sobrenadante. Ao *pellet* celular foi adicionado 200 µL de solução I (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM pH 8,0) usado para suspensão celular, e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. A esta suspensão foi acrescentado 360 µL de solução II (NaOH 0,2 M e SDS 1%), misturando por inversão o microtubo a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi acrescentado, 300 µL de solução III (acetato de potássio 3 M, pH 5,8), seguido de agitação no *vortex*, e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados à velocidade de 10.000 rpm por 5 minutos à 4 °C, logo, o sobrenadante, foi ser transferido para outro microtubo, onde 750 µL de isopropanol foi adicionado, e a solução homogeneizada por inversão, e incubado a temperatura de freezer por 1 hora, seguido por centrifugação de 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sistema centrifugado por 5 segundos à 10.000 rpm. O restante de isopropanol foi retirado com uma micropipeta, e o sistema deixado secar a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspendido com 200 µL de TE e adicionado 110 µL de acetato de amônio (7,5 M) e misturado com agitação em *vortex*. O sistema foi centrifugado à temperatura ambiente por 10 minutos à 10.000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo e acrescentado 750 µL de etanol 100%. O sistema foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante descartado. Removendo o excesso de álcool com a micropipeta o sistema foi deixado secar por 5 minutos. Seguido pela re-hidratação com álcool 70% e centrifugado a 10.000 rpm e deixado secar para retirar todo excesso de etanol. Por fim, o precipitado foi ressuspendido em 50 µL de TE e resolvidas em eletroforese em gel de agarose.

4.7 Digestão do vetor de clonagem e recuperação do inserto

Na análise de restrição, foram usadas as endonucleases de restrição *Eco*RI e *Not*I, que flanqueiam o gene de lipase clonado no vetor pGEM-T. A observação da liberação de um fragmento de aproximadamente de 1100 pb, correspondente ao gene de lipase, confirma a clonagem e possibilita o isolamento do gene para subclonagem no vetor de expressão em *P. pastoris*. A reação de digestão foi realizada utilizando 60 ng de vetor pGEMT-Lip, 0,5 U de cada enzima de restrição em tampão 1x. A reação foi incubada durante 2 horas a 37 ºC e analisada em gel de agorase 0,8%.

O fragmento correspondente ao gene de lipase liberado após clivagem enzimática foi purificado e recuperado utilizando o *ilustra* ™ *GFX* ™ *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). O gene lip purificado foi ligado no vetor de expressão pPIC9 nos sítios das enzimas *EcoRI e Not*I.

4.8 Ligação do gene de lipase no vetor de expressão e secreção pPIC9

O vetor utilizado para expressão em *Pichia pastoris* foi o pPIC9 (Figura 6). Um vetor de expressão e secreção, integrativo, bifuncional, possui origem de replicação em *E.coli* (pBR322), marcador de seleção auxotrófica his4, esta marcação permite a seleção de transformantes de *Picha pastoris* que é HIS defectiva.

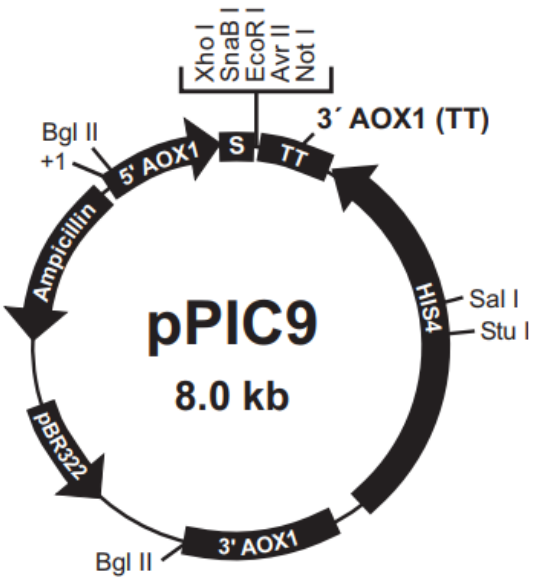


Figura 6: Mapa do vetor de expressão secreção pPIC9. O vetor de expressão é composto por promotor *aox1*, sequência codificadora do peptídeo sinal (S) para secreção da proteína recombinante, múltiplo sítio de clonagem, terminador (TT) do gene *aox1*, o gene de histidinal de desidrogenase (HIS4) como marca de seleção, a região homóloga 3'*aox1* para integração em *P. pastoris*, origem de replicação bacteriana (pBR322), marca de seleção dominante em bactéria (ampicilina) e dois sítios da endonuclease *Bgl* II flanqueando o cassete de expressão

Para ligação da sequência codificadora de lipase no vetor de expressão e secreção foram utilizados 20 ng de vetor pPIC9, 26 ng de gene lip, 5 mM de ATP, 1 U de enzima T4 DNA ligase em tampão 1x. O sistema de ligação foi incubado a 16°C por aproximadamente 18 horas.

Após a ligação, as moléculas recombinantes, pPIC9/lip, foram inseridas em células da bactéria *E. coli* Dh5α por transformação genética e recuperadas por extração de DNA plasmidial. Após a extração plasmidial, foi realizada digestão do vetor de expressão e secreção com *Eco*RI e *Not*I para confirmar a subclonagem do gene de lipase a partir da visualização da liberação de fragmentos de DNA de aproximadamene 1100 pb correspondente ao gene lip.

4.9 Linearização do vetor de expressão e secreção de lipase para transformação de *Pichia pastoris*

Para a transformação genética de levedura, o vetor pPIC9/lip foi linearizado para sua integração no genoma da hospedeira. A reação foi realizada utilizando 10 µg de vetor pPIC/lip, 10 U de enzima de restrição *Bgl II* em tampão 1x. A reação se deu a 37 °C, por 3 horas.

Para concentrar o DNA utilizado na transformação de *P. pastoris* e eliminar impurezas, se utilizou o protocolo de precipitação por etanol conforme Sambrook *et al*.,(1989) com adaptações. A precipitação do cassete de expressão foi realizada pelo acréscimo de 100 µg de glicogênio; 1/10 do volume de NaCl 3 M; 2,5 x o volume de etanol P.A. As amostras foram incubadas a 4 °C por 4 h, seguido de centrifugação por 60 min a 4°C 1000 g. O sobrenadante foi descartado por inversão, e as amostras, lavadas com etanol 70%, seguido de centrifugação nas mesmas condições por 30 min. O sobrenadante foi descartado e, as amostras, incubadas a temperatura ambiente. Ao final, o *pellet* foi ressuspendido com 5 µL de água deionizada, eluindo '*over night'* a 37 °C e utilizado na rasformação da levedura eletrocompetente.

4.10 PCR analítica do vetor de expressão

Para sustentar o resultado da integração do gene lip no vetor de expressão foi necessário a realização de uma PCR analítica. A PCR foi distribuída para o volume final de 25 µL sendo 1 X Tampão, 1 mM de MgCl; 0,2 mM de Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP); 0,2 U de cada Primer; 2 U de Taq DNA polimerase e 20 ng de DNA. A programação da reação de polimerização foi de 1 minuto para desnaturação

inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 68°C por 2,5 minutos, ao fim, 5 minutos a 68°C de extensão final

4.11 Preparo de *Pichia pastoris* GS115 eletrocompetente e tranformação genética

A transformação de *P. pastoris* iniciou com preparo de células eletrocompetentes. Uma colônia isolada da levedura foi inoculada em 5 mL de meio YPD (20 g/L de peptona, 10g/L de extrato de levedura, 2% glicose), por 24 h a 30 °C sob agitação de 200 rpm. O volume de 1 mL foi transfarida para 200 mL de meio YPD mantido sob agitação constante de 200 rpm a 30 ºC até atingir $O.D_{600}$ de 1,5. A cultura foi mantida no gelo durante 30 minutos para diminuir o metabolismo da levedura e aclimatação. As células em cultura foram transferidas para tubos Falcon e centrifugadas a 7000 g por 10 min a 4 °C, e ressuspendidas com 25 mL de água gelada estéril. A lavagem com água foi repetida por mais 3x. As células foram ressuspendidas em 10 mL de sorbitol gelado a 1 M, centrifugadas novamente e ressuspendidas com 2 mL de sorbitol. Alíquotas de 80 µL foram transferidas para microtubos e utilizadas para transformação genética de levedura por eletroporação.

A eletroporação da hospedeira para integração do cassete de expressão em seu genoma foi realizado utilizando 10 µg de vetor de expressão pPIC/lip linearizado em 80 µL de células de *P.pastoris* GS115 eletrocompetentes. Após a mistura, o sistema foi mantido no gelo por 5 min, e então, transferido para cubeta de eletroporação com 0,2 cm gelada. As condições do eletroporador foram de 1500 mV, 400 Ω, 25 µF. Imediatamente após a aletropraração as células foram recuperdas em 1 mL de sorbitol gelado a 1 M e espalhadas em placas com meio MD sem histidina (2% de glicose, 1,34% de YNB, 4x10-5 de Biotina, 15 g/L de Agar), estas foram incubadas a 30°C durante 36 horas para o crescimento de clones transformantes.

A seleção das recombinantes se deu por auxotrofia, visto que as cepas de *Pichia pastoris* GS115 não possuem o gene de histidina (his defectiva) e não são capazes de crescer no meio MD (*Minimal Dextrose Medium*) sem aminoácidos. Crescerão apenas hospedeiras possuirem o cassete de expressão do pPIC9 integrado no cromossomo restabelecendo a síntese do amoniácido histidina.

4.12 Análise da integração do gene lip no genoma da levedura

Após a seleção por auxotrofia foi realizada a confirmação da recombinação nos clones selecionados. Para este propósito foi extraído o DNA total de *P.pastoris* e utilizado como molde para determinar a integração do gene lip por PCR.

Para a extração do DNA total de levedura, os clones transformantes selecionados em meio MD foram transferidos para 5 mL de YPD e as culturas foram incubadas na estufa de rotação orbital a 30 °C por 20 h. A massa celular foi recuperada por centrifugação e ressuspendida em 500 µL de tampão H (2% Triton X-100; 1% SDS; 100 mM; NaCl; 10mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA). A suspensão foi incubada no gelo por 2 min e imediatamente levada ao banho-maria a 95 °C por 1 min, repetindo este procedimento de choque térmico 5x para rompimento celular. Em seguida foi acrescentado 200 µL de clorofórmio e misturado em rigorosa agitação por 2 min, seguido de centrifugação durante 5 min a 12000 rpm. O sobrenadante foi recuperado, acrescentando 400 µL de etanol, P.A gelado, misturado por inversão. As amostras foram incubadas a -20 °C por 15 min e centrifugadas a 12000 rpm por 10 min, a temperatura ambiente, o sobrenadante foi removido e o *Pellet* incubado a temperatura ambiente para secar e eluido em 25-50 µL de TE. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de agorase 0,8%, quando necessário, foi acrescentado 1 µL de RNAse e incubado a 20 min a 37 °C.

Para amplificação do gene lip o DNA extraído foi diluido 1:60 e utilizadado na PCR. Nestas reações foi utilizado o par de *primers* do vetor pPIC9 que anela em regiões que possibilitam amplicar o gene de interesse definindo em quais clones o cassete de expressão foi integrado ao genoma da levedura.

A PCR foi distribuída para o volume final de 25 µL sendo 1 X Tampão, 1 mM de MgCl; 0,2 mM de Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP); 0,2 U de cada Primer; 2 U de Taq DNA polimerase e 1/60 de DNA diluído. A programação da reação de polimerização foi de 1 minuto para desnaturação inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 68°C por 2,5 minutos, ao fim, 5 minutos a 68°C de extensão final.

4.13 Produção de lipase recombinante

4.13.1 Seleção dos clones produtores de lipase funcional

A seleção de clones recombinantes produtores de lipase ocorreu por cultivo em meio seletivo com substrato da enzima para triar atividade enzimática. Os meios complexos utilizados foram: BMGY -*Buffered Glycerol Complex Medium*- (YNB 1,34%, Glicerol 1%, Fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, Biotina $4x10^{-5}$, ágar 15 g/L um meio tamponado contendo glicerol, próprio para aumento da massa celular e o meio BMMY -*Buffered Methanol Complex Medium*- (YNB 1,34%, metanol 0,5%, Fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, Biotina $4x10^{-5}$, ágar 15 g/L) suplementado com 1% tributirina como substrato para revelar a atividade hidrolítica. Esta indução ocorre pela presença do metanol que ativa o forte promotor *aox1* da levedura.

4.13.2 Indução dos clones recombinantes para produção de lipase em fermentação submersa

A produção de lipase por meio da indução da expressão gênica em *P. pastoris* se deu pelo crescimento das células em 50 mL meio BGMY líquido para aumento da massa celular até atingir 2-6 $O.D_{600}$ ao longo de 24 horas. Após atingirem a $O.D_{600nm}$ necessária, as culturas celulares foram centrifugadas a 1000 g por 10 minutos e ressuspendidas em 100 mL de meio BMMY para iniciar o cultivo e indução com 1 $O.D_{600nm}$. Os frascos de foram incubados a 30 °C sob agitação de 200 rpm e acrescentado a cada 24 h, 0,5% de metanol utilizado para indução pela ativação do promotor *aox1*. A indução foi conduzida durante 72 h, as células foram separadas do sobrenadante de cultivo (caldo enzimático) por centrifugação. Aliquotas do caldo enzimático foram utilizadas para realização de eletroforese em gel denaraturante e ensaios enzimáticos para quantificar a atividade catalítica de lipase recombinante.

4.12.3 Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE

4.12.4 Precipitação de proteínas extracelulares no sobrenadante e cultura

As culturas de *Pichia pastoris* induzidas a expressão foram centrifugadas por 10 minutos a 6 000 g, 4 ºC, recuperado 2 mL de sobrenadante ao qual foi acrescido ácido tricloroacético (TCA) na concentração de 10%. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C, e centrifugadas sob as condições de 10 minutos, 4 °C, 10 000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 20 µL de Água Milli-q. Adicionou-se 1 mL de acetona (-20°C) seguido de incubação *overnight*, a -20 °C.

A amostra foi centrifugada durante 10 minutos, 4 °C, 10 000 g, e o sobrenadante descartado. O *pellet* de protenas após secar em temperatura ambiente foi ressuspendido em 50 µL de tampão de amostra (2x).

4.14 Caracterização enzimática de lipase recombinante produzida por *Pichia pastoris*.

4.14.1 Caracterização da lipase recombinante

Os ensaios foram realizados em triplicatas para determinar os parâmetros catalíticos e cinéticos da lipase recombinante.

4.14.2 Reação de hidrolise em fase aquosa (adaptado de Kumar *et al* 2012)

Atividade da enzima foi determinada por espectrofotometria utilizando para-nitrofenil palmitato (p-NPP) como substrato, o qual com a hidrólise da ligação éster apresenta cor amarelada em pH básico, podendo ser medida em 410 nm. O ensaio se deu com 100 µL de caldo enzimático bruto e 300 µL de tampão fosfato (50 mM; pH 8,0) e 100 µL de p-NPP (10 mM). A mistura foi incubada a 50 °C durante 15 minutos, e paralisada em etanol P.A e analisada em 410 nm. O controle foi o clone de *P. pastoris* sem o gene recombinante. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 µmol de p-NP em um mL de reação em um minuto sob condições padrões.

4.14.3 Efeito do pH sobre a atividade enzimática de lipase

O pH ótimo foi determinado pela adição em tampões com diferentes valores de pH. Foi utilizado o tampão citrato-fosfato (Na_2HPO_4 0,2 M; ácido cítrico 5 mM) com pH variando entre 3,0 a 8,0 em intervalo de 1. O ensaio foi feito com 100 µL de caldo enzimático bruto e 300 µL de tampão citrato-fosfato pH 3 a 8 e 100 µL de p-NPP a 10 mM. A mistura foi incubada a 50 °C por 15 minutos, sendo paralisada com 1 mL de etanol. A reação foi medida no espectrofotômetro 410 nm.

4.14.4 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de lipase

A determinação da temperatura ótima de lipase recombinante foi realizada variando a temperatura das reações entre 37 °C a 90 °C. O ensaio se deu em condições padrões de espectrofotometria, utilizando o tampão no pH determinado ótimo para atividade de lipase sobre o p-NPP.

5 RESULTADOS E DISCURSÃO

5.1 Análise da sequência de aminoácidos

O resultado das analises de 1242 da sequência peptídeca no BLAST resultou em 94% de semelhança de lipase secretada de *Ralstonia eutropha* H16, atualmente renomeada como *Cupriavidus necator*. Seguido de 94,07% de identidade com a proteína hipotética de *Cupriavidus taiwanensis* e *Cupriavidus necator*. Todos dados supracitados foram inferido com alta probabilidade de não serem tidos ao acaso (*e-value 0*).

5.2 Isolamento do gene de lipase por PCR

Para clonagem do gene lip foi realizado seu isolamento de uma biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio. A sequência de aproximadamente 1100 pb codificante do gene de lipase foi amplificada utilizando como molde um fosmídeo da biblioteca como mostrado na Figura 7 I. Os produtos de PCR foram purificados para ligação no vetor de clonagem pGEM-T (Figura 7 II).

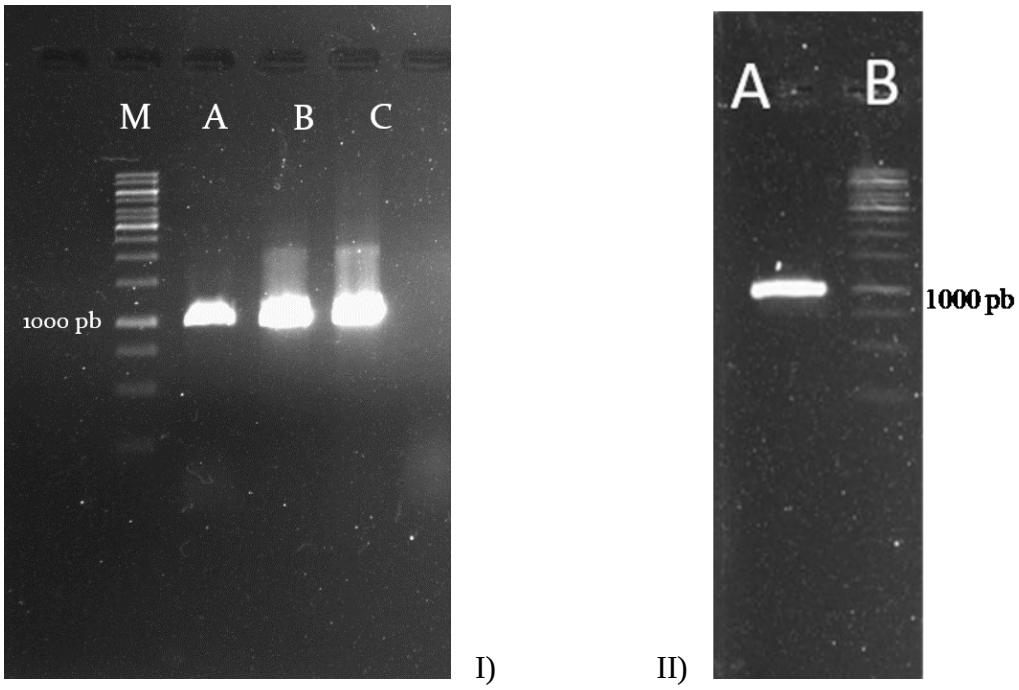


Figura 7: I e II. Perfil eletroforético de PCR em gel de agarose 0,8%. I) A, B, C = sequência codificadora de lipase amplificada com aproximadamente 1100 pb; (M) = Marcador GeneRuler ™ 1kb DNA Ladder. II) Sequência codificadora de lipase purificada após eletroforese em agarose 0,8%. (A) Inserto purificado; (B) Marcador GeneRuler ™ 1kb DNA Ladder.

5.3 Clonagem do gene lip no vetor pGEM-T

A ligação do gene lip ao vetor de clanagem resultou no vetor pGEM-T/lip (Figura 8). Após a recuperação do vetor multiplicado em *E. coli* DH5α, análise de restrião com *Eco*R I e *Not* I confirmou a clonagem do gene lip (Figura 9).

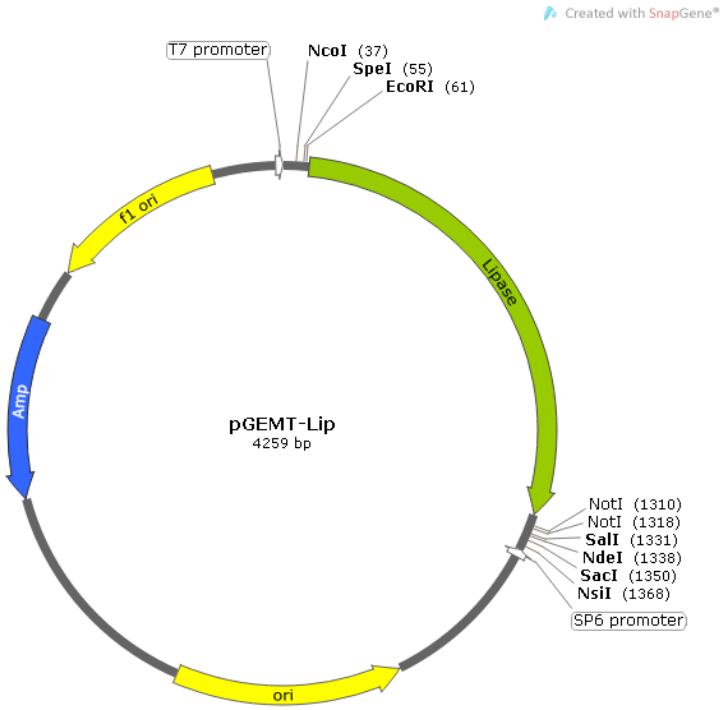


Figura 8. Esquema do mapa físico do vetor de clonagem com o gene Lip flanqueado por sítios de restrição *Eco*RI e *Not*I que foram utilizados na estratégia de montagem do vetor de expressão em *P. pastoris*

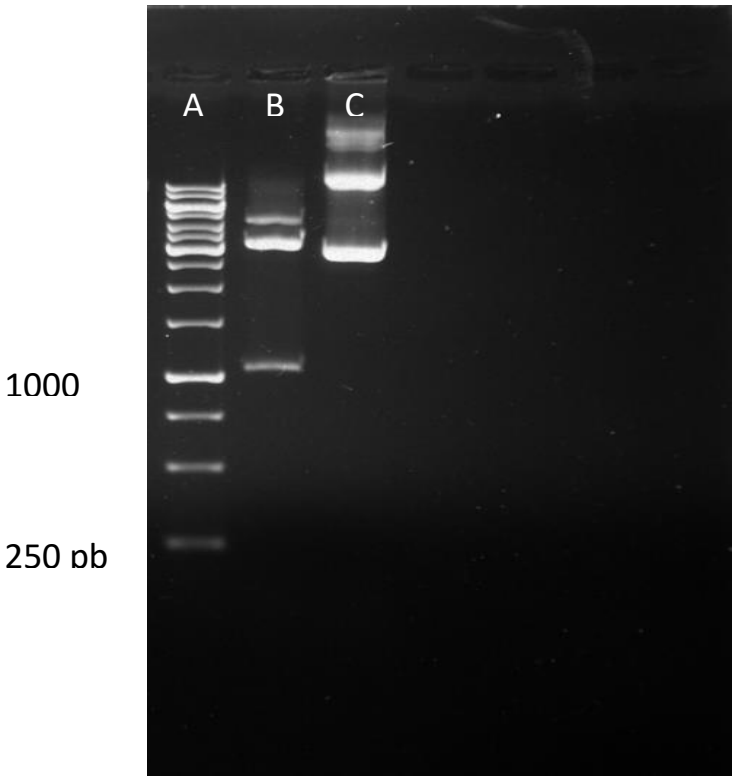


Figura 9. I) Perfil eletroforética da extração plasmidial em duplicata em gel de agarose 0,8% sendo: (A) vetor de expressão e secreção pPIC9 e (B) vetor pGEM-T com gene de lípase clonado. II) Resultado da digestão analítica do vetor de clonagem pGEM-T confirmando a liberação do inserto de lipase, sendo (A) Marcador GeneRuler ™ 1kb DNA Ladder, (B) vetor pGEM-T liberando inseto de lipase e (C) Vetor pGEM-T integro.

5.4 Subclonagem do gene lip no vetor de expressão e secreção pPC9

A partir da confirmação da clonagem do gene de lipase por liberação com clivagem pelas endonucleases de restrição, o gene foi ligado no vetor de expressão e secreção resultando no vetor pPIC/lip (Figura 10).

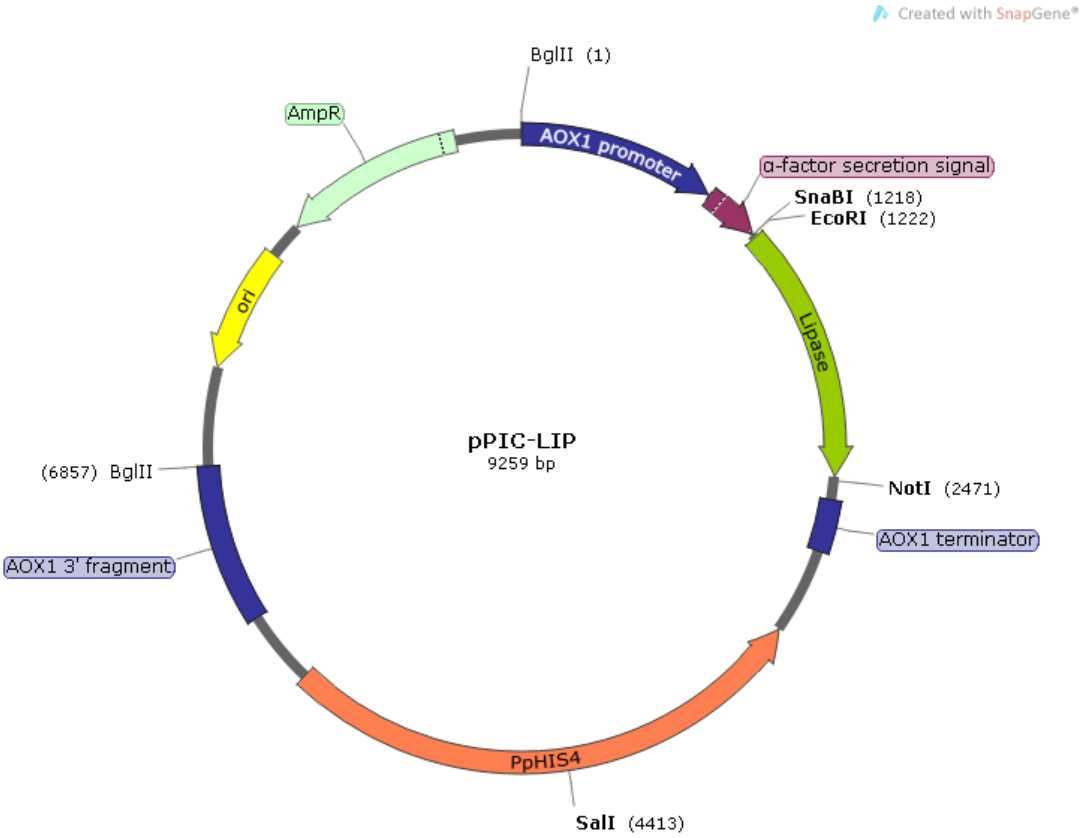


Figura 10: Esquema do mapa físico do vetor de expressão com gene Lip flanqueando o promotor *aox*1 que foi utilizado na estratégia de integração do gene recombinante ao genoma da levedura *Pichia pastoris.*

A confirmação da subclonagem do gene de lipase no vetor de expressão e secreção foi analisada, tanto por restrição com endonucleases quanto por PCR do vetor pPIC/lip. A liberação do gene lip com aproximadamente 1100 pb após a clivagem com *Eco*RI e *Not*I mostra a subclonagem no vetor de expressão (Figura 11).

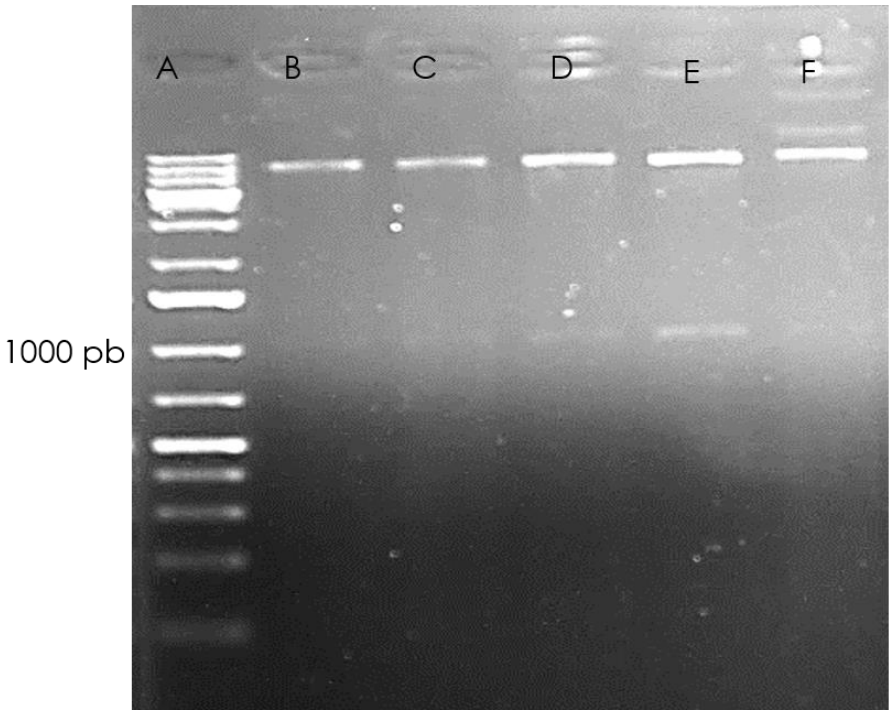


Figura 11. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do resultado da digestão analítica do pPCI9 liberando o inserto de lipase (B a F) e Marcador GeneRuler ™ 1kb DNA Ladder (A).

Para sustentar esse resultado foi realizado PCR utilizando *primers* do vetor de expressão e secreção. A amplicação do gene lip foi confirmada após a PCR do vetor pPIC/lip (Figura 12). Devido ao acréscimo de sequencia do vetor pPIC9 o fragmento amplicado possui aproximadamente 1600 pb resultante da somatória da sequência do gene lip (1100 pb) mais a sequência amplificada do vetor (500 pb), confirmando assim a presença do inserto no vetor de expressão.

Analisando a Figura 12 é possível observar nas caneletas B e C são observados amplicons a partir do vetor pPIC9 intacto onde se amplifica apenas uma porção da promotor *aox1* e região de clonagem do vetor totalizando cerca de 500 pb e, nas caneletas D, E e F são observados amplicons a partir do vetor pPIC9 com gene de glicoamilase, α-amilases e lisozima, respectivamente (controles experimental); e na canaleta G observa-se a amplicação do gene de lipase clonado no vetor de expressão.

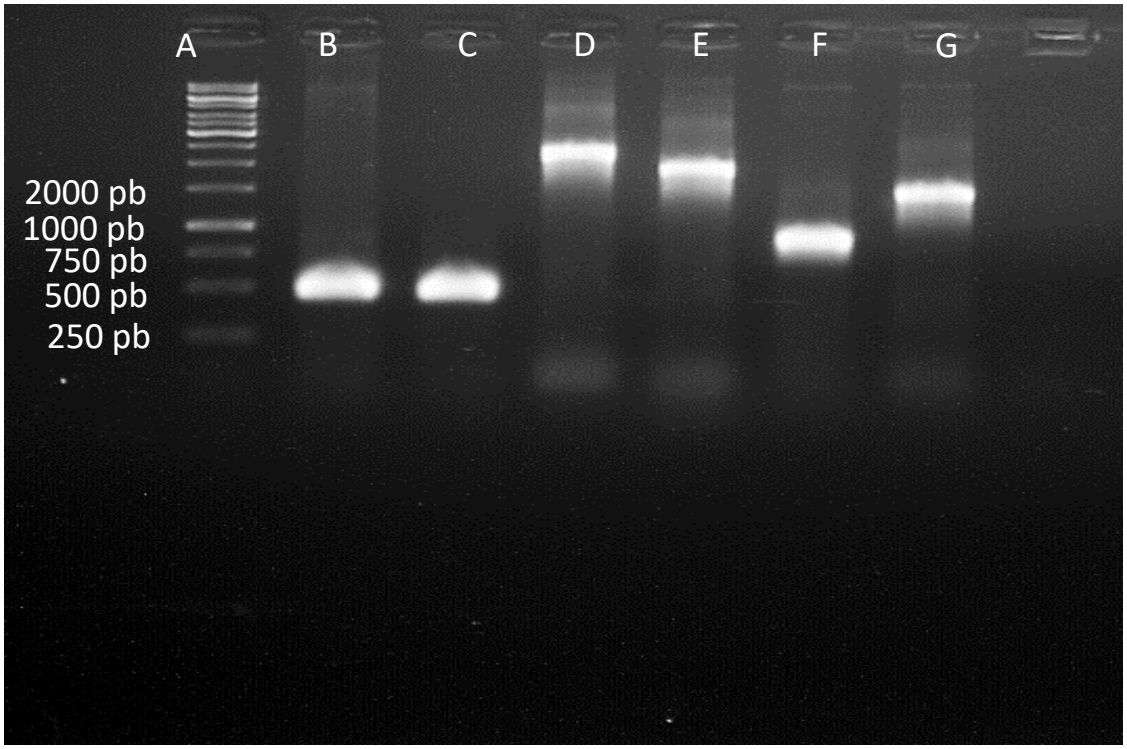


Figura 12: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para confirmar a subclonagem da sequência codificadora de lípase no vetor de expressão e secreção pPIC9. (A)= Marcador 1 kb, (B e C)= amplificação do partir pPIC9 intacto, (D)= amplicação do cassete de expressão de glicoamilase (Carmo, 2010) (E)= amplificação do cassete de expressão de α-amilase (Müller, 2007), (F) = cassete de expressão de lisozima (Souza, 2018), (G)= cassete de expressão de lípase (presente estudo).

A subclonagem do gene lip no vetor pPIC9 resultou no cassete de expressão de lipase em *P pastoris* tranformada por eletroparação para integração do cassete de expressão ao seu genoma.

A análise da integração do vetor de expressão na levedura *P. pastoris* confirmou a recombinação por meio de PCR genômica. O DNA de 20 clones transformantes é mostrado na Figura 13.

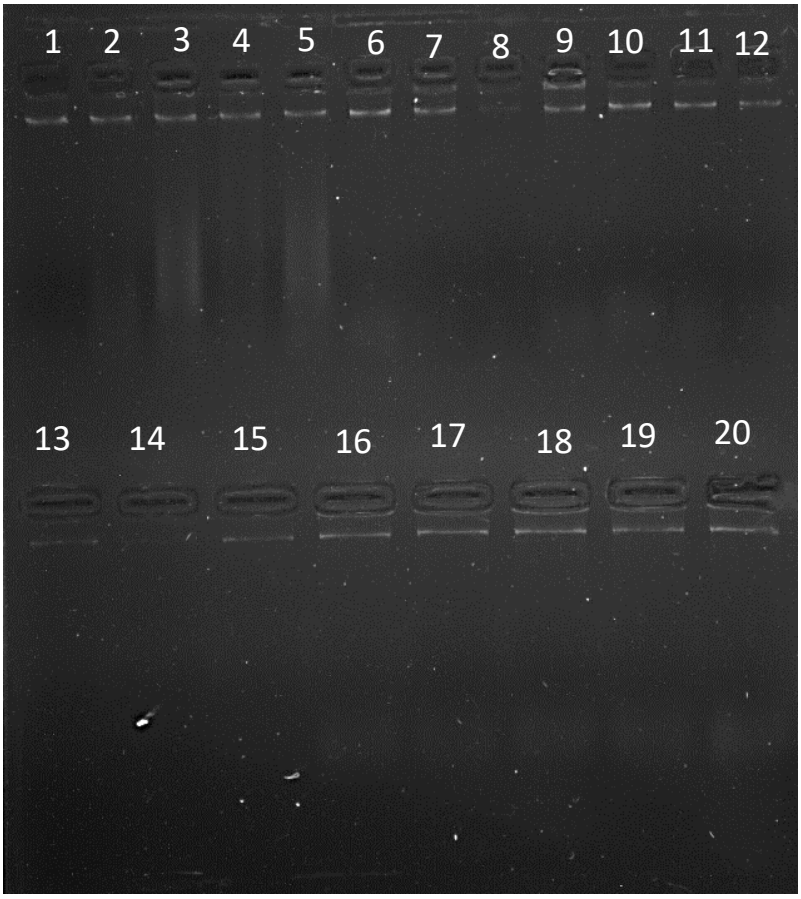


Figura 13: Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do DNA cromossomal de clones transformantes de *Pichia pastoris*. Clones de 1 a 20.

A amplicação de fragmento de DNA utlizando os primers específicos do vetor pPIC9 é mostrada na Figura 14. Ao analisar o perfil eletroforético da PCR genômica é possível visualizar a amplificação do cassete de expressão contendo o gene codificador de lipase confirmando a integração em *Pichia pastoris*.

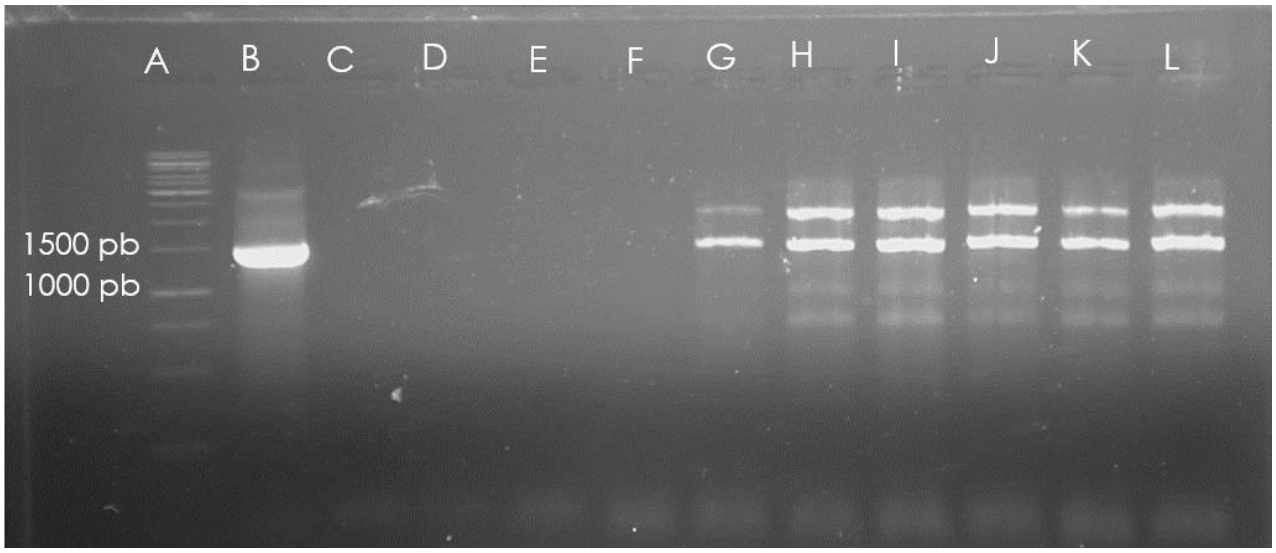


Figura 14: Perfil eletroforético de PCR analisando a integração do cassete de expressão de lípase no genoma de *Pichia pastoris*. A= Marcador de 1kb; B= amplificação do cassete de expressão de lípase a parir do vetor pPIC9 (Controle positivo); C a L= amplificação do casse te de expressão de lípase a partir do genoma da levedura (clones de 11 a 20).

5.4 Seleção dos clones recombinantes em tributirina como substrato.

Após a confirmação da clonagem por PCR, foi realizada cultura dos clones em meio BMMY- (YNB 1,34%, metanol 0,5%, Fosfato de potássio 100 mM; pH 6,0, Biotina $4x10^{-5}$, ágar 15 g/L, tributirina 1%), com acréscimo de 0,5% metanol diariamente durante 72h para seleção dos clones recombinantes, através da expressão de lipase recombinante. Os substratos mais utilizados para identificação lipolítica são tributirina que é emulsificada mecanicamente em vários meios de crescimento e vertidas em placas de Petri. A atividade lipolítica é verificada com a formação de halos claros ao redor das colônias cultivadas em placas de ágar. É possível a revelação do halo associada a emissão de Luz UV podendo ser detectada pela sombra ao redor da colônia confirmando a atividade lipolítica nos clones recombinantes como se pode verificar na Figura 15.

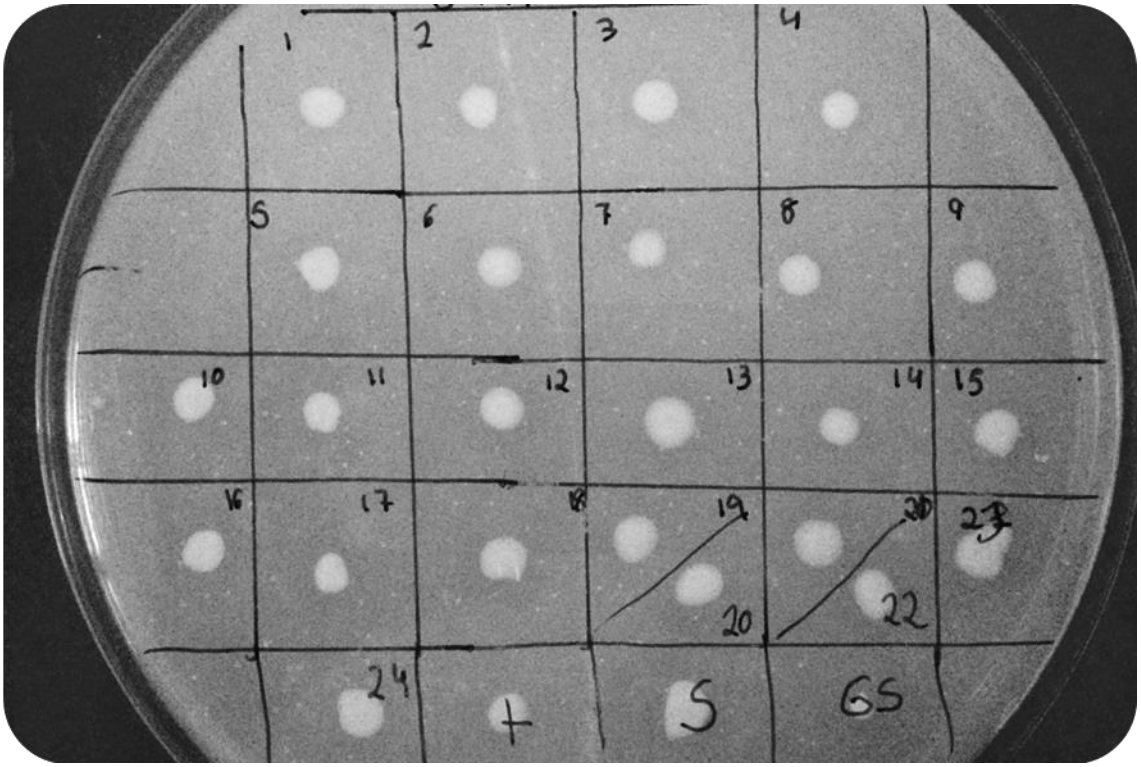


Figura 15: Seleção dos clones recombinantes em tributirina. Clones de 1 a 24= clones transformantes com cassete de expressão e secreção de lípase integrado no genoma de Pichia pastoris; += clone de fenótipo Mut + previamente selecionado (Carmo, 2010); S= clone de fenótipo Mut S (Carmo, 2010); C= Pichia pastoris GS115.

5.5 Seleção dos fenótipos Mut^+ e Mut^s dos clones recombinantes

Apôs a seleção dos clones recombinantes, foi realizada cultura dos clones em meio MM (0,5% de metanol, 1,34% de YNB, 4x10-5 de Biotina, 15 g/L de Agar) para seleção dos fenótipos. Os clones que apresentaram crescimento lento da colônia são classificados como Mut^S, sendo apresentado com massa celular menos densa e mais rarefeito, por outro lado, os que apresentam massa celular mais densa são considerados Mut^+ (Figura 16). Isto ocorre devido a diferença na integração do cassete de expressão que pode ser por deleção do gene da enzima álcool oxidase gerando clones (Mut^S) ou a adição do cassete sem perda cromossômica gerando clones (Mut^+) (CEREGHINO E CREGG, 2000). A principal diferença relacionadas a produção heteróloga está na presença ou não do gene *aox.*

Apesar do fenótipo Mut^S possuir uma menor expressão do gene *aox* muitos estudos tem mostrado que estas possuem um aumento na produção de proteínas tornando um fator interessante para futuras otimizações em biorreatores (ENGLAENDER *et al.*, 2017). No trabalho de Cos *et al*, (2005a), é possível verificar nitidamente a diferença fermentativa entre os fenótipos e a quantidade de cópias que cada um possui. Para o fenótipo Mut^+ existiu um decréscimo de atividade quando poucas cópias integraram na levedura levando ao acumulo de proteínas no interior da célula (verificando que fosfolipases podem ser toxicas quando acumuladas), por outro lado, a cepa Mut^+ *multicopy* houve um aumento exponencial de atividade. No fenótipo Mut^S o fenômeno da elevada expressão ocorre de forma contrária, tendo maior atividade quando menor número de cópias.

Dos clones recombinantes foram escolhidos três clones Mut^+ e três Mut^S, sendo 14, 19 e 23 (Mut^+) e 17, 21 e 24 (Mut^S)

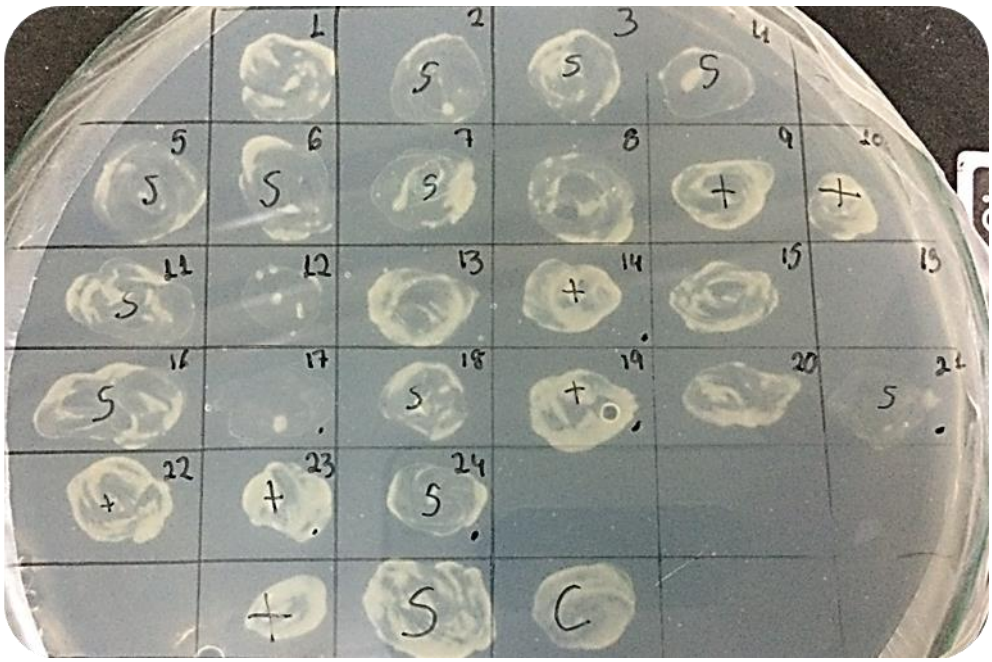


Figura 16: Seleção de colônias recombinantes para determinação do fenótipo Mut $^{+}$ e Mut^{S} por em meio *Mimimal Medium* (MM). 1 a 24= clones transformantes com cassete de expressão e secreção de lípase integrado no genoma de *Pichia pastoris*; += clone de fenótipo Mut $^{+}$ previamente selecionado (Carmo, 2010); S= clone de fenótipo Mut ^{S} (Carmo, 2010); C= *Pichia pastoris* GS115.

5.6 Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE

Ao analisar a sequência previamente descrita de lipase utilizando as ferramentas de análise de nucleotídeo (Blastn) traduzindo para sequencias proteicas (Blastp) e utilizando o EzPASy foi feito a previsão do possível peso molecular resultando em aproximadamente 43.3 kDa. O perfil de bandas observado e reportado na literatura para lipase microbiana com massa molecular predominante entre 20 e 60 kDa. A observação do perfil de migração por proteínas em gel de poliacrilamida 10% das proteínas secretadas pelos clones de *P. pastoris* revelou a presença de bandas no gel correspondes a lipase recombinante (Figura 17) tendo o resultado experimental da massa molecular de lipase por volta de 52 kDa. Esta discrepância entre o resultado experimental e as análises oriundas da bioinformática ocorrem devido ao maquinário transicional de *P. pastoris* que pode realizar glicolização em alguns pontos reconhecidos na sequência proteica. Foi utilizado o servidor NetOGlyc-4.0 para predição de possíveis pontos onde podem ter ocorrido acréscimo de açúcares (apêndice 9.3) onde foi encontrado 4 pontos

de N-glicolisação e 3 pontos de O-glicolização de possíveis acréscimos de açucares de forma a aumentar o peso molecular da proteína analisada. Vici *et al* (2015) verificaram em sua proteína apenas possíveis pontos de N-glicosilação, apenas este ponto elevou o peso molecular em 30%. Da mesma forma, Bretthauer *et al*, (1999) demonstraram a diminuição de mais de 34% da proteína recombinante com possíveis sítios de N-glicosilação passando de 90 kDa para 60 kDa após o tratamento de endoglicosidase H. O mecanismo de N-glicolização da proteína na levedura ocorre com o reconhecimento dos aminoácidos Asn-Xaa- Thr/Ser pelo aparato catalítico no Reticulo endoplasmático. Na maioria das leveduras ocorre de três resíduos de manoses podem ser acrescentadas sendo: α-1,2; α-1,6 e α-1,4. Cada resíduo de pode ser alongando de 50 a 100 resíduos ramificados ou não, com di ou tri-sacarídeos (BRETTHAUER *et al* 1999).

.

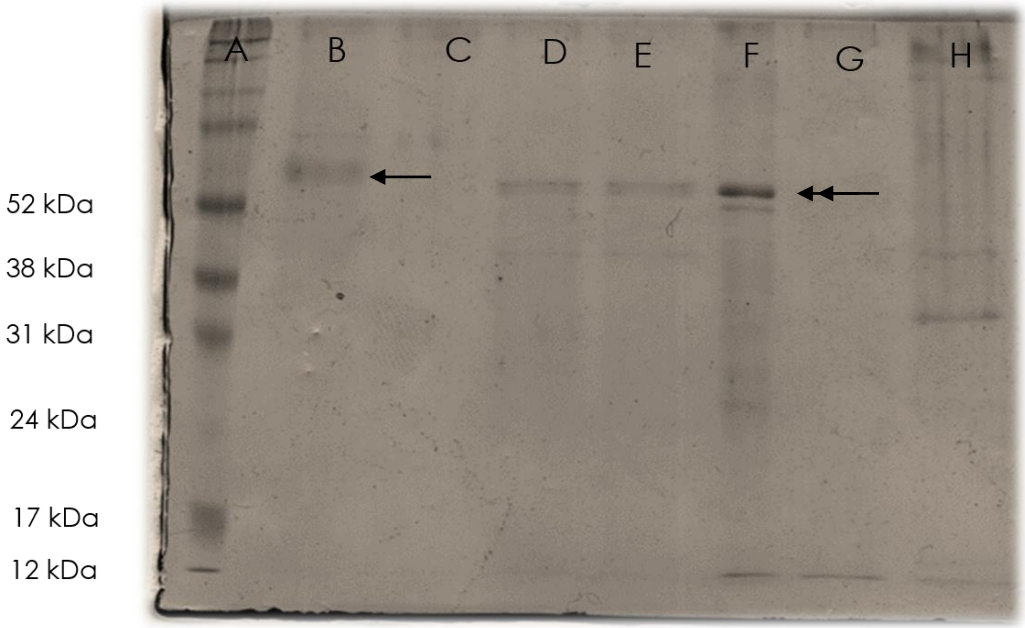


Figura 17: Perfil eletroforético de proteínas secretadas por clones de *Pichia pastoris* induzida com metanol em meio BMMY após 72h de cultivo. A= Marcador *Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker - Full range GE Healthcare*, RPN800E; B= α-amilase 62 kDa; Canaletas C, D e E = clones de fenótipo Mut ^{S} (21, 17, e 24 respectivamente); Canaletas F, G e H = clones com fenótipo Mut+ (14, 19 e 23 respectivamente).

5.7 Atividade de hidrólise da lipase recombinante

A determinação da atividade hidrolítica em lipase recombinante se deu com um clone recombinante analisados no gel SDS-PAGE sendo o clone Mut^S 17 o que apresentou resultado de 50,80 U/mL para 72h de cultivo em frasco agitado. Considerando que a formação de uma unidade de enzima por mL é definido pela divisão de um µmol de substrato por minuto (SMELTZER *et al* 1992 ZHENG *et al.* 2013). Foi definido o melhor tempo de reação de 5 minutos onde se percebe que a reação de ordem 1 e perto dos 10 minutos atinge-se a ordem 0. Em comparação com outros ensaios produz-se um valor relativamente baixo a outros trabalhos utilizando *Pichia pastoris* como por exemplo de lipase de Carmo (2017) foi detectada 374,59 U/mL em 120 h de cultivo. Zheng et al., (2013) utilizando *Pseudomonas sp* adquiriu 42 U/mL em 168 h de indução. A produção de lipase em *Pichia pastoris* foi realizada em frascos agitados descontinuados com adição de metanol indutor do promotor *aox*. Estes ensaios muitas vezes não são efetivos para alta produção uma vez que não possuem difusão de oxigênio suficiente para um bom desempenho celular. Nessa comparação Cos *et al*, (2005) realizou indução em frascos agitados obtendo cerca de 6,05 U/mL (indução por metanol).

Quando esta indução foi realizada em biorreator houve um aumento para 150 U/mL um acréscimo de 25x na quantidade enzimática produzida. Outro exemplo foi o trabalho de Brunel *et al* (2004) onde na indução por frascos agitados adquiriu 5,7 U/mL de enzima, e em indução por biorreator adquiriu 100,000 U/mL.

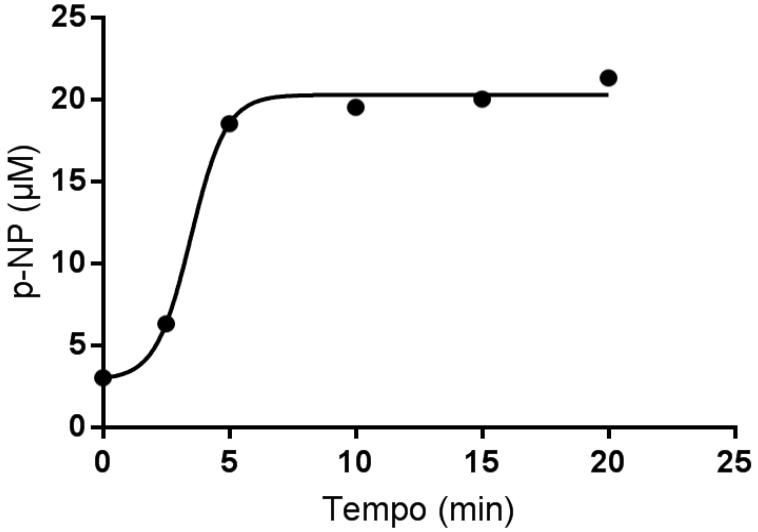


Figura 18: Perfil cinético da lipase recombinante. O experimento foi executado utilizando 100 µL de enzimas no sobrenadante de cultura, p-NPP 10 mM e tampão fosfato (50 mM), pH 8,0 a 50°C.

Outra discursão que se pode levar cabo é a quantidade de cópias que foi introduzida na levedura podendo afetar negativamente a produção de proteína tanto o acréscimo de cópias quanto o decréscimo, como foi feito por Sha, *et al* (2013) onde perceberam o aumento da atividade enzimática relacionado ao número de cópias do gene na levedura. Ao atingir o número de 6 cópias verificou-se um decréscimo da produção de lipase recombinante. No trabalho de Hohenblum *et al* (2004) relacionado a otimização de produção de proteína recombinante houve um resultado satisfatório de 1 a 2 número de cópia do gene, quando aumentado para 3 ou mais há uma depressão na expressão genica. Segundo Hohenblum *et al* (2004) e outros (CLAREA *et al*, 1991 ENGLAENDER *et al*, 2017), o número de cópias é o principal fator para o aumento significativo de quantidades de produção proteicas, mas para o melhor aprimoramento da expressão deve-se ter em conta a quantidade precisa do número de cópias integradas, caso contrário ocorre a sobrecarga do sistema de expressão da levedura levando ao decréscimo da atividade enzimática (COS *et al* 2005[a]; CARMO, 2017).

5.8 Efeito do pH sobre a atividade enzimática de lipase: determinação do pH ótimo da atividade catalítica

A atividade específica de lipase recombinante foi determinada pelo monitoramento da produção de p-NP a 410nm. O efeito do pH na atividade de hidrólise de lipase foi investigada na faixa de 3-8. Os ensaios para avaliar o pH ótimo de lipase sobre a atividade de lipase recombinante teve como melhor resultado pH 7 (figura 19). O Ensaio mostra que a atividade recombinante atinge 74% de atividade no pH 6 e 100% de atividade no pH 7 seguido de um declínio no pH 8 como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Efeito do pH sobre a atividade relativa de lipase recombinante

pH	p-NP (µM)	Atividade relativa (%)
3	1,55	18
4	4,76	55
5	5,04	58
6	6,45	74
7	8,69	100
8	5,07	58

As lipases geralmente possuem maior atividade em pH alcalino como observado por, Javed *et al* (2018), Carmo (2017), Castila *et al*., (2017), Zheng *et al*., (2013), Koling, (2010). Na revisão de Javed *et al* (2018) é possível analisar 28 artigos publicados entre 2010-2017. Comparando o pH ótimo de atividade enzimática verifica-se que apenas 3 trabalhos exercem atividade em pH básico sendo estes de Do *et al*, (2013), Li, *et al* (2014) e Wang *et al* (2012). É interessante notar que normalmente lipases são comumente ativas em meios alcalinos ou são alcalino tolerantes, como é no caso de Li Li, *et al* (2014) que apesar de atividade ótima ser no pH 7 mantém uma faixa de atividade por volta do pH 9. Entretanto, a lipase do presente estudo não apresenta este padrão de comportamento, tendo maior atividade no pH neutro, mas uma brusca diminuição de atividade por volta dos 20%. Levando a comparação com trabalho de Wang *et al* (2012) onde apresentou sensibilidade a pH alcalinos diminuindo por volta de 20% de atividade relativa no pH 8.

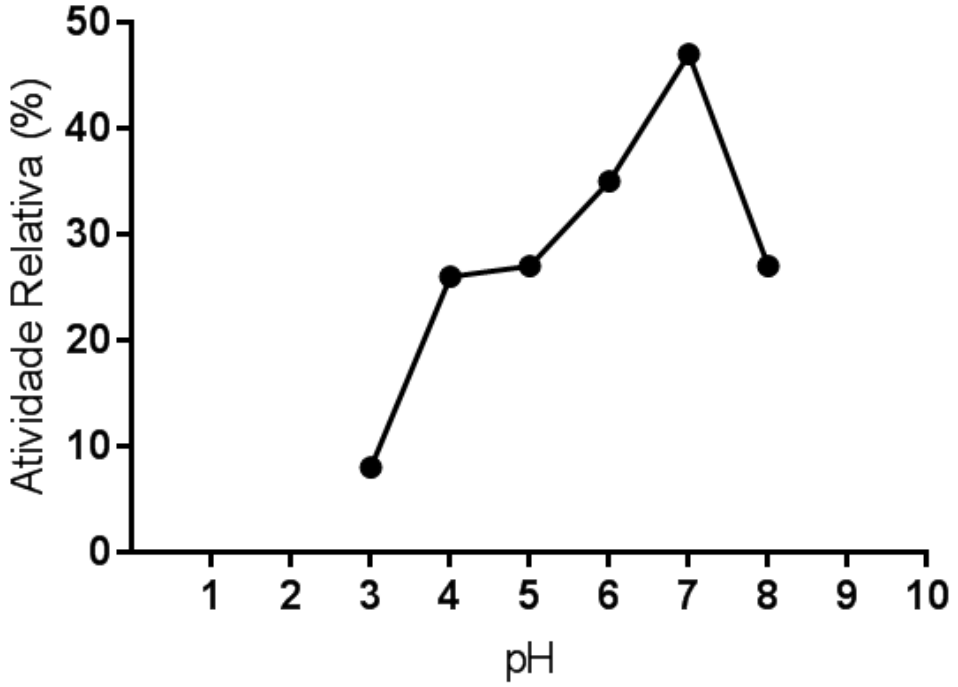


Figura 19: Efeito pH sobre a atividade enzimática da lipase recombinante produzida em *P. pastoris*. Os ensaios foram realizados utilizando 100 µL de enzimas, 10 mM de p-NPP, 50 ºC durante 5 minutos.

5.9 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de lipase

O efeito da temperatura na atividade enzimática de lipase recombinante em pH ótimo foi 7 temperaturas diferentes sendo a temperatura ótima definida como padrão 50 °C 100% de atividade seguido por 60°C com 94% de atividade como se pode ver na tabela 2. A variação de temperatura ótima de lipases em procariotos está por volta de 20 a 55°C sendo a maior predominância em 50°C (CARMO, 2017).

Tabela 2: Efeito da temperatura sobre a atividade relativa de lipase recombinante

Temperatura (°C)	p-NP (µM)	Atividade relativa (%)
37	9,82	53
40	15,48	84
50	18,49	100
60	17,39	94
70	11	59
80	18,68	101
90	9,33	50

Lipases possuem estruturalmente uma região chamada *Lid*, que em interfaces água-lipídio mudam sua conformação expondo o sítio catalítico, esta mudança é chamada interação interfacial (WILLEMS *et al.*, 2018). Neste contexto lipase recombinante apresentou atividade relativa de 101% quando exposta a temperatura de 80°C levando a desnaturação da tampa expondo o sítio ativo exercendo aumento na atividade catalítica como relatado por Santarossa *et al.*, (2005) que fez modificações em três resíduos polares no domínio da *lid* resultando na melhoria de seletividade do substrato e melhorias na termoestabilidade. No trabalho de Skjold-Jørgensen *et al.*, (2014) a região da tampa foi substituída totalmente levando ao aumento de atividade e diminuição a ativação interfacial. A modificação das propriedades estruturais e de superfície de domínio da *lid* é considerada uma via viável para a engenharia de lipases. (TANG *et al* 2015). Willems *et al.*, (2018) relatam que mutações na região codificadora da *lid* afeta a atividade catalítica de lipase adquirindo características comerciais interessantes como: maior eficiência catalítica, enantioseletividade e estabilidade térmica

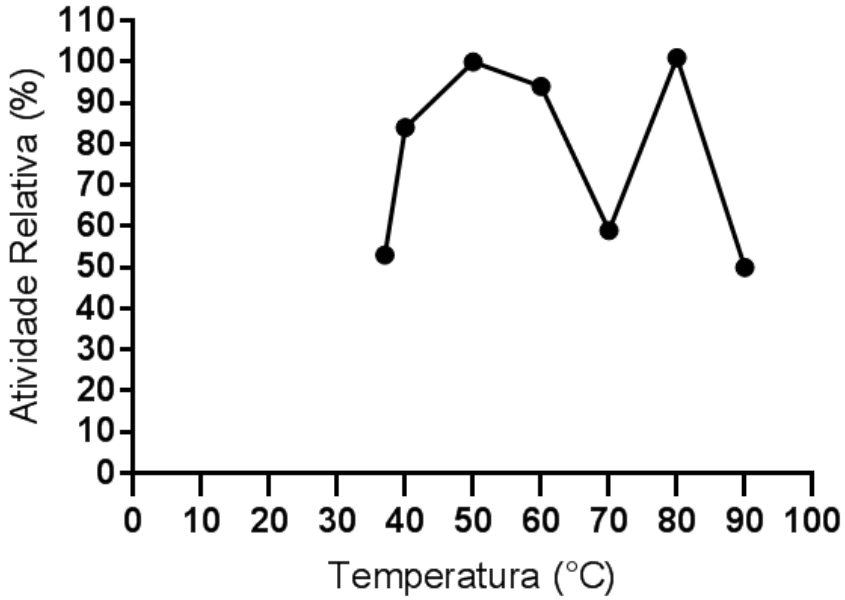


Figura 20: Efeito da temperatura na atividade da lipase recombinante produzida em *P. pastoris*. Os ensaios foram realizados utilizando 100 µL do sobrenadante da cultura, 10 mM de p-NPP, tampão fosfato pH 7,0 durante 5 minutos

5.10 Determinação de K_m e V_{max} aparentes da lipase recombinante

A determinação de atividade lipolítica de sobrenadante de cultura bacteriana se dá a partir da hidrólise de sis de p-nitrofenil palmitato (p-NPP) associados a ácidos graxos com vários comprimentos de cadeia carbónicos (≥C-10). A detecção espectrofotométrica deve ser feita em 410 nm. A afinidade de uma lipase para a hidrólise do substrato é determinada pela constante de Michaelis (K_m) que é a concentração do substrato na qual a taxa de reação é metade da taxa máxima (V_{max}). Por sua vez, V_{max} é a taxa máxima quando uma enzima está totalmente saturada com concentração de substrato (JAEGER *et al*, 1999; JAVED *et al* 2018). A determinação de V_{max} se deu por estimativa, onde resultou ~274,6 min^{-1} e K_m ~ 67,2 mM obtidos no *software* GraphPad Prisma 7.02. A determinação de *Km* é de fundamental importância na caracterização da cinética enzimática de lipases, devido sua versatilidade de reações e substratos este parâmetro auxilia no estudo específico de seletividade enzimática diferenciando de outras enzimas com semelhantes *Vmax* (CARMO, 2017).

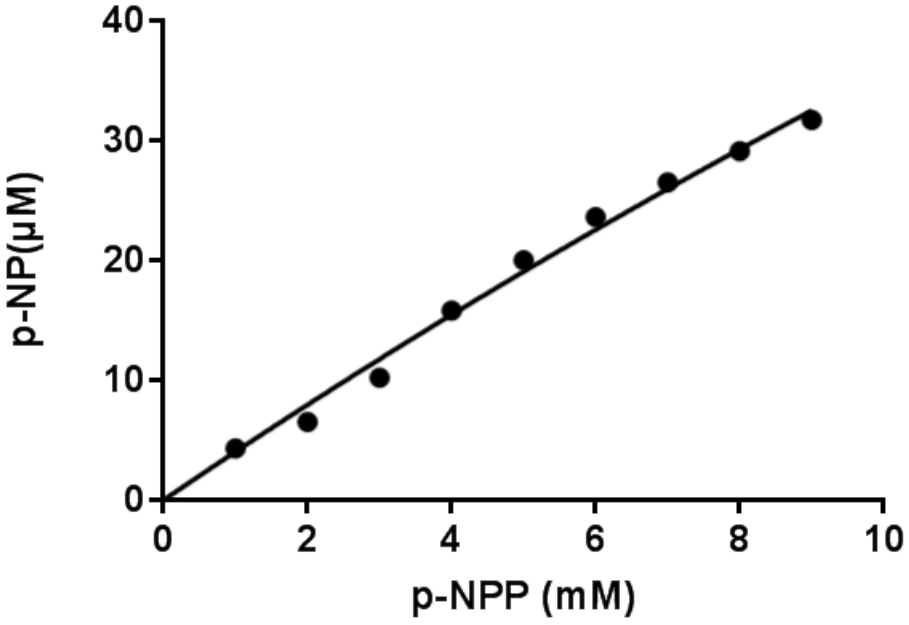


Figura 21:Parâmetros cinéticos aparentes da lipase recombinante descritos pelo modelo cinético de Michaleis-Menten. A concentração de substrato p-Nitrofenil Palmitato (p-NPP) variou de 1 a 9 mM.

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho é possível a relação com diversos materiais e métodos industriais, como produção de sabonetes, cosméticos, indústria alimentícia, além da possibilidade de síntese química, teste não realizado neste estudo. Visando o futuro é necessário para aumento da eficiência de produção enzimática o uso de biorreatores adaptados ao maquinário biológico de *Pichia pastoris* favorescendo o acréscimo de eficiência e qualidade no produto final. É necessário a continuidade do estudo purificando e elucidando as diversas possibilidades que Lipase recombinante trás em benefício a sociedade.

6 CONCLUSÃO

O gene de lipase oriundo de terra preta de índio foi amplificada por PCR e clonado em *Pichia pastoris* com sucesso. As análises da sequência nucleotídica demonstrou identidade de 94% com a especie *Ralstonia eutropha.* A Enzima apresentou características interessantes na atividade térmica tendo um acréscimo de atividade ao atingir 80°C. Suas características permitem compor processos químicos de elevada temperatura em pH neutro. Embora a enzima apresente atividade será necessário otimização do processo fermentativo pelo uso de biorreatores adequados aos rendimentos de *Pichia pastoris* bem como a identificação dos códons preferenciais para aumento da eficiência do maquinário transcricional.

7 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula.** 5 ° edição, Porto Alegre: Artes Médicas, 1396 p., 2010.

ALOULOU, A., RODRIGUEZ, J. A., FERNANDEZ, S., & OOSTERHOUT, D. VAN. **Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies.** 995–1013, 2006. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.06.009

AMRANE, S., & LAGIER, J. **Metagenomic and clinical microbiology**. Human Microbiome Journal, *9* (June), 1–6, 2018. https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.06.001

ANTONIO, M., & ARAUJO, R. **Unidades de Conservação no Brasil : da República à Gestão de Classe Mundial**. Belo Horizonte : SEGRAC. p. 1-14, 2007.

BANSODE, S. R., & RATHOD, V. K. **An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review**. Ultrasonics Sonochemistry, *38*(February), 503–529, 2017.. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.02.028

BERLEC, A., & STRUKELJ, B. **Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells**. *Microbiol Biotechmol*, *91*, 257–274, 2013. https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0

BETANCUR, M. O. **Desenvolvimento de linhagem auxotrófica de Pichia pastoris para o metabolismo de leucina**. Universidade de Brasília, p, 104, 2014.

BETANCUR, M. O. **Desenvolvimento de linhagem auxotrófica de Pichia pastoris para o metabolismo de leucina**. Instituto de Ciência Biológicas, Universidade de Brasília, 2014.

BORRELLI, G. M., and TRONO, D. **Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications**. International Journal of Molecular Sciences 16, 20774–20840, 2015. doi:10.3390/ijms160920774.

BOU ALI, M., BEN ALI, Y., AISSA, I., GARGOURI, Y. **Eukaryotic expression system Pichia pastoris affects the lipase catalytic properties: a monolayer study**, 2014. PloS one 9, e104221 doi:10.1371/journal.pone.0104221

BRETTHAUER, R. K., CASTELLINO, F. J., & DAME, N. **Glycosylation of Pichia pastoris -derived proteins**, Appl. Biochem, *200*, 193–200, 1999.

BROWN T, A. **Introduction of DNA into Living Cells. Gene Cloning & DNA Analysis: An Introduction**. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1307s27-, 2010

BRUNEL, L., NEUGNOT, V., LANDUCCI, L., BOZE, H., MOULIN, G., BIGEY, F., & DUBREUCQ, E. **High-level expression of Candida parapsilosis lipase / acyltransferase in Pichia pastoris**, *111*, 41–50, 2004 https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.03.007

BUCKHOLZ, R.G E GLEESON, M.A.G. **Sistemas de Levedura para a Produção Comercial de Proteínas Heterólogas**. Bio / Technology, 9 (11), 1067-1072, 1991. doi: 10.1038 / nbt1191-1067

CANDEIAS,J. A N. A Engenharia Genética. Saúde Publica, *24*(1), 3–10, 1991.

CARMO, E. J., NEIVA, M., and ASTOLFI-FILHO, S. "**Novas técnicas de recombinação em microrganismos: engenharia genética pela tecnologia do DNA recombinante**," in Biotecnologia Aplicada à Saude: Fundamentos e Aplicações, ed. C. R. Resende, Rodrigo Ribeiro, Soccol (São Paulo: Blucher), 1189, 2015.

CASAS-GODOY, L., DUQUESNE, S., BORDES, F., SANDOVAL, G., MARTY, A. "**Lipases: an Overview," in Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols**, ed. G. Sandoval (London: Humana Press), 588, 2012. doi:10.1007/978-1-62703-239-1_1.

CASTILLA, A., PANIZZA, P., RODRÍGUEZ, D., BONINO, L., DÍAZ, P., IRAZOQUI, G., & RODRÍGUEZ, S. **Enzyme and Microbial Technology A novel thermophilic and halophilic esterase from Janibacter sp . R02 , the first member of a new lipase family (Family XVII**). *Enzyme and Microbial Technology*, *98*, 86–95, 2017. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.010

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M**. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** FEMS Microbiology Reviews, v. 24, n. 1, p. 45–66, 1 jan. 2000.

CHEN, R. **Bacterial expression systems for recombinant protein production : E . coli and beyond**. Biotechnology Advances, *30*(5), 1102–1107, 2012 https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013

CHEN, Y.; BLACK, D. S.; REILLY, P. J. **Carboxylic ester hydrolases: Classification and database derived from their primary, secondary, and tertiary structures**. Protein Science, v. 25, n. 11, p. 1942–1953, 2016.

CLAREA, J. J., ROMANOS, M. A., RAYMENF, F. B., PAYNE, M. M., SREEKRISHNAB, K., HENWOODA, C. A., & SMITH, A. **Production of mouse epidermal growth factor in yeast : high-level secretion using Pichia pastoris strains containing multiple gene copies**, Gene *105*, 205–212, 1991

COS, O., RESINA, D., FERRER, P., MONTESINOS, L., & VALERO, F. (2005**). using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures**, Biochemical Engineering Journal 26 (2005), 86–94. https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.005

COS, O., SERRANO, A., FERRER, P., CREGG, J. M., & VALERO, F. **Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in Pichia pastoris fed-batch cultures**, Journal of Biotechnology *116*, 321–335, 2005 https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.12.010

CREGG, J. M. et al. **Pichia pastoris as a host system for transformations**. Molecular and Cellular Biology, v. 5, n. 12, p. 3376–3385, 1985.

DEBUISSY, T.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. **Lipase-catalyzed synthesis of biobased and biodegradable aliphatic copolyesters from short building blocks. Effect of the monomer length**. European Polymer Journal, 2017.

DEBUISSY, T.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. **Synthesis and characterization of biobased poly(butylene succinate-ran-butylene adipate). Analysis of the composition-dependent physicochemical properties.** European Polymer Journal, v. 87, p. 84–98, 2016.

DE-SOUZA, M. T; BRÍGIDO, M. M;MARANHÃO, Q. A.; Organizadores. Técnica básicas em biologia molecular. 2. ed. Brasília, Editora Universidade de Brasília, p. 372, 2016.

DE-SOUZA, M. T; BRÍGIDO, M. M;MARANHÃO, Q. A.; **Organizadores. Técnica básicas em biologia molecular**. 2. ed. Brasília, Editora Universidade de Brasília, p. 372, 2016.

DINIZ, M. DE O., & FERREIRA, L. C. DE S. **Biotechnology applied to the development of vaccines**. Estudos Avançados, *24*(70), 19–30, 2010.

DO, H., SONG, H. E., AN, J. Y., EOM, S. H., LEE, S. G., & KIM, H. J. **Crystallization communications Purification , characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a cold-active lipase (CpsLip) from the psychrophilic bacterium Colwellia psychrerythraea 34H crystallization communications**, Acta Crystallographica Section F, 920–924, 2013. https://doi.org/10.1107/S1744309113019428

EGGERT, T., PENCREAC'H, G., DOUCHET, I., VERGER, R., JAEGER, K. E. **A novel extracellular esterase from Bacillus subtilis and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase**. European Journal of Biochemistry 267, 6459–6469, 2000. doi:10.1046/j.1432- 1327.2000.01736.x.

EMOND, S., MONTANIER, C., NICAUD, J.-M., MARTY, A., MONSAN, P., ANDRÉ, I., ET AL. **New efficient recombinant expression system to engineer Candida antarctica lipase B**. Applied and environmental microbiology 76, 2684–2687, 2010.doi:10.1128/AEM.03057-09.

ENGLAENDER, J. A., ZHU, Y., SHIRKE, A. N., LIN, L., LIU, X., ZHANG, F., … LINHARDT, R. J. **Expression and secretion of glycosylated heparin biosynthetic enzymes using Komagataella pastoris**, Appl Microbiol Biotechnol, 2843–2851, 2017. https://doi.org/10.1007/s00253-016-8047-x

FAORO, H., GLOGAUER, A., COUTO, G. H., DE SOUZA, E. M., RIGO, L. U., CRUZ, L. M., *et al*.. **Characterization of a new Acidobacteria-derived moderately thermostable lipase from a Brazilian Atlantic Forest soil metagenome**. FEMS Microbiology Ecology 81, 386–394, 2012. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01361.x.

FERREIRA, F., & NÓBREGA, D. F. **Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer**. *Revista saúde e ciência On Line*, *3*(3), 252–262, 2014.

GANDHI, N. N. **Applications of lipase**. Journal of the American Oil Chemists' Society, 74(6), 621–634, 1997. https://doi.org/10.1007/s11746-997-0194-x

GHOSH, A., & BIOINFORMATICS, C. **Metagenomic Analysis and its Applications**, 1–10, 2018. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20178-7

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F. ; CLARDY, J.; GOODMAN, R. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & Biology, v. 5, n. 10, p. R245-R249, 1998.

HASAN, F., SHAH, A. A., & HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology, 39(2), 235–251, 2005. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016

HASAN, F., SHAH, A. A., & HAMEED, A. **Methods for detection and characterization of lipases : A comprehensive review**. Biotechnology Advances, *27*(6), 782–798, 2009. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.001

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2005.

HODGSON, J. **The changing bulk biocatalyst market. Bio/technology** Nature Publishing Company, Vol. 12, 1994.

HOHENBLUM, H., GASSER, B., MAURER, M., & BORTH, N. **Effects of Gene Dosage , Promoters , and Substrates on Unfolded Protein Stress of Recombinant Pichia pastoris.** Wiley InterScience**,** 2004 https://doi.org/10.1002/bit.10904

JAEGER K, EGGERT T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390–397, 2002.

JAEGER, K. E., DIJKSTRA, B. W., & REETZ, M. T. **Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases**. Annual Review of Microbiology, *53*, 39, 1999.

JAEGER, K. E., DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. **Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases**. Annual review of microbiology 53, 315–351, 1999. doi:10.1146/annurev.micro.53.1.315

JANG, J., HUR, H., SADOWSKY, M. J., BYAPPANAHALLI, M. N., YAN, T., & ISHII, S. **Environmental Escherichia coli : ecology and public health implications — a review**. Applied Microbiology, *123*, 570–581, 2017. https://doi.org/10.1111/jam.13468

JAVED, S., AZEEM, F., HUSSAIN, S., RASUL, I., HUSSNAIN, M., RIAZ, M., NADEEM, H. **Bacterial lipases : A review on puri fi cation and characterization**. Progress in Biophysics and Molecular Biology, *132*, 23–34, 2018. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014

KERN, D. C., KAMPF, N., WOODS, I. W., DENEVAM, M. W., COSTA, M. L., FRAZÃO, F. J. L., & SOMBROEK, W. **As Terras Pretas de Índio da Amazônia : As Terras Pretas de Índio da Amazônia.** p. 73–82, 2009.

KIM, H. J., JEONG, Y. S., JUNG, W. K., KIM, S. K., LEE, H. W., KAHNG, H. Y., *et al*. **Characterization of Novel Family IV Esterase and Family I.3 Lipase from an Oil-Polluted Mud Flat Metagenome**. Molecular Biotechnology 57, 781–792, 2015. doi:10.1007/s12033-015-9871-4.

KOGAWA, A. C.; CERNIC, B. G.; COUTO, L. G. D. C.; SALGADO, H. R. N. **Synthetic detergents: 100 years of history.** Saudi Pharmaceutical Journal, 2017.

KOLLING, DEISE JULIANA. **Caracterização bioquímica de duas lipases mutantes de Staphylococcus xylosus e de uma esterase de Lactobacillus plantarum imobilizada em polipropileno.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós- Graduação em Ciência dos Alimentos. Florianópolis, SC, 76 p. 2010.

KOUKER, G., & JAEGER, K. E. **Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases**. Applied and Environmental Microbiology, *53*(1), 211–213, 1987.

KUMAR, D., KUMAR, L., NAGAR, S., RAINA, C., PARSHAD, R., & GUPTA, V. K. **Screening , isolation and production of lipase / esterase producing Bacillus sp .**

strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions, Scholars Research Library, Archives *4*(4), 1763–1770, 2012.

KUMAR, V.; SINGH, D.; SANGWAN, P.; GILL, P.K. **Global Market scenario of industrial enzymes. In Industrial enzymes: Trends, scope and relevance**. Nova Science Publishers. New York, 2014.

LANGE, J.; TKACZ S. J. **Advances in Fungal Biotechnology for Industry, and Medicine,** Springer, 2017.

LEÃO, L. S. **Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido nióbico**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Escola de Química – EQ, 2009.

LEE, M. H., & LEE, S. **Bioprospecting Potential of the Soil Metagenome** . Novel Enzymes and Bioactivities, *11*(3), 114–120, 2013.

LI, D.-Y. et al. **PCR based cloning and sequence analysis of the Pichia pastoris cystathionine b- synthase gene**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 33, p. 600-606, 2001.

LI, X., QIAN, P., & YU, S. W. H. **Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from Idiomarina sp . W33 and its application for biodiesel production using Jatropha oil.** Extremophiles, *18*, 171–178, 2014. https://doi.org/10.1007/s00792-013-0610-0

LIN CEREGHINO, G. P. et al. **New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of Pichia pastoris**. Gene, v. 263, p. 159-169, 2001

MACAULEY-PATRICK, S. et al. **Heterologous protein production using thePichia pastoris expression system.** Yeast, v. 22, n. 4, p. 249–270, 1 mar. 2005.

MADHU, A.; CHAKRABORTY, J. N. **Developments in application of enzymes for textile processing**. Journal of Cleaner Production, v. 145, p. 114–133, 2017.

MAHAPATRO, A.; KALRA, B.; KUMAR, A.; GROSS, R. A. **Lipase-catalyzed polycondensations: Effect of substrates and solvent on chain formation, dispersity, and end-group structure**. Biomacromolecules, v. 4, n. 3, p. 544–551, 2003.

MENDES, A. A., OLIVEIRA, P. C., & DE CASTRO, H. F. **Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 78, 119–134, 2012. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.03.004

NAUMOV, G. I. et al. **Komagataella kurtzmanii sp. nov., a new sibling species of Komagataella (Pichia) pastoris based on multigene sequence analysis**. Antonie van Leeuwenhoek, v. 104, n. 3, p. 339–347, 27 set. 2013.

NETT, J. H. et al**. Cloning and disruption of the Pichia pastoris ARG1, ARG2, ARG3, HIS1, HIS2, HIS5, HIS6 genes and their use as auxotrophic markers**. Yeast, v. 22, n. 4, p. 295-304, 2005.

NETT, J. H.; GERNGROSS, T. U**. Cloning and disruption of the PpURA5 gene and construction of a set of integration vectors for the stable genetic modification of Pichia pastoris**. Yeast, v. 20, n. 15, p. 1279-1290, 2003.

OLIVEIRA, N. O. **Identificação e análise funcional de sinais de secreção de Pichia pastoris**. Brasilia, 2012

OLIVEIRA, R. Biologia Molecular I Protocolos experimentais, 2018.

OU, B., YANG, Y., THAM, W. L., CHEN, L., & GUO, J. **Genetic engineering of probiotic Escherichia coli Nissle 1917 for clinical application**. Applied Microbiology and Biotechnology, *100*, 8693–8699, 2016. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7829-5

PASCOAL, A., ESTEVINHO, L. M., MARTINS, I. M., & CHOUPINA, A. B. **Physiological and Molecular Plant Pathology REVIEW : Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms**. Physiological and Molecular Plant Pathology, 104, 119–126, 2018 https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.08.003

PEREIRA, M. R**. Prospecção de genes codificadores de enzimas**. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo, 2011.

PETROVSKAYA, L. E., NOVOTOTSKAYA-VLASOVA, K. A., GAPIZOV, S. S., SPIRINA, E. V., DURDENKO, E. V., AND RIVKINA, E. M.. **New member of the**

hormone-sensitive lipase family from the permafrost microbial community. Bioengineered 0, 1–4, 2016. doi:10.1080/21655979.2016.1230571.

PHAFF H, MILLER M, SHIFRINE M**. The taxonomy of yeasts isolated from Drosophila in the Yosemite region of California**. Antonie Van Leeuwenhoek 22:145-61, 1956.

PROMEGA, C. pGEM®-T and pGEM®-T **Easy Vector Systems Technical Manual** #TM042, 27, 2018.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. **Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries**. v. 52, n. 1, p. 207–219, 2009.
RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. **Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries**. v. 52, n. 1, p. 207–219, 2009.
REHM, S., TRODLER, P., PLEISS, J. **Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study**. Protein Science 19, 2122–2130, 2010. doi:10.1002/pro.493.

RIBEIRO, B.D; DE CASTRO A.M; COELHO M.A.Z; FREIRE D.M.G. **Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production**. In: Enzyme research, pp. 615-803, 2011.

SAIK, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., ERLICH, H. A**. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase**. Science, *239*, 487–491, 1988.

SALIHU, A., & ALAM, M. Z. **Production and applications of microbial lipases: A review**. Scientific Research and Essays, *7*(30), 2667–2677, 2012. https://doi.org/10.5897/SRE11.2023

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. **Production and applications of microbial lipases: A review**. Scientific Research and Essays, v. 7, n. 30, p. 2667–2677, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; E MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2 o ed. New York, 1989.

SANROMÁN, M. A.; DEIVE F. J. Food Enzymes. In: Ashok Pandey, Maria Ángeles Sanromán, Guocheng Du, Carlos Ricardo Soccol, Claude-Gilles Dussap. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, p. 119-142, 2017.

SANROMÁN, M. A.; DEIVE F. J. Food Enzymes. In: Ashok Pandey, Maria Ángeles Sanromán, Guocheng Du, Carlos Ricardo Soccol, Claude-Gilles Dussap. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, p. 119-142, 2017.

SANROMÁN, M. A.; DEIVE F. J. **Food Enzymes. In: Ashok Pandey, Maria Ángeles Sanromán, Guocheng Du, Carlos Ricardo Soccol, Claude-Gilles Dussap**. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, p. 119-142, 2017.

SANTAROSSA, G., LAFRANCONI, P. G., ALQUATI, C., DEGIOIA, L., ALBERGHINA, L., FANTUCCI, P., & LOTTI, M. **Mutations in the ‘ lid ’ region affect chain length specificity and thermostability of a Pseudomonas fragi lipase**. Federation of European Biochemical Societies *579*, 2383–2386, 2005. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.037

SCHICHER, M., MORAK, M., BIRNER-GRUENBERGER, R., KAYER, H., STOJCIC, B., RECHBERGER, G., *et al*. **Functional proteomic analysis of lipases and esterases in cultured human adipocytes**. Journal of Proteome Research 9, 6334–6344, 2010. doi:10.1021/pr1005795.

SCHWARZHANS, J.-P. et al. **Towards systems metabolic engineering in Pichia pastoris.** Biotechnology Advances, v. 35, n. 6, p. 681–710, 1 nov. 2017.

SHA, C., YU, X. W., LI, F., XU, Y. **Impact of gene dosage on the production of lipase from Rhizopus chinensis CCTCC M201021 in Pichia pastoris** . Applied Biochemistry and Biotechnology 169, 1160–1172, 2013. doi:10.1007/s12010-012-0050-9.

SHARMA, R., CHISTI, Y., AND CHAND, U. (2001). **Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases**. Biotechnology advances 19, 627–662, 2001 doi:10.1016/S0734-9750(01)00086-6.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. **Organic solvent tolerant lipases and applications**. The Scientific World Journal, 2014.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P.K. **Microbial enzymes: industrial progress in 21st century**. Biotech. v. 6. n. 174. 2016.

SMELTZER, M. S., HART, M. E., & IANDOLO, J. J. **Quantitative Spectrophotometric Assay for Staphylococcal Lipase**. Applied and environmental microbiology, *58*(9), 2815–2819, 1992.

STEELE, H. L., & STREIT, W. R. **Metagenomics : Advances in ecology and biotechnology**, *247*, 105–111, 2005. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.011

STEELE, H.; STREIT, W. R. **Metagenomics: Advances in ecology and biotchenology**. Microbiology Letters, v. 247, p. 105-111, 2005

THOR, D. et al. **Cloning and characterization of the Pichia pastoris MET2 gene as a selectable marker**. FEMS Yeast Research, v. 5, n. 10, p. 935-942, 2005.

TIRAWONGSAROJ, P.; SRIPRANG, R.; HARNPICHARNCHAI, P.; THONGARAM, T.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. **Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library**. Journal of Biotechnology, v. 133, p. 42-49, 2008.

TORRES, F.; DE MORAES, L. **Proteínas recombinantes produzidas em leveduras**. Biotecnologia Ciência Desenvolvimento, v. 2, n. 12, p. 20–22, 2000.

TREVISAN, H. C. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto. Editora Legis Summa. 400p, 2014

TSAI, S. W. **Enantiopreference of Candida antarctica lipase B toward carboxylic acids: Substrate models and enantioselectivity thereof.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 127, p. 98–116, 2014.

VICI, A. C., CRUZ, A. F., FACCHINI, F. D. A., & CARVALHO, C. C. DE.. **Beauveria bassiana Lipase A expressed in Komagataella (Pichia) pastoris with potential for biodiesel catalysis.** Microbiol. 6:1083, 2015. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01083

WANG, M., JIANG, S., & WANG, Y. **Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in Pichia pastoris**. Bioengineered, *7*(3), 155–165, 2016. https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1191707

WANG, Q., HOU, Y., DING, Y. **Purification and biochemical characterization of a cold-active lipase from Antarctic sea ice bacteria Pseudoalteromonas sp** . Mol Biol Rep., NJ 70, (40), 9233–9238, 2012. https://doi.org/10.1007/s11033-012-1796-4

WILLEMS, N., LELIMOUSIN, M., SKJOLD-JØRGENSEN, J., SVENDSEN, A., & SANSOM, M. S. P. **The e ff ect of mutations in the lid region of Thermomyces lanuginosus lipase on interactions with triglyceride surfaces : A multi-scale simulation study.** Chemistry and Physics of Lipids, *211*, 4–15, 2018. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.08.004

YAMADA, Y. et al. **The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae**). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 59, n. 3, p. 439–444, 1995.

YASSIN, ATIF A. A.; MOHAMED IBRAHIM O.; IBRAHIM, MOHD N.;YUSOFF, MOHD S. A. **Effect of Enzymatic Interesterification on Melting Point of Palm Olein**. Applied Biochemistry & Biotechnology. v.110 p.45-52, 2003.

ZHENG, J., LIU, C., LIU, L., & JIN, Q. (2013). **Characterisation of a thermo-alkali-stable lipase from oil-contaminated soil using a metagenomic approach**. Systematic and Applied Microbiology, *36*(3), 197–204, 2013. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.12.008

ZHENG, J., LIU, C., LIU, L., & JIN, Q. **Characterisation of a thermo-alkali-stable lipase from oil-contaminated soil using a metagenomic approach** . Systematic and Applied Microbiology, 36(3), 197–204, 2013 https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.12.008

ZHENG, M.; XIANG, X.; WANG, S.; JIE S.; QIANCHUN D.; FENGHONG H. RENHUAI C. **Lipase immobilized in ordered mesoporous silica: A powerful biocatalyst for ultrafast kinetic resolution of racemic secondary alcohols**. Process Biochemistry, v. 53, p. 102–108, 2016.

TEIXEIRA**,** W. G.; KEM, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. N; WOODS,W. **As terras pretas de índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conehecimento na criação de novas áreas**.Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009.

8 ANEXO A

8.1 Meios de cultivo de Levedura *P. pastoris*

Composição BMMY (*Bufeered Methanol Complex Medium*)	
Extrato de levedura	10g/L
Peptona	20g/L
Tampão Fosfato/pH 6,0	100mM
YNB	1,34%
Biotina	$4x10^{-5}$%
Metanol	0,50%
Ágar	15g/L
Rodamina	0,002%
Tween 20	1%
Óleo de Oliva	1%

Composição BMGY-U (*Buffered glycerol complex médium)*	
Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Tampão Fosfato/pH 6,0	100 mM
YNB	1,34%
Biotina	$4x10^{-5}$%
Glicerol	1,00%

Composição do meio YNB (*Yeast Peptone Dextrose Medium*)	
YNB (*Yeast nitrogen Bases*)	1,34%
Biotina	$4x10^{-5}$%
Glicose	2%
Ágar	20 g/L

Composição do Meio MD (*Minimal Dextrose Medium*)	
Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	2%
Ágar	20 g/L

Meio MM (*Mimimal Methanol Medium*)	
YNB	1,34%
Biotina	$4x10^{-5}$%
Metanol	0,50%
Ágar	20 g/L

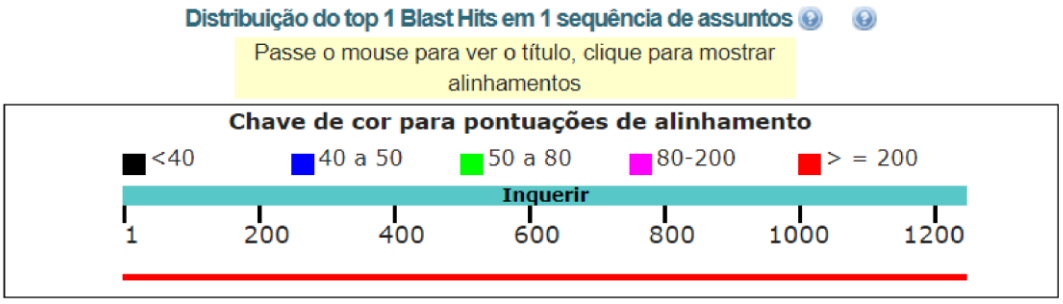
Tampão H
2% trion X 100
1% SDS
100 mM NaCl
10 mM TrisHCl pH 8,0
1 mM EDTA

8.2 Meio de cultivo para Bactérias.

Meio LB (Luria Bertani)	
Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Ágar	15 g/L

9 APÊNDICE

9.1 Alinhamento da sequência nucloetidica BLASTN



Cromossomo 1 de Ralstonia eutropha H16

ID da sequência: AM260479.1 **Duração:** 4052032 **Número de registros:** 1

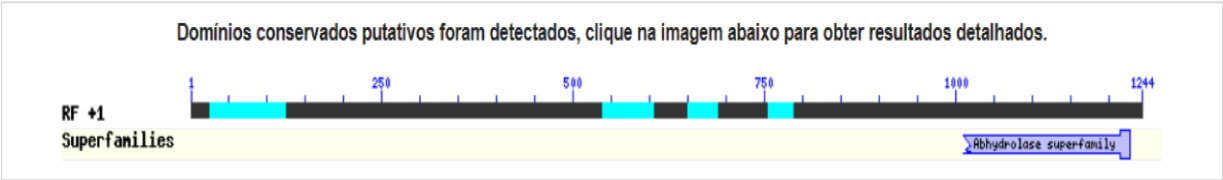
Faixa 1: 965010 a 966251 Gráficos do GenBank Anterior Próximo Partida Correspondente

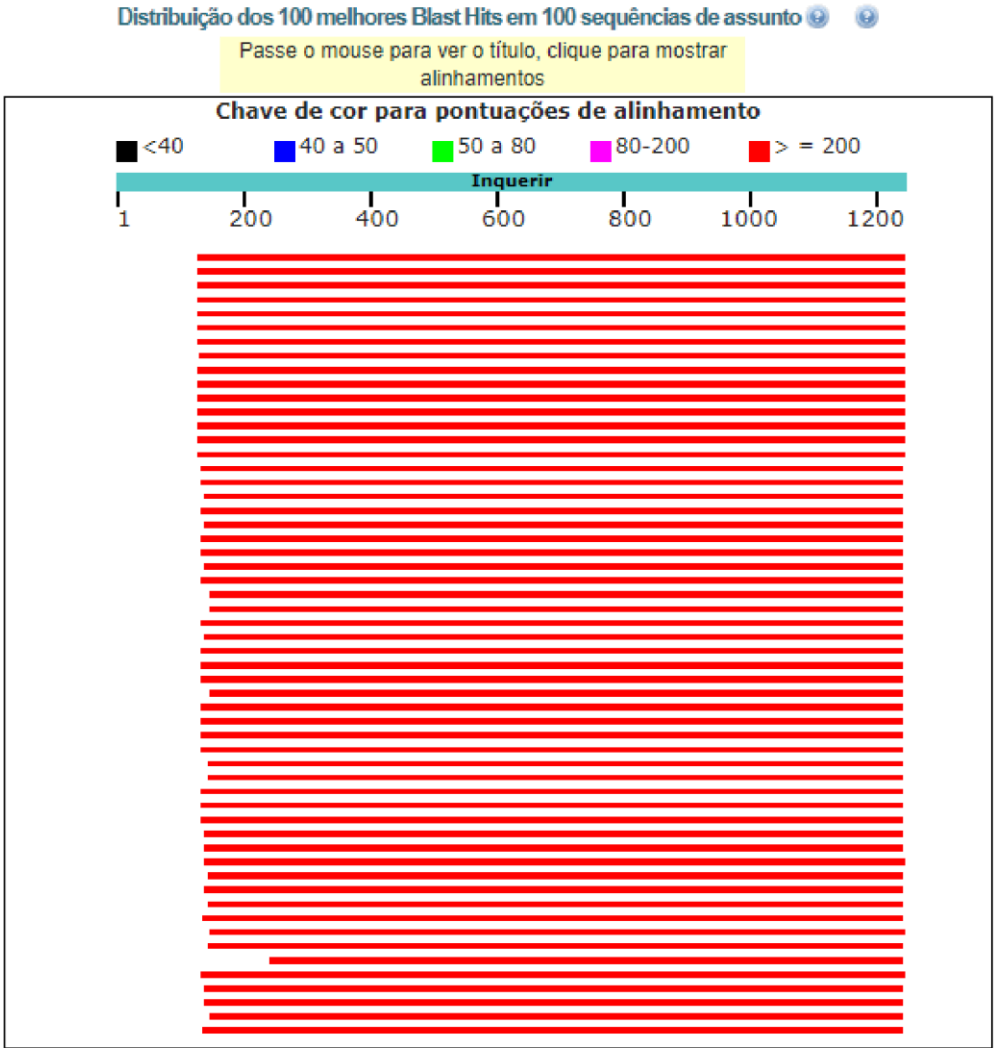
Ponto	Espero	Identidades	Lacunas	Strand
1602 bits (867)	0,0	1117/1242 (90%)	0/1242 (0%)	Plus / Plus

```
Consulta 1 TTGTGCATACGCGTGACGTCTTTCGTCCCCGGCGCGGCCCTTGCCAGGGGCGCAGCGCGC 60
           ||||| || ||||| | |||| || || ||| |||||||||| ||||||| || |||
Sbjct 965010 TTGTGGATCCGCGTAATGTCTCGCGCTCCTGGCATGGCCCTTGCCGGGGGCGCGGCACGC 965069

Consulta 61 GCCGTCCTTGCGATTGCCGTGGCGCTGTGTGCCCTGGCTGGCGCGCCCGCGCTGGCCGGG 120
            || ||||| ||||||||| ||||||||||| ||||||||||||||| ||||| |||||
Sbjct 965070 GCAGTCCTGGCGATTGCCATGGCGCTGTGTGTCCTGGCTGGCGCGCCGGCGCTAGCCGGC 965129

Consulta 121 CCGCTCGATGACCCGAGAAGCGATGCCTTCTACACGCCGCCGCAGCCGTTGCCGAGCGGG 180
             ||||||| |||||||| |||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
Sbjct 965130 CCGCTCGACGACCCGAGGAGCGATGCCTTCTACACGCCGCCCCAGCCGTTGCCGAGCGGG 965189

Consulta 181 CCCCACGGCACGCTGATCCGCTCCCGCCCGTTCATTCCGGTTGGATTGCTGGCTTACGGC 240
             ||||| |||||||||| |||||||| || |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 965190 CCCCATGGCACGCTGATTCGCTCCCGTCCATTCATTCCGGTTGGATTGCTGGCTTACGGC 965249

Consulta 241 TGGCAGATCATGTACAAGTCCACCGACGTCAATGGCCTGCCGATAGCTGTCACCGGCACT 300
             |||||| ||||||||||||||| ||||||||||||| ||||||| || ||||||||||
Sbjct 965250 TGGCAGGTCATGTACAAGTCCAACGACGTCAATGGCTTGCCGATTGCCATCACCGGCACC 965309

Consulta 301 GTGCTGGTGCCCTTTGCGCCGTGGCTCGCCGGCGCCCGGCCGGTCATCGCGTGGGCTCCC 360
             |||||||||||||||| |||| |||||| ||||| |||||||||| || |||||||||||
Sbjct 965310 GTGCTGGTGCCCTTTACGCCATGGCTCTCCGGCCCCCGGCCGGTTATTGCGTGGGCTCCA 965369

Consulta 361 GGAACGCAGGGCCAGGCGGACAATTGCGCGCCCTCGCACCAGTACGCGCTGGGCACCGAG 420
             ||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||| |||| ||
Sbcct 965370 GGAACGCAGGGCCAGGCCGACAACTGCGCGCCCTCGCACCAGTACGCGCTGAGCACGGAA 965429

Consulta 421 TACGAAGCCACGGTTGCCGGCGCGACGCCGGCCACCCTGGCACGCGGCTGGGCGATCGCA 480
             || ||||| ||| |||||||||||||||||| ||||| || ||||| |||||||||||
Sbjct 965430 TATGAAGCGACGATTGCCGGCGCGACGCCGGCAACCCTCGCCCGCGGTTGGGCGATCGCG 965489

Consulta 481 ATGACGGACTACCAGGGCCTTGGCACGCCGGGCGACCACACCTGGGGGATCGGCAGGGCC 540
             |||||||||||| ||||| ||||| || |||||||| |||||||||||||||||| ||||
Sbcct 965490 ATGACGGACTATCAGGGTCTTGGTACACCGGGCGATCACACCTGGGGGATCGGCAAGGCC 965549

Consulta 541 GAAGGGCAAGCCGTCCTCGACGCGGCGCTGGCGGCGCAGCAGTTGAGCGGGGCGGGCCTG 600
             |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 965550 GAAGGGCAAGCCGTCCTCGACGCGGCACTGGCGGCGCAGCAGTTGAGCGGGGCGGGCCTG 965609
```

```
Consulta 541 GAAGGGCAAGCCGTCCTCGACGCGGCGCTGGCGGCGCAGCAGTTGAGCGGGGCGGGCCTG 600
             ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 965550 GAAGGGCAAGCCGTCCTCGACGCGGCACTGGCGGCGCAGCAGTTGAGCGGGGCGGGCCTG 965609

Consulta 601 TCGGCGAACGCTCCCGTCGGCATCATGGGCTATTCACAGGGCGGCCATGCGGCGGCTTTC 660
             |||||||||||| ||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||| ||||||||
Sbjct 965610 TCGGCGAACGCCCCCGTCGGCATCATGGGCTATTCCCAGGGTGGCCATGCAGCGGCTTTC 965669

Consulta 661 GCCGCCCAACTGCAGCCCGCAAATGCCCCTGGCCTGAATGTGCAGGGCATTGCCGCAGGC 720
             || ||| ||||||||||||| ||||||| || |||||||||| |||| ||||||||||
Sbjct 965670 GCGGCCGAACTGCAGCCCGCATATGCCCCCGGTCTGAATGTGCGGGGCGTTGCCGCAGGA 965729

Consulta 721 GCCGGGCCATTCAGCATCGCCGACGTGTATGCGAACGTAAATGGCGGGCCGTTCGGCGGG 780
             || |||||||||||||||| || || ||||||||||| ||||| || ||||||||||||
Sbjct 965730 GCTGGGCCATTCAGCATCGCTGATGTATATGCGAACGTTAATGGTGGCCCGTTCGGCGGG 965789

Consulta 781 GTAGGGCCGATTGCGCTGATGGGCCTGAATGCGGCTTATCCTGAGCTTGGTCTCTCATCG 840
             |||||||||||||||||||||||||||||||| || || ||||| ||||| ||||||||
Sbjct 965790 GTAGGGCCGATTGCGCTGATGGGCCTGAATGCCGCCTACCCTGAACTTGGCCTCTCATCG 965849

Consulta 841 ATCCTCACGCCCTACGGGCAATCGGTGATTACCGACTTCCGCGGCACAAAATGCGTGTTT 900
             |||||||| ||||| ||||| ||||||||| ||||||| |||||||||||||| || ||
Sbcct 965850 ATCCTCACACCCTATGGGCAGTCGGTGATTGCCGACTTTCGCGGCACAAAATGCCTGCTT 965909

Consulta 901 GATGTGACGGCCAGCTATCCGTTCCTGTCTGATGCCGTCCTCGTCCAGGCCCCCACCATC 960
             || ||||| |||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||| || |||||
Sbjct 965910 GACGTGACTGCCAGCTATCCGTTCCTGTCTGACTCGGTCCTCGTCCAGGCTCCAGCCATC 965969

Consulta 961 CTGAATCGCGCCGACTGGCTGGCGCGCATGGCGCAGAACCAGAGCGGCAATGGCGTGCCT 1020
             ||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct 965970 CTGAACCGCGCCGACTGGCTGGCGCGCATGGCGCAGAACCAGAGCGGCAATGGCGTGCCT 966029

Consulta 1021 GCCGTGCCGGCGCTCGTGTACGCGGGATCGCTTGACGAGATCATTCCCTTTGGACAGAAC 1080
              ||||| ||||| | ||||||||||| | || ||||||||||| |||||||| ||||||
Sbjct 966030 GCCGTACCGGCATTGGTGTACGCGGGAACCCTCGACGAGATCATCCCCTTTGGGCAGAAC 966089

Consulta 1081 CAGAAGCTGTTTGCCGCCTGGTGTGCACGCGGTGGCAATGTGGCTTTCAGGACCATCGGC 1140
              |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||| ||||| ||| ||||||||||
Sbcct 966090 CAGAAGCTGTTTGCCGCCTGGTGTGCGCGCGGTGGCAACGTGGCGTTCCGGACCATCGGC 966149

Consulta 1141 GCGACTGATCACGCCACGGGCCTGCTCCTCGGCTTGCCGGTTGCACTGGACTGGATGACA 1200
              ||||| || |||||||| || ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 966150 GCGACCGAACACGCCACTGGGCTGCTTCTCGGCTTGCCGGTTGCACTGGACTGGATGACA 966209

Consulta 1201 CAGCGATTCGGCGGCGTACCCGCGGTATCCGATTGCCCATAG 1242
              ||||||||||||| | || || ||||||||||| |||||||||
Sbjct 966210 CAGCGATTCGGCAGTGTCCCTGCGGTATCCGAGTGCCCATAG 966251
```

9.2 Alinhamento da sequência BLASTT





Sequências que produzem alinhamentos significativos:

Selecionar: Todos Nenhum Selecionado: 0

Alinhamentos Download de Gráficos GenPept

Descrição	Pontuação máxima	Pontuação total	Cobertura de consulta	Valor E	Perc. ident	Adesão
proteína hipotética [Cupriavidus taiwanensis]	607	607	89%	0,0	94,07%	WP_116386255.1
proteína hipotética [Cupriavidus necator]	606	606	89%	0,0	94,07%	WP_081225768.1
lipase secretora [Cupriavidus necator H16]	606	606	89%	0,0	94,07%	CAJ92023.1
proteína hipotética [Cupriavidus necator]	605	605	89%	0,0	93,80%	WP_114134834.1
proteína hipotética [Massilia namucuonensis]	436	436	89%	6e-148	67,20%	WP_093559170.1
proteína hipotética [Variovorax sp. KBW07]	419	419	89%	2e-141	67,20%	WP_124458204.1
proteína hipotética [Variovorax sp. KBW07]	416	416	89%	2e-140	66,67%	WP_124458254.1
proteína hipotética [Variovorax sp. RO1]	416	416	89%	2e-140	66,94%	WP_101489882.1
MULTISPECIES: lipase [Variovorax]	413	413	89%	1e-138	64,78%	WP_125948600.1
proteína hipotética [Acidovorax cavernicola]	412	412	89%	4e-138	64,25%	WP_119554141.1
proteína hipotética AO062_28280 [Variovorax boronicumulans]	410	410	89%	5e-138	64,52%	OEZ27428.1
proteína hipotética [Variovorax boronicumulans]	411	411	89%	6e-138	64,52%	WP_083259430.1
proteína hipotética [Variovorax boronicumulans]	410	410	89%	2e-137	64,52%	WP_082817938.1
proteína hipotética ADK75_11320 [Streptomyces virginiae]	300	300	89%	3e-95	53,85%	KOG55297.1
proteína hipotética [Streptomyces virginiae]	301	301	89%	5e-95	53,85%	WP_078937903.1
lipase inativa putativa semelhante a MT1628 [Actinomadura sp. 5-2]	235	235	88%	2e-69	43,12%	POM26062.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura sp. 5-2]	234	234	88%	2e-69	43,12%	WP_103562696.1
Lipase secretora [Yuhushiella deserti]	226	226	88%	3e-66	41,82%	SFP45895.1
proteína hipotética [Allokutzneria sp. NRRL B-24872]	225	225	88%	5e-66	42,74%	WP_086821668.1
lipase [Yuhushiella deserti]	226	226	88%	8e-66	41,82%	WP_092529359.1
lipase [Herbihabitans rhizosphaerae]	223	223	88%	3e-65	40,69%	WP_130346100.1
lipase secretora [Herbihabitans rhizosphaerae]	224	224	88%	3e-65	40,69%	RZS36466.1
Lipase secretora [Amycolatopsis marina]	223	223	88%	4e-65	41,98%	SFB48813.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura atramentaria]	224	224	88%	1e-64	43,12%	WP_084693242.1
lipase [Amycolatopsis antarctica]	220	220	87%	6e-64	42,82%	WP_094864376.1
lipase [[Actinopolyspora] iraqiensis]	220	220	87%	7e-64	39,73%	WP_026455505.1
lipase [Amycolatopsis albispora]	219	219	88%	7e-64	42,78%	AXB48789.1

lipase [Amycolatopsis palatopharyngis]	219	219	88%	8e-64	42,51%	WP_116045578.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura sp. KC06]	220	220	88%	9e-64	41,30%	TDD29359.1
lipase [Amycolatopsis albispora]	219	219	88%	1e-63	42,78%	WP_113694686.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura bangladeshensis]	219	219	88%	2e-63	41,88%	TDC16534.1
lipase [Saccharomonospora paurometabolica]	218	218	87%	7e-63	39,73%	WP_007024531.1
triacilglicerol lipase [Mycobacterium tuberculosis]	217	217	88%	9e-63	42,13%	CNE50806.1
hidrolase alfa / beta vezes [Allokutzneria albata]	216	216	88%	2e-62	41,67%	WP_043814248.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura sp. 7K507]	216	216	88%	2e-62	41,36%	TDC86351.1
lipase [álbum de Alloactinosynnema]	216	216	88%	2e-62	43,27%	WP_091381049.1
hidrolase alfa / beta vezes [Amycolatopsis balhimycina]	215	215	87%	4e-62	42,71%	WP_020642302.1
lipase [Amycolatopsis sp. GLM-1]	214	214	87%	7e-62	42,44%	WP_125308877.1
triacilglicerol lipase [Thermomonospora curvata]	215	215	88%	1e-61	40,10%	WP_012850707.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura latina]	214	214	88%	1e-61	41,36%	WP_067635253.1
triacilglicerol lipase [Thermomonospora sp. CIF 1]	215	215	88%	1e-61	39,84%	PKK16167.1
proteína hipotética [Nocardiopsis lucentensis]	214	214	88%	2e-61	41,33%	WP_017601676.1
lipase [Amycolatopsis australiensis]	213	213	88%	5e-61	41,42%	WP_072475544.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura sp. 7K534]	213	213	88%	5e-61	40,00%	TDB97526.1
Hidrolase alfa / beta vezes [Amycolatopsis lexingtonensis]	212	212	87%	8e-61	42,18%	WP_086857571.1
lipase [Amycolatopsis albispora]	212	212	88%	8e-61	40,74%	WP_113695503.1
lipase [Amycolatopsis sp. 8-3EHSu]	212	212	87%	8e-61	42,02%	WP_130474030.1
lipase [Haloechinothrix alba]	212	212	88%	1e-60	41,05%	WP_089302917.1
proteína hipotética [Saccharomonospora saliphila]	212	212	87%	1e-60	42,44%	WP_019818874.1
lipase [Amycolatopsis sp. CA-126428]	211	211	87%	1e-60	42,44%	WP_103337963.1
lipase [Streptomyces sp. SDr-06]	211	211	80%	1e-60	44,14%	WP_114040329.1
triacilglicerol lipase [bactia Moraxellaceae]	212	212	89%	1e-60	41,45%	PCJ45003.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura sp. CNU-125]	211	211	88%	2e-60	41,99%	WP_075900532.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura sp. KC345]	211	211	88%	3e-60	40,90%	TDC53889.1
proteína hipotética [Actinomadura madurae]	211	211	87%	3e-60	40,26%	WP_021593139.1
lipase [Saccharothrix variisporea]	210	210	88%	3e-60	38,68%	WP_121227633.1
lipase [Amycolatopsis pretoriensis]	210	210	87%	4e-60	42,18%	WP_086671826.1
proteína hipotética [Actinomadura flavalba]	210	210	88%	4e-60	40,16%	WP_018658430.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura sp. 6K520]	210	210	89%	4e-60	39,79%	TDE36451.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura madurae]	210	210	87%	5e-60	40,26%	WP_111829988.1
lipase inativa [Streptomyces aurantiacus]	209	209	80%	7e-60	44,31%	WP_016645629.1
lipase [Amycolatopsis marina]	208	208	85%	8e-60	41,21%	WP_091675152.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura darangshiensis]	209	209	88%	2e-59	38,02%	TDD85900.1
proteína hipotética [Prauserella muralis]	208	208	88%	2e-59	42,06%	WP_112282429.1
lipase [Streptomyces alboflavus]	208	208	80%	2e-59	44,01%	WP_087885362.1

lipase [Streptomyces sp. NRRL B-1347]	208	208	80%	2e-59	44,61%	WP_030678222.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura madurae]	208	208	87%	3e-59	40,00%	WP_075023122.1
lipase [Amycolatopsis rifamycinica]	207	207	87%	4e-59	41,64%	WP_043787369.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura hibisca]	207	207	88%	5e-59	40,42%	WP_083982231.1
lipase [Streptomyces sp. WM6378]	206	206	80%	5e-59	42,64%	WP_053728801.1
MULTISPECIES: lipase [Streptomyces]	207	207	80%	5e-59	44,01%	WP_030361148.1
lipase [Streptomyces sp. WAC 01529]	207	207	80%	5e-59	43,24%	WP_125514366.1
lipase [Amycolatopsis halophila]	207	207	87%	6e-59	40,32%	WP_034267443.1
lipase [Saccharothrix variisporea]	206	206	89%	9e-59	40,16%	WP_121220405.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura mexicana]	207	207	89%	1e-58	38,40%	WP_089309805.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura fibrosa]	206	206	88%	1e-58	40,62%	WP_131756764.1
lipase [Saccharomonospora sp. CNQ490]	207	207	87%	1e-58	42,67%	WP_024875675.1
lipase [Amycolatopsis mediterranei]	206	206	87%	1e-58	41,64%	WP_013230815.1
lipase [Streptomyces silaceus]	206	206	80%	1e-58	43,24%	WP_055702520.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura sp. LHW63021]	206	206	88%	1e-58	40,48%	WP_111869496.1
Hidrolase alfa / beta vezes [Yuhushiella deserti]	206	206	88%	1e-58	38,79%	WP_092530011.1
triacilglicerol lipase [Spirillospora albida]	206	206	88%	2e-58	41,12%	WP_030170098.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura rifamycini]	205	205	88%	2e-58	41,69%	WP_034516619.1
lipase [Streptomyces luteocolor]	205	205	80%	2e-58	43,24%	WP_069887197.1
lipase [Prauserella muralis]	205	205	87%	3e-58	41,33%	WP_112283496.1
proteína hipotética [Microbispora sp. GKU 823]	204	204	80%	4e-58	43,98%	WP_079319322.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura sp. WAC 06369]	205	205	88%	5e-58	41,69%	WP_125614364.1
lipase [Amycolatopsis kentuckyensis]	204	204	87%	5e-58	41,64%	WP_086847742.1
lipase [Streptomyces sp. N parameters S-milhão 9 Reverso	204	204	86%	6e-58	40,95%	WP_030795068.1
lipase [Streptomyces sp. HST28]	204	204	85%	6e-58	40,72%	WP_127910203.1
lipase [Amycolatopsis sp. H5]	204	204	87%	7e-58	41,64%	WP_093946010.1
lipase [Streptomyces sp. CB01201]	203	203	80%	9e-58	42,94%	WP_100578741.1
lipase [Amycolatopsis tolypomycina]	204	204	87%	1e-57	41,38%	WP_091304837.1
lipase [Streptomyces aureocirculatus]	203	203	80%	2e-57	44,01%	WP_030565294.1
triacilglicerol lipase [Actinomadura sp. NEAU-G17]	204	204	88%	2e-57	38,73%	WP_117360093.1
proteína hipotética [Herbidospora sakaeratensis]	202	202	80%	2e-57	43,92%	WP_062339953.1
lipase [Saccharomonospora sp. LRS4.154]	204	204	87%	2e-57	41,87%	WP_081192522.1
lipase [Actinokineospora mzabensis]	203	203	88%	2e-57	42,44%	WP_110079933.1
lipase [algeriensis de Halopolyspora]	202	202	89%	3e-57	40,16%	WP_114453371.1
proteína hipotética [Cryptosporangium aurantiacum]	202	202	88%	3e-57	44,41%	WP_073255469.1

9.3 Alinhamento da sequencia protéica verificando possíveis pontos de glicolização.

EXAMPLE OUTPUT

```
##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.12
##date 13-7-15
##Type Protein
#seqname        source  feature start   end     score   strand  frame   comment
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        5       5       0.04656 .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        11      11      0.0297036       .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        15      15      0.296424        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        17      17      0.182807        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        22      22      0.567964        .       .       #POSITIVE
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        24      24      0.35171 .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        26      26      0.558198        .       .       #POSITIVE
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        27      27      0.182353        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        46      46      0.199041        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        49      49      0.28106 .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        56      56      0.0436836       .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        61      61      0.0710515       .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        70      70      0.107585        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        74      74      0.0440414       .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        86      86      0.163292        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        88      88      0.0735873       .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        95      95      0.251049        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        99      99      0.335158        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        108     108     0.505881        .       .       #POSITIVE
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        111     111     0.100125        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        112     112     0.488462        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        115     115     0.314924        .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        119     119     0.0818746       .       .
CSF2_HUMAN      netOGlyc-4.0.0.12       CARBOHYD        122     122     0.0480526       .       .
```

```
##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13
##date 19-3-28
##Type Protein
#seqname        source  feature start   end     score   strand  frame   comment
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        6       6       0.0348066       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        7       7       0.039859        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        47      47      0.694521        .       .       #POSITIVE
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        52      52      0.867994        .       .       #POSITIVE
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        59      59      0.751937        .       .       #POSITIVE
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        64      64      0.553704        .       .       #POSITIVE
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        68      68      0.542592        .       .       #POSITIVE
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        87      87      0.0285388       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        88      88      0.0102551       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        98      98      0.140009        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        100     100     0.0357761       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        122     122     0.10303 .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        132     132     0.396148        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        139     139     0.0937001       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        144     144     0.086864        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        149     149     0.354218        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        152     152     0.133656        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        162     162     0.0802391       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        169     169     0.153333        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        174     174     0.0613166       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        196     196     0.0590856       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        201     201     0.0425369       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        212     212     0.0337899       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        245     245     0.0676991       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        279     279     0.125459        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        280     280     0.217158        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        283     283     0.0896879       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        288     288     0.411248        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        291     291     0.25515 .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        296     296     0.0738098       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        303     303     0.385727        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        305     305     0.21501 .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        310     310     0.345149        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        319     319     0.320222        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        335     335     0.10952 .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        350     350     0.028412        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        378     378     0.267806        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        382     382     0.201503        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        386     386     0.0376249       .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        400     400     0.203522        .       .
SEQUENCE        netOGlyc-4.0.0.13       CARBOHYD        410     410     0.179891        .       .
```

Ativar o Windows
Acesse Configurações para ativar o Windows.

Explain the output. Go back.

ExPASy Bioinformatics Resource Portal

Compute pI / Mw

Home | Contato

Compute pI / Mw

Teórica pI / Mw (média) para a seqüência inserida pelo usuário:

```
       1 0         2 0         3 0         4 0         5 0         6 0
LCIRVTSFVP GAALARGAAR AVLAIAVALC ALAGAPALAG PLDDPRSDAF YTPPQPLPSG

       7 0         8 0         9 0        10 0        11 0        12 0
PHGTLIRSRP FIPVGLLAYG WQIMETYKST DVNGLPIAVT GTVLVPFAPW LAGARPVIAW

      13 0        14 0        15 0        16 0        17 0        18 0
APGTQGQADN CAPSHQYALG TEYEATVAGA TPATLARGWA IAMETTDYQG LGTPGDHTWG

      19 de 0        20 0        21 de 0        22 de 0        23 0        24 0
IGRAEGQAVL DAALAAQQLS GAGLSANAPV GIMETGYSQG GHAAAFAAQL QPANAPGLNV

      25 0        26 0        27 0        28 0        29 0        30 0
QGIAAGAGPF SIADVYANVN GGPFGGVGPI ALMETGLNAA YPELGLSSIL TPYGQSVITD

      31 0        32 0        33 0        34 0        35 0        36 0
FRGTKCVFDV TASYPFLSDA VLVQAPTILN RADWLARMET AQNQSGNGVP AVPALVYAGS

      37 0        38 0        39 0        40 0        41 0        42 0
LDEIIPFGQN QKLFAAWCAR GGNVAFRTIG ATDHATGLLL GLPVALDWME TTQRFGGVPA

VSDCP
```

Teórica pI / Mw: 4,86 / 43373,32