

# Expressão e caracterização bioquímica de uma lipase identificada a partir de DNA metagenômico

Fernanda Pinhelli, Marco Aurélio S. de Oliveira, Helisson Faoro, Fábio O. Pedrosa, Emanuel M. de Souza\*\*

\*[pinhellifernanda@gmail.com](mailto:pinhellifernanda@gmail.com)

\*\*[souzaem@ufpr.br](mailto:souzaem@ufpr.br)

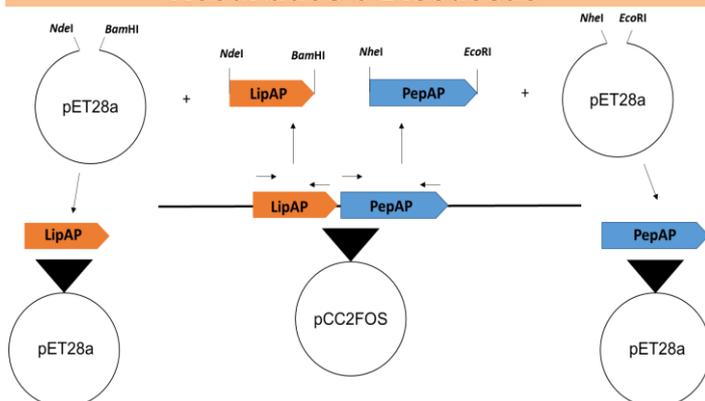
Núcleo de Fixação de Nitrogênio- Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular- UFPR

Palavras Chave: *Metagenômica, Lipase, Peptidase.*

## Introdução

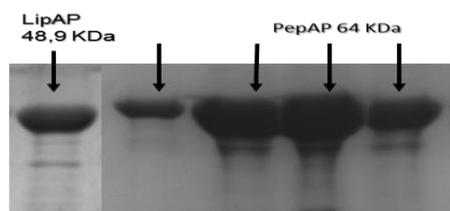
Durante a prospecção por lipases em uma biblioteca metagenômica construída a partir de amostras de solo da floresta atlântica foi identificado um clone com atividade lipolítica. A análise através de mutagênese com transposon e desaparecimento do fenótipo indicou que atividade depende de dois genes: O primeiro codifica uma lipase (LipAP), formando um operon com outro gene, que codifica uma provável peptidase (PepAP). A lipase parece pertencer a uma nova família de enzimas, cuja atividade depende da peptidase. O objetivo geral deste trabalho foi superexpressar e caracterizar bioquimicamente as proteínas codificadas por ambos os genes.

## Resultados e Discussão

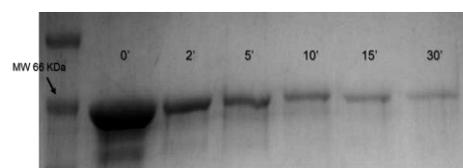


**Figura 1.** Clonagem de *LipAP* e *PepAP* no vetor de expressão pET28a.

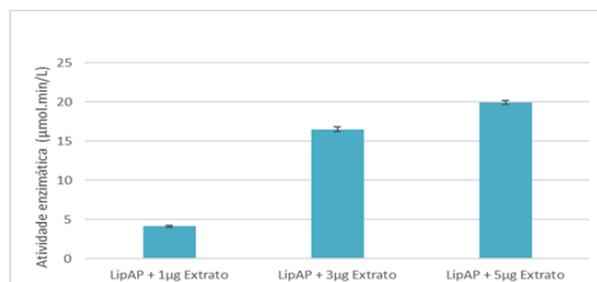
As proteínas LipAP e PepAP foram expressas em *E.coli* BL21(DE3) em seguida foram purificadas por cromatografia de afinidade (Figura 2). E submetidas a ensaios de atividade catalítica como mostrado nas figuras 2 e 3. Além disso, foi gerado um espectro de CD para predição da estrutura secundária da LipAP.



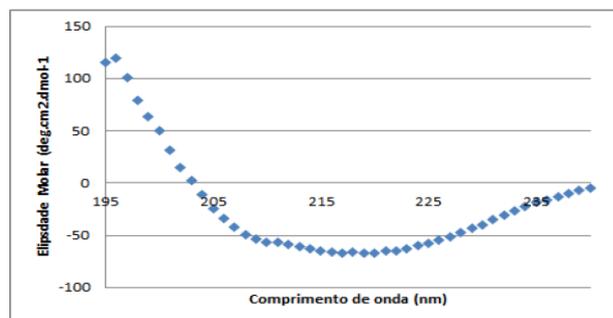
**Figura 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante da purificação da LipAP e PepAP.



**Figura 3.** Cinética de autodigestão de PepAP. Apresenta a proteína resultante após incubação por 30 minutos.



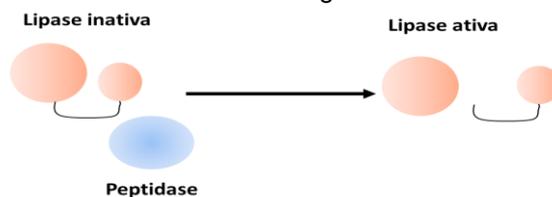
**Figura 4.** Ensaio de atividade LipAP com extrato de peptidase. O eixo das ordenadas corresponde a concentração de *p*-nitrofenil formado, após a incubação de 1µg de LipAP e 1, 3 e 5 µg de extrato de *E. coli* expressando a PepAP.



**Figura 5.** Espectro de CD da Proteína LipAP. O espectro da proteína LipAP (0,5mg/mL) foi obtido em água a 20°C e acumulado 3 vezes.

## Conclusões

A atividade de LipAP é maior na presença do extrato bruto de peptidase. Indicando ativação de acordo com o mecanismo mostrado na Figura 6.



**Figura 6.** Atividade da LipAP sendo ativada pela PepAP.

A PepAP possui atividade auto-hidrolítica e após 30 minutos de incubação 50% da proteína foi degradada. A predição da estrutura secundária da LipAP indica que a mesma possui 69,6% de  $\alpha$ -hélice e 5,9% de  $\beta$ -folha, resultado que está de acordo com o espectro CD obtido.

## Agradecimentos

