



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Análise da produção de uma amidase recombinante de *Pseudomonas aeruginosa*

Patrícia Alexandra Teixeira Borges
(Licenciatura em Engenharia Química)

TRABALHO FINAL DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM ENGENHARIA QUÍMICA

Orientadores:

Doutor Amin Mahomed Vishangi Karmali
Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

Júri:

Doutor João Fernando Pereira Gomes
Doutor Amin Mahomed Vishangi Karmali
Doutora Rita Isabel Dias Pacheco
Doutor Luís António Paulino Passarinha
Doutora Sónia Alexandra Almeida Martins

DEZEMBRO DE 2008



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Análise da produção de uma amidase recombinante de *Pseudomonas aeruginosa*

Patrícia Alexandra Teixeira Borges
(Licenciatura em Engenharia Química)

TRABALHO FINAL DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM ENGENHARIA QUÍMICA

DEZEMBRO DE 2008

Chegado este momento é minha intenção expressar os mais sinceros agradecimentos às várias pessoas que em diferentes momentos, deram o seu contributo para a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Amin Karmali, orientador desta dissertação, responsável pelo Laboratório de Bioquímica e Coordenador do Centro de Investigação de Engenharia Química e Biotecnologia do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, o apoio e orientação prestados durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Rita Pacheco, também minha orientadora do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa gostaria de manifestar o meu reconhecimento pelo apoio, incentivo, simpatia e disponibilidade demonstrada em todas as fases deste trabalho.

Aos membros da Direcção do Centro de Investigação de Engenharia Química e Biotecnologia do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, agradeço as condições cedidas para a realização deste trabalho nas instalações do CIEQB.

À Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro e ao Pedro, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela cedência de utilização do liofilizador e disponibilidade demonstrada.

À Professora Mestre Maria Júlia Ferreira e ao Victor, do Laboratório de Metalurgia e Materiais do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, pelo consentimento de utilização do microscópio de luz polarizada e apoio prestado.

Ao Professor Doutor José Prata, responsável do Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa e à Engenheira Patrícia pelas condições disponibilizadas para a preparação das amostras para análise no FTIR.

À Engenheira Magda e Sandra Silva do Laboratório de Bioquímica do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa pelas sugestões, entusiasmo e apoio que sempre demonstraram.

Gostaria ainda de manifestar o meu agradecimento às minhas amigas e colegas do Laboratório de Bioquímica do ISEL: Ana Filipa, Ana Rita e Sara pela cumplicidade, força e amizade em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

À Engenheira Dulce Gil e à Inês pela força e pelos bons momentos.

A todos os meus amigos e colegas do ISEL pelo encorajamento constante e pelos bons momentos.

Aos meus pais pelo apoio e compreensão que têm sempre dedicado ao longo da minha vida.

Ao Paulo pela força e encorajamento que me transmitiu e que jamais esquecerei.

Resumo

O presente trabalho consistiu na optimização da produção da amidase (EC.3.5.1.4) recombinante de *Escherichia coli* cujo gene foi isolado de *Pseudomonas aeruginosa* 8602.

O efeito na agregação do enzima *in vivo* de diversos parâmetros de crescimento, tais como concentração de IPTG, temperatura de incubação e 3 % de etanol, foi estudado por combinação da actividade enzimática com a espectroscopia de FTIR. Os resultados demonstraram que ocorreu a formação de amidase agregada na forma de corpos de inclusão em todas as condições de crescimento. A actividade enzimática máxima obtida na fracção solúvel ocorreu para a condição de 0,40 mM IPTG com Etanol a 37°C enquanto que nas fracções insolúveis a actividade enzimática máxima obtida foi para a condição de 0,70 mM IPTG com Etanol a 25°C. Verificou-se ainda que o etanol nas condições de crescimento de 25°C permitiu uma elevada expressão de amidase, mas que agregou numa forma biologicamente activa apresentando para determinadas condições um aumento de 60 % de actividade específica em relação à fracção solúvel.

A espectroscopia de FTIR foi utilizada para o estudo de possíveis alterações estruturais da amidase produzida nas diversas condições de crescimento. Constatou-se assim que para todas as condições de crescimento, a amidase agregou na forma de corpos de inclusão devido a aumento de folhas- β agregadas resultante de um aumento de interacções intermoleculares comparativamente ao enzima purificado. De um modo geral as condições a 25°C formam maior quantidade de folhas- β agregadas que as condições a 37°C, principalmente na presença de etanol.

Verificou-se ainda que os corpos de inclusão das condições de crescimento de 37°C apresentam uma estrutura secundária mais semelhante com a solução de amidase purificada relativamente às condições de 25°C. No entanto, as condições de 37°C apresentam agregados com menor actividade possivelmente devido à ocorrência de interacções intermoleculares associadas a uma estrutura secundária mais semelhante à nativa.

A solubilização não desnaturante da amidase presente nos corpos de inclusão foi efectuada com sucesso na presença de L-Arginina obtendo-se maior rendimento de solubilização para as condições a 37 °C, comprovando a menor quantidade de interacções intermoleculares nestes agregados e uma estrutura secundária do enzima agregado semelhante à nativa.

Palavras-chave: amidase recombinante; *Escherichia coli*; corpos de inclusão; efeito do etanol; espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR); L-Arginina.

Abstract

This work reports the optimization of production of a recombinant amidase (E.C.3.5.1.4) in *Escherichia coli* whose gene was isolated from *Pseudomonas aeruginosa* 8602. The effect of several parameters such as temperature incubation, IPTG induction and ethanol shock on the enzyme aggregation *in vivo* was investigated by combining enzyme activity with FTIR spectroscopy. The results have revealed the formation of inclusion bodies at all the experimental conditions with the highest yield of soluble amidase relatively to other proteins obtained for the condition at 37°C using 0,40 mM IPTG to induce growth with ethanol. The highest yield of insoluble amidase biologically active was obtain for the condition 0,7 mM IPTG at 25 °C with ethanol. Our findings showed that the addition of ethanol in LB ampicillin culture medium at 25°C allowed the production of highest levels of amidase but it aggregated quantitatively in a biological active form and exhibited in some conditions a 60 % increase in specific activity when compared with the soluble form of the enzyme.

The FTIR spectroscopy was used to elucidate changes in the structure of amidase occurring with the different conditions employed for enzyme production. Our findings revealed that for all the growth conditions, amidase aggregated as inclusion bodies due to an increase in the aggregates of β -sheet structure content as a result of stronger intermolecular interactions comparably to native enzyme. In general, the conditions at 25 °C exhibit inclusion bodies with higher levels of β -sheet contents in the aggregates than at 37 °C growth conditions mainly in the presence of ethanol.

Furthermore the conditions at 37°C revealed an aggregated enzyme apparently in a native-like secondary structure. However such conditions presented a lower activity possibly due to intermolecular interactions associated with the native-like secondary structures.

Nondenaturing solubilization of the aggregated amidase was achieved by using L-Arginine with higher yield of solubilization at 37°C, demonstrating the lower content of intermolecular interactions in these inclusion bodies with a native-like secondary structure.

Keywords: Recombinant amidase; *Escherichia coli*; inclusion bodies; ethanol effect; Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR); L-Arginine.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VII
Índice	VIII
Lista de Abreviaturas	X
1- Introdução	2
1.1- <i>Escherichia coli</i>	2
1.2- Biotecnologia	3
1.3- Amidase da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.3.1- Introdução	4
1.3.2- Perspectiva Histórica	6
1.3.3- Superfamília das Nitrilases	6
1.3.4- Aplicações da amidase	8
1.4- Corpos de Inclusão	9
1.4.1- Introdução	9
1.4.2- Formação de corpos de inclusão	10
1.4.3- Propriedades dos corpos de inclusão	10
1.4.4- Inibição de formação de corpos de inclusão	11
1.4.5- Vantagens dos corpos de inclusão	13
1.5- Natureza das interacções envolvidas na agregação	13
1.5.1- Espectroscopia de Infravermelho de Transformadas de Fourier	15
1.5.1.1- Modos de Amidas	16
1.5.1.2- Estrutura dos corpos de inclusão	17
1.6- Solubilização dos corpos de inclusão	18
2- Materiais e Métodos	22
2.1- Materiais	22

2.2- Métodos	22
2.2.1- Estirpe bacteriana	22
2.2.2- Condições de crescimento das células de <i>E.coli</i> pKK WT	22
2.2.3- Preparação das fracções celulares solúveis e insolúveis	23
2.2.4- Doseamento de actividade enzimática da amidase	23
2.2.5- Doseamento da concentração de proteína total	24
2.2.6- Electroforese em Gel de Poliacrilamida	25
2.2.6.1- Electroforese em condições desnaturantes	25
2.2.6.2- Electroforese em condições não desnaturantes	25
2.2.7- Extracção e purificação da amidase solúvel	26
2.2.7.1- Obtenção do extracto celular	27
2.2.7.2- Desnaturação térmica	27
2.2.7.3- Cromatografia de Afinidade	27
2.2.7.4- Ultrafiltração	28
2.2.8- Espectroscopia de Infravermelho de Transformadas de Fourier	28
2.2.9- Solubilização da amidase nos corpos de inclusão	29
3- Resultados e Discussão	32
3.1- Efeito de parâmetros (ambientais) na produção de amidase	32
3.2- Purificação da amidase	42
3.3- Análise espectroscópica por FTIR da agregação	46
3.4- Solubilização dos corpos de inclusão com L-Arginina e Gdn-HCl	64
4- Conclusões	75
5- Perspectivas Futuras	79
6- Bibliografia	81

Lista de abreviaturas

AgNO ₃	nitrato de prata
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
Abs ₂₈₀	absorvância a 280 nm
Abs ₄₉₀	absorvância a 490 nm
Abs ₆₅₅	absorvância a 655 nm
LB	Luria Bertani
ET	extracto celular total
IS	fracção insolúvel
S	fracção solúvel
IS'	fracção insolúvel obtida a partir da fracção IS
S'	fracção solúvel obtida a partir da fracção IS
PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida
SDS	dodecilo sulfato de sódio
BSA	albumina do soro bovino
rpm	rotações por minuto
Cys	cisteína
Glu	ácido glutâmico
Lys	lisina
Asp	ácido aspártico
Tris-HCl	trishidroximetilaminometano
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho de Transformadas de Fourier
FeCl ₃	cloreto de ferro
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
C _{proteína}	concentração de proteína
IR	espectroscopia de infravermelho

TMEGB	Tampão Tris-HCl 20mM pH 7,2 contendo 1 mM β -mercaptoetanol, 1 mM de EDTA, 10% de glicerol e 1mM de benzamidina
Gdn-HCl	guanidina hidrocloreada
Mr	massa molecular relativa

Capítulo I

Introdução Teórica

1- Introdução Teórica

1.1- Escherichia coli

As bactérias são organismos procariotas e estão presentes no solo e na água ou vivem em simbiose com outros organismos. Reproduzindo-se assexuadamente por divisão binária, a sua actividade mais importante é a produção de mais bactérias.

Existem bactérias nocivas, mas outras são úteis tanto para animais como para seres humanos. Existem por exemplo, bactérias úteis na biorremediação, ou seja, no tratamento de águas residuais (ex: *Planctomyces*) e outras foram utilizadas com sucesso para limpar derrames de petróleo (ex: *Alcanivorax borkumensis*). Através de uma combinação com leveduras, as bactérias também são utilizadas para produzir alimentos fermentados, como o queijo (ex: *Lactococcus lactis*) ou iogurte (ex: *Lactobacillus bulgaricus*). Outro aspecto positivo das bactérias é a capacidade de viverem em simbiose com outros organismos, ajudando por exemplo no processo da digestão ^[1].

A *Escherichia coli* (normalmente abreviada para *E. coli*) cujo nome deriva do seu descobridor Theodor Escherich, é um microrganismo procariota gram negativo, relativamente pequeno e simples. A sua dimensão típica é de 0,5 µm de diâmetro e 1,5 µm de comprimento, apresentando forma de bastonete (Figura 1) ^[2].

A *E.coli* é uma das principais espécies de bactérias que vivem no intestino de animais (aves e mamíferos) sendo indispensáveis na digestão dos alimentos ^[2,3].

Dotada de enorme capacidade de sobreviver fora do seu ambiente natural e de se reproduzir rapidamente, é utilizada com sucesso na Biotecnologia para a produção de variadas substâncias ^[3].

Devido ao conhecimento da sua sequência genética e dos mecanismos do seu metabolismo, a *E.coli* é frequentemente utilizada como organismo modelo em investigação. Tal facto deve-se a vários factores ^[4]:

- ciclo de vida rápido em relação aos organismos superiores;
- apresenta menor número de genes em relação aos organismos superiores;
- apresenta inúmeros mecanismos metabólicos semelhantes aos organismos superiores.

No presente trabalho será utilizada a *Escherichia coli* JM 109 como hospedeira do plasmídeo pKK WT onde o gene da amidase da *Pseudomonas aeruginosa* 8602 foi clonado. A estirpe de *E.coli* JM 109 é ideal para clonagem uma vez que possui mecanismos de prevenção de digestão de DNA heterólogo. Para além disso, permite a

extracção de DNA plasmídico com elevada estabilidade e qualidade pois possui a recombinação minimizada [5].

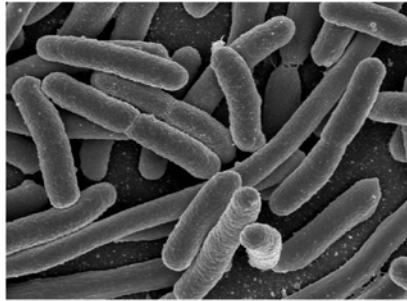


Figura 1 – Microscopia electrónica de varrimento de células de *E.coli*. Adaptado da referência [6].

1.2- Biotecnologia

A grande fonte de inovação em biotecnologia das últimas décadas tem sido sem dúvida a utilização de microrganismos no desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante. Esta tecnologia tem aberto inúmeras perspectivas de produção e comercialização de grandes quantidades de compostos com potencialidades de aplicação em diversas áreas como a medicina, investigação e agricultura [1,7,8].

Nas bactérias, o genoma apresenta uma organização mais simples que a organização dos cromossomas nos organismos eucariotas.

Em geral, a maioria dos organismos procariotas apresentam um genoma constituído por um cromossoma único e que corresponde a uma cadeia circular de DNA. Nestes organismos existem processos que conduzem à troca de material genético que, por serem geradores de recombinação genética, são passíveis de uso controlado a nível laboratorial com fins biotecnológicos [1].

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante *in vitro* (rDNA) possibilita um enorme avanço na direcção do conhecimento científico e do potencial de inovação (Figura 2) [1,9]. A tecnologia de DNA recombinante *in vitro* consiste na criação de novas combinações de material genético a partir de moléculas de DNA que podem ser de origem diferente. Estas moléculas são introduzidas nos organismos hospedeiros adequados, mesmo que não sejam os hospedeiros naturais, onde poderão ser expressas e multiplicadas [1].

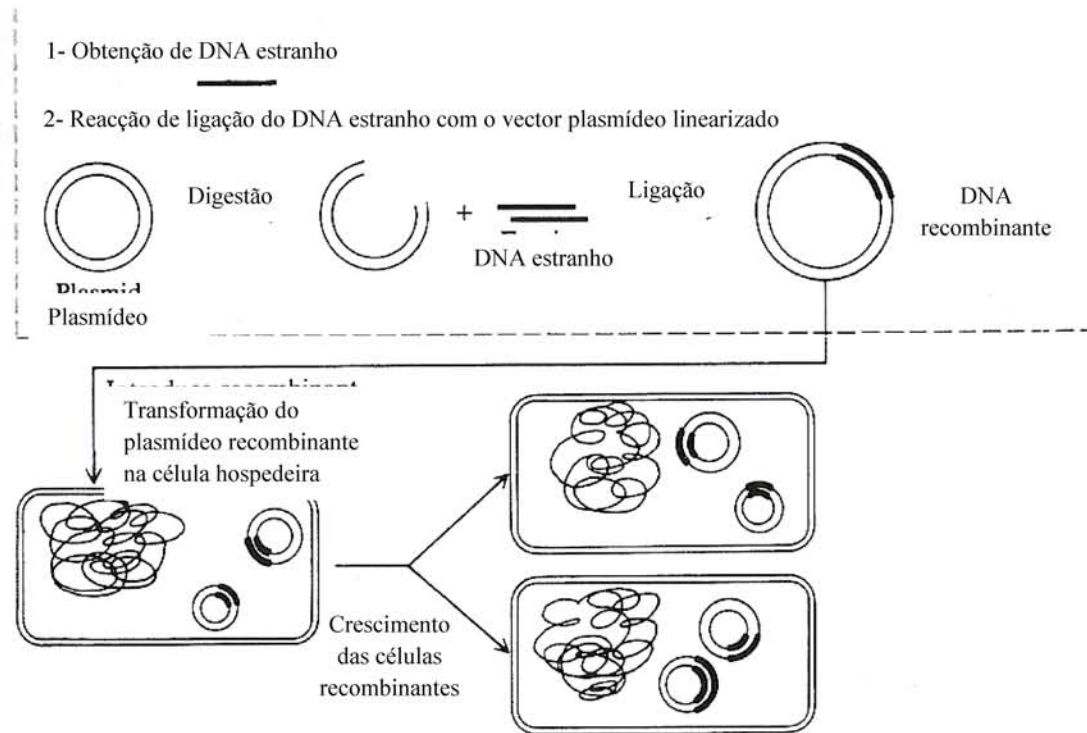


Figura 2 - Ilustração dos principais passos da tecnologia de DNA recombinante. Adaptado da referência [4].

O DNA estranho que codifica a proteína recombinante deverá ser colocado sob a acção de um promotor forte de modo a promover uma transcrição rápida da sequência codificante (gene), com o objectivo de superproduzir a proteína que, consequentemente poderá atingir valores entre 10 e 30% da proteína total. O promotor *lac* (*operão da lactose*), induzido por isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG), é um dos mais utilizados na superprodução de proteínas recombinantes [1].

Em 1978 foi produzido o primeiro composto a partir de tecnologia DNA recombinante, a insulina, e posteriormente a vacina da hepatite B e hormonas de crescimento humano [1].

1.3 – Amidase da *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.1 – Introdução

A maior parte das amidases conhecidas provêm de bactérias pertencentes aos seguintes géneros: *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Blastobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Helicobacter*, *Lactobacillus* e *Methylophilus* [10].

De acordo com o sistema de nomenclatura da EC (*Enzyme Commission*), que utiliza como critério a especificidade de substrato e características físico-químicas, as amidases são classificadas como amidohidrolases ^[10].

As amidohidrolases podem ser divididas em duas categorias, nomeadamente E.C. 3.5.1 e 3.5.2. Pertencem à categoria 3.5.2, as amidases que hidrolisam amidas, arilamidas, α -aminoamidas e α -hidroxiamidas. A propianamida, isobutiramida, valeramida e hexanoamida são os substratos que são mais rapidamente hidrolisados pelas amidases pertencentes a esta categoria ^[10].

Na categoria E.C. 3.5.1, encontram-se as amidases alifáticas que hidrolisam apenas amidas alifáticas de cadeia curta. A acetamida, acrilamida e propianamida são os substratos mais rapidamente hidrolisados pelas amidases pertencentes a esta categoria ^[10].

A acilamida amidohidrolase EC 3.5.1.4 (amidase alifática da *Pseudomonas aeruginosa*) pertence a esta categoria e catalisa a hidrólise de ligações das amidas alifáticas no correspondente ácido orgânico e amónia ^[10,11,12].

As reacções catalisadas por este enzima foram resumidas por Brown *et al* da seguinte forma ^[13]:

Tipo de reacção	Reacção
<i>Hidrólise de amida</i>	$RCONH_2 + H_2O \rightarrow RCOOH + NH_3$
<i>Transamidação</i>	$RCONH_2 + NH_2OH \rightarrow RCONHOH + NH_3$
<i>Amidação de ácido</i>	$RCOOH + NH_2OH \rightarrow RCONHOH + H_2O$
<i>Hidrólise de éster</i>	$RCOOR' + H_2O \rightarrow RCOOH + R'OH$
<i>Amidação de éster</i>	$RCOOR' + NH_2OH \rightarrow RCONHOH + R'OH$

Tabela 1- Reacções catalisadas pela amidase alifática de *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptado da referência ^[13].

Foi também demonstrado que, apesar do enzima catalisar a hidrólise de ésteres alifáticos de cadeia curta, a velocidade de tais reacções é muito mais baixa que as reacções de hidrólise de amidas. ^[13,14]

Além das reacções de hidrolase, a amidase pode ainda catalisar reacções de transferase em que há transferência do grupo acilo de amidas de cadeia curta, de ácidos ou ésteres

para uma amina, como a hidroxilamina, resultando na síntese de ácidos hidroxâmicos [15,16,17,18].

1.3.2- Perspectiva Histórica

A primeira evidência acerca da síntese da amidase foi demonstrada por Den Dooren de Jong em 1926, que descobriu que algumas espécies de *Pseudomonas* utilizavam amidas alifáticas como única fonte simultânea de carbono e azoto, nomeadamente a *Pseudomonas aminovorans* que utiliza para crescimento a propionamida, caproamida, lactamida ou succinamida [19].

A amidase alifática (acilamida amidohidrolase; EC 3.5.1.4) da *Pseudomonas aeruginosa* foi descoberta por Kelly e Clarke em 1962. Posteriormente, em 1964, Kelly e Kornberg purificaram parcialmente a amidase e demonstraram que este enzima pode também catalisar a transferência do grupo acilo de uma amida para uma hidroxilamina de modo a formar-se o correspondente acilohidroxamato [20,21].

A sequência de aminoácidos da amidase selvagem começou a ser estudada em 1973 e em 1978 a maior parte desta sequência é conhecida, no entanto, apenas em 1987 Brammar *et al* publicaram a sequência de aminoácidos da amidase da *Pseudomonas aeruginosa* selvagem 8602 [22].

Também em 1987, Brammar *et al* elucidaram a sequência nucleotídica de 1038 nucleótidos do gene estrutural *amiE*, o qual codifica cada monómero da estrutura hexamérica da amidase alifática da *Pseudomonas aeruginosa*. A proteína codificada contém 346 aminoácidos possuindo por subunidade, 7 resíduos de histidinas, 9 de cisteínas e 5 de triptofano [22].

1.3.3- Superfamília das Nitrilases

Devido à semelhança na sequência de aminoácidos a amidase pode ser agrupada filogeneticamente com um grupo de famílias de enzimas (nitrilases, acilo transferases, ureases e nitrilo hidratases) denominada de superfamília de nitrilases [23].

As nitrilases são responsáveis por reacções de hidrólise dos nitrilos ($R - C \equiv N$) directamente em ácidos carboxílicos e amónia, sem a formação de uma amida intermédia. A nitrilase pode ser encontrada em plantas, animais, fungos e muitos tipos de bactérias como *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Klebsiella*, *Nocardia* e *Bacillus pallidus* [24,25,26].

No entanto, a reacção de conversão dos nitrilos em ácidos carboxílicos e amónia também poderá ser efectuada por outros enzimas pertencentes à superfamília das nitrilases, nomeadamente as nitrilo hidratases que catalisam a reacção de conversão dos nitrilos em amidas conjuntamente com as amidases que hidrolisam as amidas no correspondente ácido carboxílico e amónia (Figura 3) [23,24,25].

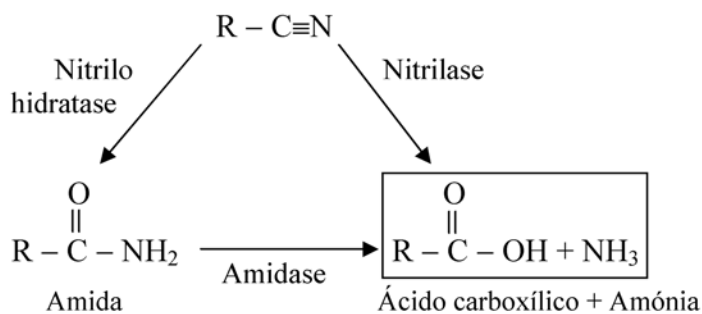


Figura 3 – Reacções catalisadas pelos enzimas da superfamília das nitrilases.

A superfamília das nitrilases tem um resíduo de cisteína que funciona como centro activo nucleófilo interagindo com o grupo carbonilo (C=O) do substrato amida de modo a formar um complexo acilo intermediário, tal como confirmado por Farnaud *et al* [23,24]. A amidase utiliza como centro activo nucleófilo, o Cys¹⁶⁶ que está localizado no fundo da bolsa catalítica (“pocket”), nomeadamente numa volta (“turn”) entre uma folha-β e uma hélice-α, conhecida como “cotovelo” nucleófilo [24,27].

Novo *et al* propuseram para a amidase de *Pseudomonas aeruginosa* a existência de uma tríada catalítica, composta pelos resíduos Cys¹⁶⁶-Glu⁵⁹-Lys¹³⁴ confirmada posteriormente na publicação da estrutura tridimensional da amidase por Andrade *et al* em 2007 [27,28].

A amidase nativa de *Pseudomonas aeruginosa* tem um peso molecular de aproximadamente 230 KDalton, contendo 6 subunidades idênticas com uma massa molecular de 38 KDa [13]. Cada subunidade apresenta um arranjo de quatro camadas, tipo “sandwich” αββα (33% hélices-α e 22% folhas-β) com duas folhas-β internas (Figura 4) [27].

No entanto, relativamente às outras nitrilases a amidase apresenta uma folha-β adicional na cadeia N-terminal e uma longa cadeia C-terminal como se pode verificar na Figura 4-A [27].

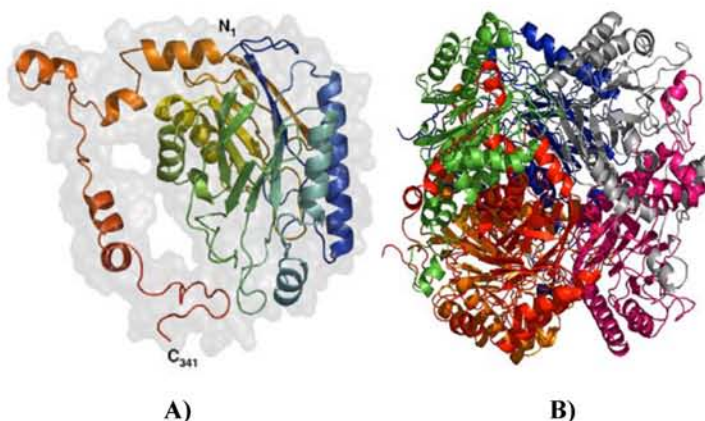


Figura 4- A) Representação esquemática do monómero da amidase de *P. aeruginosa* colorido de azul (N-terminal) a vermelho (C-terminal), com o envelope molecular em cinzento. O monómero apresenta uma estrutura tipo “sandwich” $\alpha\beta\alpha$, com uma região C-terminal estendida incluindo diversos segmentos hélices- α . B) Representação esquemática do hexâmero biologicamente activo da amidase, mostrando a forte associação dimérica envolvendo enrolamentos cadeias C-terminais. Adaptado da referência ^[27].

1.3.4- Aplicações da amidase

A amidase tem um enorme interesse em diversas áreas, nomeadamente a nível ambiental, medicina e neurobioquímica, fisiologia de plantas, e indústria farmacêutica [29,30,31].

O sucesso deste enzima deve-se à variedade de reacções que pode catalisar e à diversidade de especificidade, catalisando reacções onde amidas, ácidos e ésteres podem ser usados como substratos. No presente trabalho será estudada uma reacção de transferase em que há transferência do grupo acilo de amidas de cadeia curta para uma amina, resultando na síntese de ácidos hidroxâmicos.

Os ácidos hidroxâmicos, de fórmula geral R-CO-NHOH, formam com determinados iões metálicos, quelatos muito estáveis. Além disso, estes ácidos são constituintes de determinados compostos, nomeadamente, aditivos alimentares, factores de crescimento, antibióticos, inibidores de tumores, agentes antifúngicos, factores de divisão celular e inibidores de enzimas, nomeadamente metaloproteinases que estão envolvidas em doenças humanas e de animais [27,32,33,34].

A especificidade para com determinado substrato poderá ser alterada através de mutações no gene que o codifica permitindo a produção de enzimas com novas

propriedades cinéticas. Tal capacidade poderá ser utilizada na síntese de uma vasta gama de produtos e/ou exclusão de determinados substratos [35,36,37,38].

A amidase tem sido intensivamente estudada. No entanto, o papel que actualmente pode desempenhar nas várias áreas ainda não está totalmente explorado e apenas nos últimos anos tem havido um conhecimento cada vez maior sobre aspectos relacionados com a estrutura e evolução deste enzima e dos mecanismos catalíticos da reacções *in vitro* catalisadas pela amidase [10,12].

No presente trabalho, a amidase utilizada foi a amidase selvagem da *Pseudomonas aeruginosa* (E.C. 3.5.1.4.) produzida a partir de uma estirpe recombinante de *Escherichia coli* pKK WT.

Progressos recentes levaram ao melhoramento de estirpes de *E. coli*, permitindo alterar as suas características de produção, e reforçando, por isso, o seu papel como o hospedeiro mais utilizado na superprodução de proteínas recombinantes [39].

O gene da amidase *amiE* foi introduzido na *E. coli* JM 109 pelo plasmídeo pKK WT, por tecnologia de DNA recombinante, o que melhorou substancialmente a produção deste enzima e possibilitou a sua superexpressão [40].

1.4- Corpos de Inclusão

1.4.1- Introdução

A superexpressão de proteínas recombinantes em bactérias é um método simples para a obtenção de grandes quantidades da proteína que se pretende para aplicações comerciais ou em investigação. Geralmente as bactérias produzem grandes quantidades de proteínas recombinantes, e no caso particular da *Escherichia coli* este é um processo rápido [41,42,43,44,45].

Contudo, a superexpressão apresenta alguns inconvenientes nomeadamente o facto de que, quando um novo polipéptido sintetizado é reconhecido pela célula poderá ocorrer um ataque proteolítico à proteína e esta ser degradada [46].

Mais frequentemente, a superexpressão de proteínas recombinantes resulta em corpos de inclusão, ou seja, a cadeia polipéptidica é sintetizada correctamente pelo ribossoma mas que na vez de se enrolar (“folding”) adquirindo uma estrutura nativa, acumula-se na forma de corpos de inclusão [41,47,48,49].

1.4.2- Formação de corpos de inclusão

Foram sugeridos vários factores contribuintes para a formação de corpos de inclusão na *E.coli*, nomeadamente a elevada concentração de proteína resultante da superexpressão de proteínas recombinantes, pH, temperatura e aumento da agregação dos intermediários parcialmente enrolados devido à sua limitada solubilidade [45,50,51,52].

A razão para a existência de diferentes opiniões no que diz respeito à causa de formação de corpos de inclusão deve-se ao facto de que a solubilidade depende de vários factores tais como: a concentração e ambiente *in vivo*. Sendo assim a solubilidade é resultado de vários factores e estes diferem de proteína para proteína [53,54].

1.4.3- Propriedades dos corpos de inclusão

Os corpos de inclusão encontram-se geralmente no citoplasma (Figura 5), apresentando formas ovais e cilíndricas como pode ser observado na Figura 6 [39,48,55].

Devido à sua capacidade refractária, os corpos de inclusão podem ser visualizados num microscópio de contraste de fases, podendo estes atingir um diâmetro na ordem dos μm e exibir uma estrutura amorfa independentemente da sua localização celular [44,45,56,57].

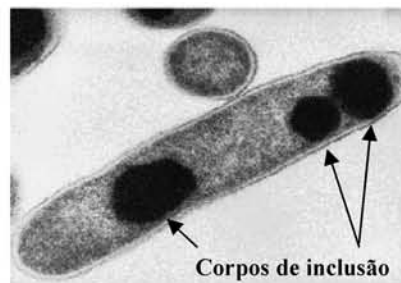


Figura 5- Microscopia electrónica de transmissão de corpos de inclusão nas células de *E.coli*. Adaptado da referência [58].

A superfície dos corpos de inclusão pode ser irregular ou lisa, contudo estudos morfológicos não permitiram estabelecer uma relação entre a forma e as propriedades da superfície com as características da proteína recombinante [48,59,60].

Ao longo dos últimos anos tem surgido a noção de que os corpos de inclusão são um importante fenómeno natural. O interesse tem crescido no sentido da manipulação da estrutura e propriedades das proteínas com o objectivo de prevenir a existência de

corpos de inclusão que possam comprometer a expressão de proteínas recombinantes [61].

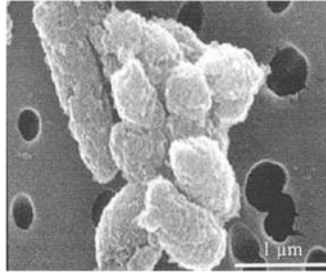


Figura 6- Microscopia electrónica de varrimento de corpos de inclusão. Adaptado da referência [62].

1.4.4- Inibição de formação de corpos de inclusão

Embora não existam métodos gerais de prevenção de corpos de inclusão, existe um número de estratégias que frequentemente são utilizadas e com sucesso, sendo que as mais utilizadas envolvem: a utilização de um hospedeiro diferente ou outra estirpe de *E.coli*, substituições de aminoácidos de modo a suprimir a agregação, reduzir o nível de expressão através da diminuição da temperatura de indução ou utilizar promotores fracos, imobilização e co-expressão de chaperonas (“chaperones”) [41,46,63,64].

Relativamente à temperatura, a formação de corpos de inclusão pode ser reduzida através da diminuição da temperatura de crescimento do microrganismo produtor, uma vez que a velocidade de síntese de proteínas é mais baixa conduzindo a um correcto enrolamento (“folding”) da cadeia polipéptidica da proteína, o que diminui assim a formação de agregados [45,46,65,66].

O correcto enrolamento de proteínas recombinantes de *E.coli* pode ser facilitado através de co-expressão de chaperonas que ajudam a regular a síntese de todas as proteínas de choque térmico, sendo estas uma resposta da célula a situações de stress que ocorram nesta [67,68,69,70].

Quando a *E.coli* é sujeita a perturbações no seu ambiente celular, como por exemplo a exposição a solventes orgânicos (ex: etanol), são sintetizadas cerca de 20 a 30 proteínas de choque térmico de modo a reparar os danos celulares [60,67,71]. Apesar da sequência linear de aminoácidos duma proteína ser um factor determinante na estrutura final do enzima, a execução do processo de enrolamento sob determinadas condições celulares é fortemente dependente das chaperonas moleculares (Figura 7) [53,72,73].

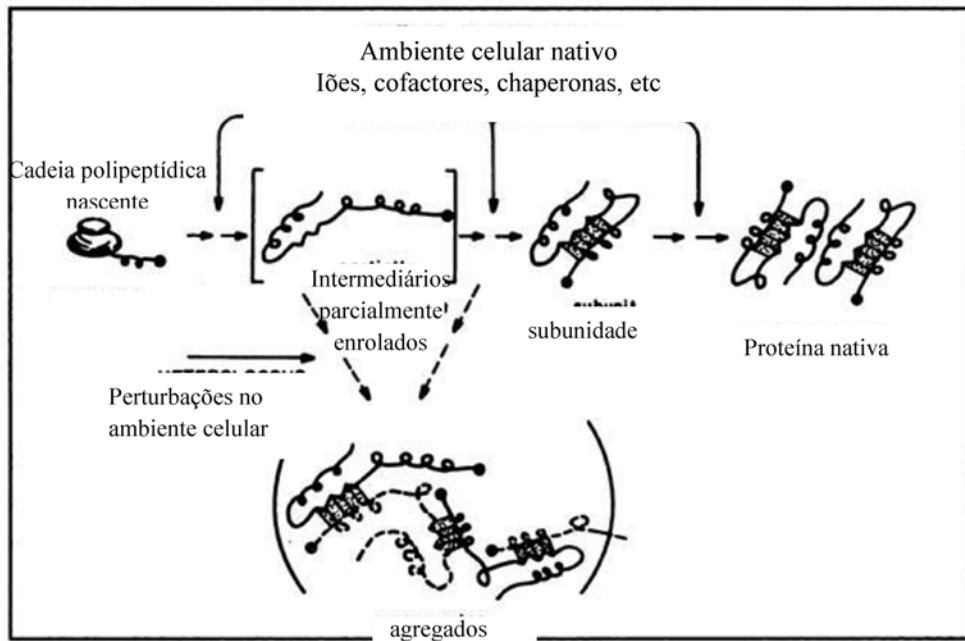


Figura 7- Esquema geral demonstrando intermediários parcialmente enrolados envolvidos num enrolamento correcto ou na formação de agregados. Adaptado da referência ^[53].

Vários estudos demonstraram que a presença de etanol pode induzir a síntese de proteínas de choque térmico, uma vez que este leva à existência de stress na célula [46,67,74].

Thomas e Baneyx constataram que a adição de 3% de etanol ao meio de crescimento, poderá ser uma importante ferramenta na obtenção de proteínas recombinantes solúveis. Assim, em culturas suplementadas com etanol uma vez que a taxa de síntese de proteínas é baixa, esta expressão lenta das proteínas irá facilitar o correcto enrolamento da proteína promovendo um aumento da solubilidade das proteínas recombinantes ^[67].

Um outro factor que permite a diminuição de proteína insolúvel consiste na limitação de indução da expressão do gene no seu promotor. Esta limitação pode ser linearmente regulada através de concentração de indutor (IPTG), logo quanto maior a concentração de IPTG mais rápida será a expressão das proteínas e consequentemente maior a probabilidade de não ocorrer um correcto enrolamento da proteína, levando assim à formação de corpos de inclusão ^[75].

A forte correlação entre a temperatura de crescimento e concentração de indutor, IPTG, com o nível de expressão e a solubilidade de proteína recombinante já foi referida em anteriores estudos por Yang *et al* ^[75].

1.4.5- Vantagens dos corpos de inclusão

Apesar de geralmente se utilizarem métodos para prevenir a formação de corpos de inclusão, existem vantagens na sua existência nomeadamente, i) a expressão de uma elevada quantidade de proteína de interesse, mais de 30% da proteína total em alguns casos, ii) facilidade em separar os corpos de inclusão das células devido às diferenças de tamanho e densidade comparativamente aos contaminantes celulares, iii) pouca degradação das proteínas expressas, iv) resistência à degradação proteolítica por proteases e v) homogeneidade da proteína em interesse que se encontra na forma de corpos de inclusão que ajuda assim, a reduzir o número de passos de purificação necessários para recuperar a proteína biologicamente activa [48,49,76,77]. Assim, os corpos de inclusão podem facilitar uma possível purificação pois estes são altamente homogéneos [57].

Face a estas e às considerações anteriores torna-se imperativo o conhecimento de interacções nas moléculas da proteína de interesse. Estas interacções são responsáveis pelo correcto enrolamento da proteína na estrutura nativa ou em oposição pela existência de uma estrutura desenrolada (“unfolded”), ou ainda pela associação entre moléculas de proteínas formando agregados que poderão ser biologicamente inactivos ou resultar numa proteína biologicamente activa [78].

1.5- Natureza das interacções envolvidas na agregação

A formação de corpos de inclusão segundo Lillie *et al* depende das ligações de pontes dissulfureto que são estabelecidas entre os resíduos de cisteína das várias subunidades dos enzimas multiméricos [44]. Assim, quando o ambiente do citoplasma da bactéria é redutor as ligações dissulfureto não se formam, resultando assim num incorrecto enrolamento e conseqüentemente na agregação [44,77,79]. Mais ainda, na formação destas ligações o número possível de combinações aumenta significativamente com o número de resíduos de cisteína presentes nas cadeias polipeptídicas, o que faria prever um baixo rendimento de um correcto enrolamento pois seria maior a probabilidade de estabelecimento ao acaso de ligações por pontes dissulfureto [77].

Por outro lado, Goldberg *et al* desenvolveram uma teoria sobre a natureza das interacções responsáveis pela agregação durante o enrolamento das proteínas. Estes autores demonstraram que ligações incorrectas por pontes dissulfureto podem não ser a principal causa da agregação, uma vez que existe agregação mesmo quando todos os

resíduos de cisteínas estão bloqueados, ou seja, a formação de corpos de inclusão pode ser independente da existência de resíduos de cisteína nas proteínas recombinantes ^[80].

Posteriormente Eliana Clark confirma esta teoria e refere que a agregação é um fenómeno intermolecular, ou seja, a agregação é devida a interacções intermoleculares entre os resíduos hidrofóbicos de cadeias polipeptídicas de intermediários parcialmente enrolados ^[41]. Segundo Clark, a formação da proteína nativa envolve interacções intramoleculares dos resíduos hidrofóbicos (Figura 8 A)), no entanto a agregação ocorre quando esses resíduos hidrofóbicos interagem uns com os outros através de ligações intermoleculares (Figura 8 B)) ^[41,45,81].

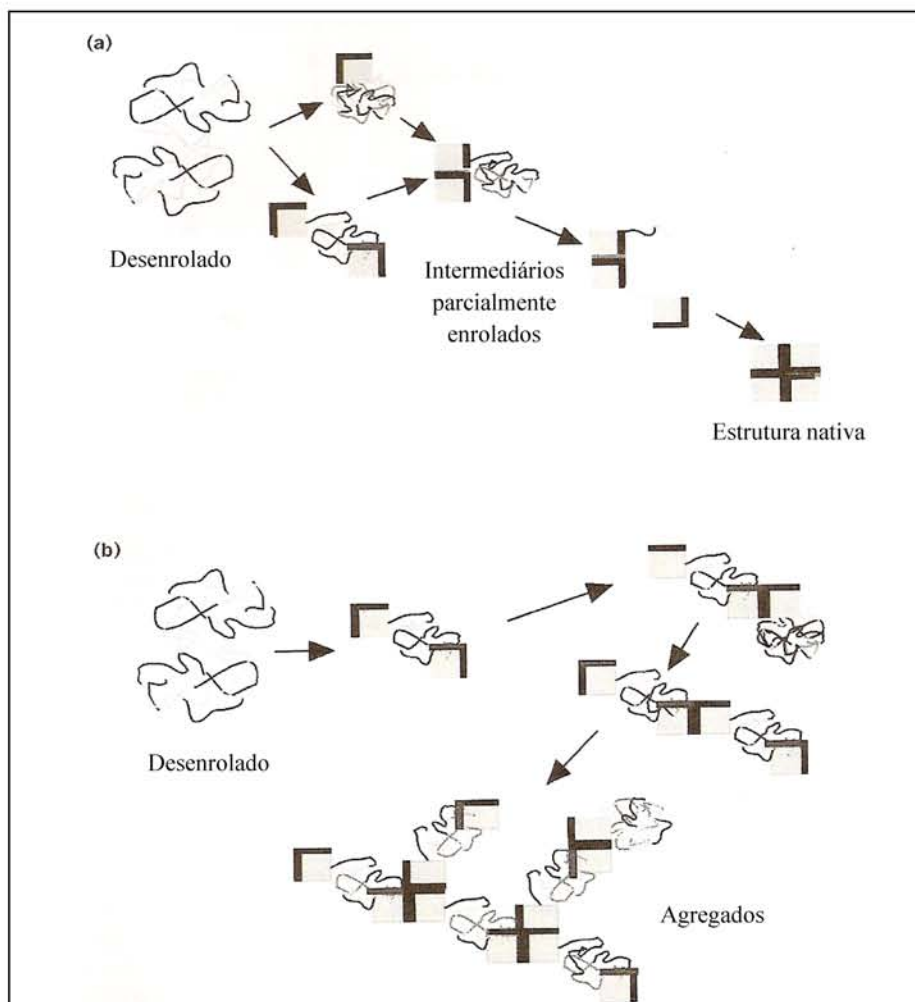


Figura 8- Mecanismos envolvidos na agregação de proteínas. A) Situação normal de enovelamento, em que as superfícies hidrofóbicas (preto) das unidades estruturais interagem de um modo intramolecular de forma a ser atingido o estado nativo. B) Ocorrência de agregação devido a interacções intermoleculares entre superfícies hidrofóbicas. Adaptado da referência ^[45].

Os intermediários parcialmente enrolados possuem uma significativa percentagem de estrutura secundária nativa, mas pouco conteúdo de estrutura terciária nativa. Na agregação, as regiões hidrofóbicas que normalmente se encontram no interior da proteína, estão agora expostas diminuindo a solubilidade da proteína. Assim, estas regiões hidrofóbicas que no estado nativo se agrupam intramolecularmente, podem interagir intermolecularmente originando assim agregados insolúveis [46,60,82,83].

O estudo da estrutura dos corpos de inclusão bem como das interacções intermoleculares responsáveis pela sua existência é frequentemente efectuado recorrendo à espectroscopia de infravermelho.

1.5.1- Espectroscopia de Infravermelho de Transformadas de Fourier (FTIR)

A espectroscopia baseada na utilização de espectros de infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR) tem como vantagens o facto de ser uma ferramenta que permite [15,35,84,85].

- a investigação rápida das reacções, uma vez que um espectro pode ser rapidamente obtido;
- a caracterização estrutural em diversos meios desde grupos funcionais até diferentes materiais biológicos mesmo células intactas;
- a identificação de amostras desconhecidas;
- o controlo de análises de processos.

A espectroscopia de infravermelho tem diversas aplicações em várias áreas, nomeadamente na medicina, análises químicas, biotecnologia e na indústria alimentar [85,86,87].

A cristalografia de raios-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) fornecem uma análise completa da estrutura tridimensional das proteínas apresentando-se como tecnologias importantes na análise estrutural bioquímica, no entanto a espectroscopia de FTIR permite uma análise mais rápida e simples [88,89].

Para além disso, o espectro de determinada proteína obtido por FTIR pode ser obtido a partir de cristais, soluções aquosas, solventes orgânicos, detergentes de micelas e membranas de lípidos [88,89,90]. Existem ainda outras vantagens na utilização do FTIR para análise de proteínas, nomeadamente no que diz respeito à pequena quantidade de proteína necessária (10 µg) e o facto do tamanho da proteína não ser relevante [88].

Uma das dificuldades dos espectros de infravermelho consiste no facto da água absorver na região de absorção da proteína. A absorção da água poderá ser subtraída do espectro da solução de proteína, mas em alternativa poderá ser efectuada uma liofilização para retirar a água existente nas amostras através de um processo de sublimação.

1.5.1.1- Modos de Amidas

A espectroscopia de infravermelho baseia-se na energia das vibrações moleculares e muitas destas vibrações podem ser atribuídas a diferentes grupos químicos tais como, as amidas, ácidos carboxílicos e outros [15,91,92].

A energia da maioria das vibrações moleculares corresponde à região de infravermelho do espectro electromagnético e muitas das vibrações estão relacionadas com ligações específicas ou grupos funcionais, tais como C=O e O-H. Tal facto levou à existência do conceito de frequências características de determinados grupos. As frequências de grupos de maior interesse incluem: C=O, N-H, -COOH, COO⁻, O-H e S-H [88].

O espectro infravermelho de uma proteína é caracterizado por várias regiões de absorção, denominadas de modos de amida. As bandas correspondentes à amida I e II são as mais relevantes para o estudo da estrutura das proteínas (Figura 9) [88].

A banda da amida I associada ao intervalo de frequência entre 1700-1600 cm⁻¹ é a mais utilizada para a análise da estrutura secundária das proteínas (hélices- α , folhas- β , voltas e outras) e está associada à vibração do grupo C=O [88,93,94].

A banda da amida I normalmente associada a várias estruturas secundárias resulta de várias bandas que se sobrepõem e que são correspondentes aos diferentes tipos de estruturas secundárias que constituem a proteína. Técnicas de resolução desta banda, como a desconvolução [95] e a segunda derivada [96], têm permitido a visualização e atribuição de determinadas frequências às diferentes estruturas secundárias em proteínas [97].

As hélices- α estão associadas a maiores frequências 1650-1658 cm⁻¹ comparativamente às folhas- β , 1620-1640 cm⁻¹ devido ao facto do comprimento das ligações por pontes de hidrogénio no grupo carbonilo do esqueleto peptídico nas hélices- α ser maior que nas folhas- β [98].

A região de absorção da amida II geralmente situa-se no intervalo 1500-1600 cm⁻¹, estando associada à vibração do grupo N-H do grupo amida da proteína, sendo pouco afectada pelas vibrações das cadeias laterais. Esta região apesar de não ter sido ainda

muito estudada, apresenta elevada sensibilidade para avaliar alterações na estrutura secundária da proteína [89].

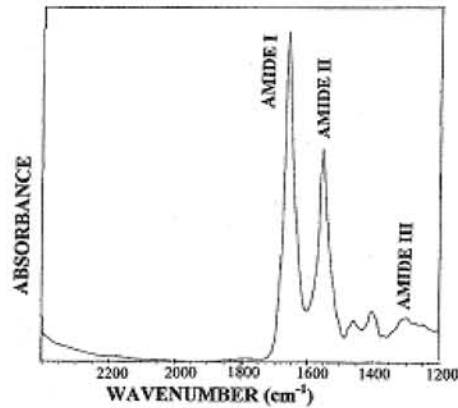


Figura 9- Espectro de absorvância de uma proteína, com as respectivas bandas correspondentes às regiões da amida I, amida II e amida III. Adaptado da referência [88].

1.5.1.2- Estrutura dos corpos inclusão

O FTIR é uma importante ferramenta para análise da estrutura existente nas proteínas agregadas e das interações responsáveis por essa agregação.

Oberg *et al* examinaram a estrutura de corpos de inclusão por espectroscopia de FTIR tendo constatado que estes apresentavam uma quantidade substancial de estrutura secundária idêntica à nativa, nomeadamente cerca de 50-70% [99]. Este facto foi explicado devido à associação dos intermediários parcialmente enrolados que contêm uma quantidade substancial de estrutura nativa [45,100].

A Figura 10 mostra o espectro da forma nativa e agregada da proteína IL-2 (interleucina-2), ilustrando o aumento do conteúdo em folhas- β agregadas, comparativamente à estrutura nativa [45]. As folhas- β agregadas são estabilizadas por ligações de hidrogénio que se estabelecem entre várias unidades, resultando em associações intermoleculares de folhas- β extremamente compactas uma vez que os polipéptidos ricos neste tipo de estrutura, são resistentes à proteólise [57].

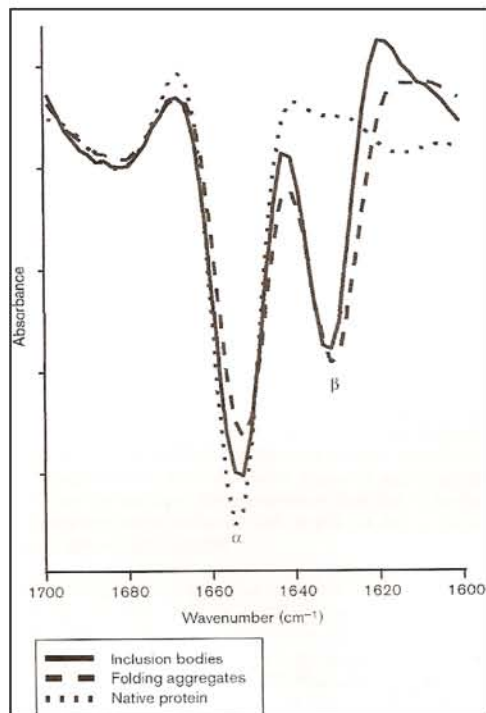


Figura 10- Espectro de FTIR, com representação da segunda derivada na região da amida I da proteína IL-2. Os corpos de inclusão mostram um aumento da estrutura em folhas- β em relação ao estado nativo. Adaptado da referência [45].

1.6- Solubilização dos corpos de inclusão

Quando os corpos de inclusão não possuem actividade biológica, apresentam pouco interesse a nível biotecnológico e a técnica de reenrolamento (“refolding”) da proteína é uma forma de recuperar a proteína no estado solúvel biologicamente activo.

O método mais utilizado para recuperar a proteína que se encontra agregada nos corpos de inclusão, envolve três passos: isolamento e lavagem dos corpos de inclusão, solubilização (com elevadas concentrações de agentes desnaturantes como a ureia ou guanidina hidrocloreada) da proteína agregada causando na maioria dos casos a sua desnaturação e por fim o reenrolamento da proteína solubilizada. Contudo, apesar da eficiência dos dois primeiros passos ser relativamente elevada, a eficiência do reenrolamento é geralmente baixa uma vez que a estrutura da proteína foi desnaturada tornando difícil assumir a sua estrutura nativa, revelando-se assim um método bastante dispendioso para ser utilizado à escala industrial [57,67].

A existência de proteína agregada sob a forma de corpos de inclusão biologicamente activos comprovada por Tokatlidis *et al* deve-se a uma quantidade substancial de estrutura secundária da estrutura nativa presente na proteína agregada [101]. Este facto

poderá facilitar a solubilização da proteína agregada com recurso a fracos solubilizantes (aditivos) e o reenrolamento da proteína na recuperação da sua estatura nativa.

Os surfactantes e detergentes têm provado ser aditivos muito eficientes no reenrolamento da proteína, actuando numa grande variedade de proteínas. No entanto, uma desvantagem consiste na dificuldade de remoção, consequência directa da sua capacidade de se ligarem a proteínas e formar micelas ^[41].

Contudo, existem outros excelentes aditivos com grandes capacidades de reenrolamento, nomeadamente a L-Arginina ou baixas concentrações de agentes desnaturantes (ureia e guanidina hidrocloreada) ^[41,47,102,103].

Contudo, a adição de ureia ou guanidina pode não ser suficiente e a adição de outros aditivos pode ser essencial ^[104].

Os aditivos podem ser classificados em dois grupos, nomeadamente potenciadores de enrolamento (ex: sacarose e sulfato de amónio) que potenciam as interacções proteína-proteína e os designados supressores de agregação (ex: L-Arginina, polietilenoglicol e prolina), que são responsáveis por redução das interacções intermoleculares responsáveis pela agregação ^[104].

Contudo a L-Arginina (supressor da agregação) é o aditivo mais utilizado no reenrolamento de proteínas devido à sua facilidade de remoção ^[103,104,105,106].

A destabilização que a L-Arginina provoca na estrutura das proteínas é muito menor que a Gdn-HCl. Arakawa e Tsumoto descobriram que a L-Arginina, até uma determinada concentração destabiliza ligeiramente as proteínas através do impedimento de interacções intermoleculares não nativas estabelecidas entre resíduos hidrofóbicos, actuando assim como supressor da agregação ^[103].

No presente trabalho será produzida uma amidase recombinante da *Pseudomonas aeruginosa* a partir de uma estirpe recombinante de *E.coli* pKK WT.

Será analisado o efeito dos parâmetros de crescimento desta estirpe em meio LB na produção da amidase preferencialmente na forma solúvel, nomeadamente a temperatura de incubação das culturas, variação da concentração de IPTG e presença ou ausência de um choque de etanol. Deste modo, serão identificadas as condições de crescimento que promovem a produção de amidase nativa e/ou formação de corpos de inclusão, nomeadamente com ou sem actividade biológica.

A análise por espectroscopia de FTIR será de importância fundamental para avaliar a estrutura da proteína agregada sob a forma de corpos de inclusão. O estudo das

alterações estruturais da amidase das fracções insolúveis das diversas condições de crescimento permitirá identificar as interacções responsáveis pela agregação e pela actividade biológica associada aos corpos de inclusão. O conhecimento das interacções permitirá desenvolver uma estratégia eficaz e expedita de solubilização da amidase agregada. A tentativa de solubilização da amidase presente nos corpos de inclusão, produzidos em diferentes condições de crescimento, será efectuada com L-Arginina e Gdn-HCl. Face à importância da amidase como biocatalisador de variadas reacções de interesse, o melhoramento da produção deste enzima torna-se essencial para as inúmeras áreas de potencial utilização deste enzima.

Capítulo II

Materiais e Métodos

2- Materiais e Métodos

2.1- Materiais

Triptona e extracto de levedura constituintes do meio de cultura LB foram obtidos pela Himedia (Índia) e Oxoid (Inglaterra) respectivamente. Ampicilina, IPTG, ureia, L-Arginina, Sepharose 6B, corante azul de Comassie G 250 e marcadores de peso molecular para a electroforese foram adquiridos na Sigma Chemical Company (USA).

A hidroxilamina foi adquirida na Fluka (China), Tris-HCl na Riedel-deHaën (Alemanha) e a acetamida, EDTA, FeCl₃ e AgNO₃ na Merck (Alemanha). As membranas P-10 para as câmaras de ultrafiltração foram adquiridas na Millipore (USA). Todos os reagentes utilizados eram de elevada pureza.

2.2- Métodos

2.2.1- Estirpe bacteriana

Para a produção da amidase recombinante foi usada uma estirpe JM 109 de *Escherichia coli*, designada por pKK WT, que contem o gene clonado da amidase selvagem de *Pseudomonas aeruginosa* 8602 no plasmídeo pKK 223-3. O gene clonado está sob o controlo do promotor *lac* e a expressão foi induzida por IPTG ^[40].

2.2.2- Condições de crescimento das células de *E.coli* pKK WT

O crescimento das células recombinantes de *E.coli* foi efectuado em meio LB contendo 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levedura, 10 g/L NaCl e 100 µg/mL de ampicilina numa incubadora com agitação orbital a 250 rpm.

Inicialmente, preparou-se um pré-inóculo contendo meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina o qual foi inoculado com células recombinantes *E.coli* pKK WT, conservadas em 15 % (v/v) de glicerol, e incubado overnight a 37 °C. Após este período, novo meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina foi inoculado com 2 % (v/v) do pré-inóculo a 37°C e cresceu até ser atingida uma A₆₀₀ entre 0.4-0.6.

Separaram-se 30 mL deste meio de cultura em diferentes balões estéreis contendo diferentes concentrações de IPTG, nomeadamente 0,1; 0,4; 0,7 e 1mM de modo a induzir o crescimento e foram incubados a 37°C. Este mesmo procedimento foi efectuado para uma temperatura de incubação de 25°C.

De modo a avaliar o efeito de choque do etanol no crescimento foram preparadas alíquotas de 30 mL de meio de cultura com diferentes concentrações de IPTG, como descrito anteriormente, às quais foram adicionadas no momento da indução etanol absoluto para uma concentração final de 3 % (v/v).

Quando as culturas de células das diversas condições de crescimento atingiram uma A_{600} próxima de 1, procedeu-se à sua centrifugação durante 20 minutos, a 4°C e a 2700xg, após o que se rejeitou o sobrenadante. Seguidamente procedeu-se à lavagem das células depositadas com soro fisiológico, NaCl 0,85 % (p/v). As células foram recolhidas a 15500xg a 4°C durante 5 minutos e conservadas a -20°C.

2.2.3- Preparação da fracções celulares solúveis (S) e insolúveis (IS)

Ressuspendeu-se 60 mg de células reservadas de cada condição de crescimento em 2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,2. A suspensão celular foi sujeita a desintegração por ultra-sons com 3 pulsos de 5 segundos cada a 150 W e a 4°C, de modo a preparar o extracto celular total (ET). Foi determinada a actividade enzimática de amidase presente nesta suspensão para cada condição de crescimento, a concentração de proteína total e avaliada a sua constituição em proteínas por PAGE.

Parte do extracto celular total de cada condição de crescimento foi centrifugado durante 30 min a 9840xg e a uma temperatura de 4 °C. Foram obtidas as fracções solúveis (S) e insolúveis (IS) de cada condição de crescimento. Foi determinada a actividade enzimática de amidase presente, a concentração de proteína total e avaliada a sua constituição em proteínas por PAGE, para as fracções S e IS das diferentes condições de crescimento.

Todas as fracções ET, S e IS foram seguidamente congeladas e liofilizadas para a sua análise estrutural por FTIR.

2.2.4- Doseamento da actividade enzimática da amidase

Para a quantificação da actividade enzimática da amidase presente no ET, S e IS de cada condição de crescimento utilizou-se um método descontínuo que se baseia na detecção da reacção de síntese do ácido acetohidroxâmico por este enzima. A actividade da reacção de transferase foi avaliada, determinando a quantidade de acetohidroxamato formado a partir dos substratos hidroxilamina e acetamida, ao longo do tempo ^[17].

As fracções IS foram previamente ressuspensas com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,2 em igual volume da fracção S.

Para a mistura reaccional foram utilizados 40 µl de hidroxilamina 2 M pH 7,0 e 100 µl de ET, S ou IS de cada condição de crescimento. A reacção foi iniciada com 100 µl de acetamida 400 mM em tampão Tris-HCl 75 mM a pH 7,0. A concentração de ácido acetohidroxâmico formado foi determinada em alíquotas de 10 µl retiradas da mistura reaccional nos intervalos de tempo 1, 2, 5, 8, 10, 15 e 20 min às quais foram adicionados 100 µL de uma solução de FeCl₃ 6 % (p/v) em HCl 2% (p/v). O complexo castanho formado foi seguidamente quantificado espectrofotometricamente a 490 nm. Uma unidade de actividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µmol de ácido acetohidroxâmico por minuto nas condições da reacção.

A concentração de ácido acetohidroxâmico presente na mistura reaccional num determinado instante foi determinada com o auxílio de uma curva de calibração. O registo da A₄₉₀ do complexo formado para soluções de diferente concentração de ácido acetohidroxâmico, permitiu construir uma representação gráfica da intensidade da A₄₉₀ do complexo formado em função da concentração do ácido acetohidroxâmico.

Da referida curva foi obtido o valor do coeficiente de extinção molar, $\epsilon = 0,026 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($R^2 = 0,997$).

2.2.5- Doseamento da concentração de proteína total

A determinação da concentração de proteína total no ET, S e IS de cada condição de crescimento foi efectuada pelo método de ligação do Corante Azul de Coomassie usando Albumina do Soro Bovino (BSA) como proteína de referência ^[107].

A cor azul formada do complexo corante:proteína (1:1) foi quantificada espectrofotometricamente a 655 nm. A quantidade de proteína nas diferentes fracções foi determinada a partir de uma curva de calibração de soluções de BSA de diferentes concentrações em função da A₆₅₅. A curva de calibração obtida foi a seguinte:

$$\text{Abs}_{655} = 0,0021 C_{\text{proteína}} (\mu\text{g/mL}) + 0,0017 (R^2=0,9383)$$

2.2.6- Electroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

De modo a avaliar o perfil de proteínas existentes nas fracções ET, S e IS de cada condição de crescimento, recorreu-se a análise electroforética em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e em condições nativas (PAGE nativa).

A electroforese é uma técnica que se baseia na separação de macromoléculas por aplicação de um campo eléctrico. Quando um campo eléctrico é aplicado a uma solução de proteínas, estas moléculas migram tendo em conta a sua razão carga/massa. ^[108] Quando se utilizam condições desnaturantes a migração é proporcional apenas à massa dos monómeros das moléculas separadas. O agente mais comum de desnaturação é um detergente iónico, o SDS. A mistura de proteínas é assim desnaturada a 100°C, na presença de um excesso de SDS e de um reagente tiol (para quebrar as ligações dissulfureto) ^[108,109].

No presente trabalho para além de SDS, utilizou-se ureia (8 M) como agente desnaturante uma vez que se verificou uma desnaturação mais eficiente das proteínas, não sendo necessário neste caso, desnaturar previamente as amostras por aquecimento devido à presença de ureia ^[108].

2.2.6.1- Electroforese em Condições Desnaturantes

As amostras (ET, S e IS) de cada condição de crescimento foram sujeitas a uma electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes SDS-PAGE na presença de 8 M ureia usando um gel de resolução de 10 % ^[108].

Foi utilizado um sistema de electroforese de mini-géis (8,3 x 7,3 cm) e utilizadas proteínas de massa molecular conhecida como proteínas padrão: BSA (66000 Da), Ovalbumina (45000 Da), α -Quimiotripsina (24500 Da) e Lisozima (14300 Da).

A corrida electroforética decorreu durante aproximadamente 1 hora, em que nos primeiros 20 minutos aplicou-se uma voltagem de 150 V e nos restantes 200 V. O gel foi seguidamente corado pelo método de revelação com nitrato de prata adaptado do método descrito por Sasse e Gallagher ^[110].

2.2.6.2- Electroforese em Condições Não Desnaturantes

Foi também efectuada uma PAGE nativa onde ao contrário da electroforese efectuada em condições desnaturantes, as proteínas em estudo não são desnaturadas mantendo

assim a sua estrutura nativa e conseqüentemente a actividade enzimática. A separação das proteínas ocorre assim, em função da carga e da massa das proteínas^[108,109].

A electroforese PAGE nativa usando um gel de resolução de 7,5% foi executada segundo o método descrito por Hames e Rickwood^[108].

Foi utilizado um sistema de mini-géis (8,3 x 7,3 cm), tendo sido aplicadas proteínas de massa molecular conhecida, como proteínas padrão: BSA (196000 Da-trímero, 132000 Da-dímero, 66000 Da-monómero), Ovalbumina (45000 Da), Mioglobina (17800 Da) e Lisozima (14300 Da).

A corrida electroforética decorreu durante aproximadamente 1 hora, em que nos primeiros 20 minutos aplicou-se uma voltagem de 120 V e nos restantes 150 V. Após a corrida electroforética foi efectuado um método de detecção de actividade enzimática *in situ* no gel de PAGE nativa.

Assim, através da electroforese foi possível efectuar uma análise qualitativa da actividade enzimática da amidase presente nas diferentes fracções, ET, S e IS das diversas condições de crescimento.

Para isso, o gel de PAGE nativa foi separado em duas partes, em que uma das partes foi corada com nitrato de prata para a determinação da posição das bandas de proteína, e a outra parte foi utilizada para a determinação da actividade enzimática da amidase *in situ*. A actividade enzimática foi detectada após a incubação de uma metade do gel a 25°C durante 15 min na presença de uma mistura reaccional contendo quantidades equimolares de 400 mM acetamida em tampão Tris-HCl 75 mM pH=7,0 e hidroxilamina 2 M pH 7,0. A formação do ácido acetohidroxâmico devida à actividade da amidase associada a estas fracções foi detectada através do contacto do gel com um papel de filtro embebido em FeCl₃ 6 % (p/v) em HCl 2% (p/v). O aparecimento da coloração acastanhada indica a posição da amidase no gel, coincidindo com a posição na outra metade do gel que foi previamente corado pelo método de revelação com nitrato de prata adaptado de Sasse e Gallagher^[110].

2.2.7- Extracção e purificação da amidase solúvel

Efectuou-se uma prévia purificação da amidase a partir da fracção solúvel do inóculo inicial de modo a possibilitar uma análise estrutural comparativa entre o enzima puro e as fracções solúveis e insolúveis obtidas em cada condição de crescimento por espectroscopia de IR.

2.2.7.1- Obtenção do extracto celular

As células de *E.coli* pKK WT contendo amidase (60 mg) foram ressuspensas em 2 mL de tampão TMEGB e sujeitas a desintegração por ultra-sons com 3 pulsos de 5 segundos cada a 150 W. A suspensão foi centrifugada a 9840xg durante 30 min a 4 °C, após o que se recolheu o sobrenadante, representando este o extracto celular livre de células. Foi determinada a actividade enzimática, concentração de proteína total desta solução e avaliada a sua constituição em proteínas por PAGE nativa, de modo semelhante ao descrito anteriormente. Procedeu-se seguidamente à purificação da amidase a partir deste extracto celular livre de células.

2.2.7.2- Desnaturação térmica

Uma vez que a amidase é termoestável o extracto celular foi submetido a uma desnaturação térmica a uma temperatura de 60 °C, durante 10 minutos.

O sobrenadante recolhido após uma centrifugação a 9840xg durante 30 min a 4 °C, foi designado por extracto celular desnaturado. Foi determinada a actividade enzimática, concentração de proteína total nesta solução e avaliada a sua constituição em proteínas por PAGE nativa, de modo semelhante ao descrito anteriormente. Posteriormente este extracto celular desnaturado foi purificado por cromatografia de afinidade numa resina de Sepharose 6B epoxi activada com acetamida.

2.2.7.3- Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade utiliza ligandos bioespecíficos para purificar uma molécula de proteína por adsorção selectiva, ou seja, as proteínas são capazes de interagir especificamente e reversivelmente com estes ligandos ^[1,111].

A resina de Sepharose 6B epoxi activada com acetamida (ligando por excelência da amidase) foi empacotada numa coluna (1 x 5 cm) e equilibrada em tampão TMEGB. O extracto celular desnaturado foi aplicado na resina numa proporção de 1:2. A suspensão foi lavada com tampão TMEGB a uma caudal de 20 mL /h e foram recolhidas fracções até a A_{280} ser inferior ou igual a 0,05.

Após a fase de lavagem, iniciou-se a fase de eluição da amidase com um gradiente linear crescente no mesmo tampão TMEGB contendo de 0 a 40:40 mM acetamida: hidroxilamina a pH 7. Foi lida a A_{280} das fracções recolhidas e avaliou-se quais as

fracções que continham amidase e portanto demonstravam maior velocidade de síntese de ácido acetohidroxâmico.

Para tal utilizou-se um sistema de microplacas, um método simples e rápido para detectar a formação do acetohidroxamato, o produto da actividade de transferase do enzima ^[17]. Em cada poço adicionou-se igual quantidade de tampão Tris-HCl 150 mM pH 7, hidroxilamina 2 M pH 7 e de fracção recolhida. A reacção foi iniciada com a adição de igual volume de acetamida 400 mM e incubada a 37°C. A reacção foi parada ao fim de 10 minutos por adição de 100 µl FeCl₃ 6 % (p/v) em HCl 2 % (p/v) e a formação do ácido acetohidroxâmico foi registada a 490 nm ($\epsilon_{490} = 0,026 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). As fracções contendo maior actividade de amidase foram reunidas constituindo a solução de amidase purificada. Foi determinada a actividade enzimática e concentração de proteína total nesta solução, de modo semelhante ao descrito anteriormente. Foi ainda avaliada a pureza da solução de amidase purificada através de uma electroforese PAGE nativa com gel de resolução de 7,5 %.

2.2.7.4- Ultrafiltração

A solução de amidase purificada foi de seguida equilibrada em tampão de fosfato de sódio 10 mM a pH 7,2 por ultrafiltração à pressão de 2 atm e à temperatura de 4 °C usando uma membrana P-10. Esta solução de amidase purificada foi congelada e posteriormente sujeita a liofilização para uma análise estrutural por FTIR.

2.2.8- Espectroscopia de Infravermelhos por Transformadas de Fourier (FTIR)

A avaliação da expressão da amidase nas fracções solúveis e insolúveis (S e IS) das células submetidas a diferentes condições de crescimento e da solução de amidase purificada foi acompanhada através de uma análise de espectroscopia por FTIR.

Após a liofilização das fracções S, IS e da solução de amidase purificada, foram preparadas pastilhas em KBr e analisadas por FTIR num espectrofotómetro Tensor 27 da Bruker. De modo a obter espectros com elevada razão S/N (sinal/ruído) foi utilizada uma resolução de 4 cm⁻¹ e foram efectuados 400 varrimentos numa gama de absorção de 400-4000 cm⁻¹.

2.2.9- Solubilização da amidase nos corpos de inclusão

A fim de avaliar a capacidade da L-Arginina e da Gdn-HCl na solubilização da proteína agregada, a fracção IS obtida para as diferentes condições de crescimento foi ressuspendida em soluções de L-Arginina ou de Gdn-HCl a diferentes concentrações entre 0 e 1,5M.

As misturas foram colocadas à temperatura ambiente com agitação orbital durante 24 horas. Após esse período, a mistura foi lavada várias vezes por ultrafiltração com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,2; a fim de eliminar resíduos dos agentes solubilizantes (L-Arginina e Gdn-HCl) e seguidamente centrifugada a 9840xg durante 30 min a 4°C. Foram obtidas as fracções solúvel (S') e insolúvel (IS') como representado na Figura 1.

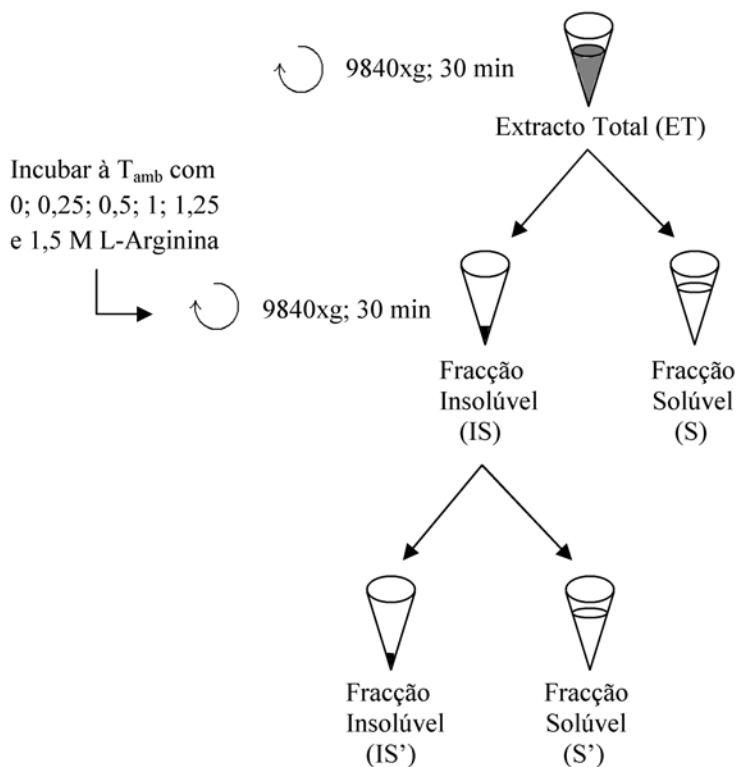


Figura 1- Esquema representativo de obtenção das fracções S' e IS' correspondentes à solubilização das fracções IS com L-Arginina correspondentes a diferentes condições de crescimento. O mesmo procedimento foi executado para a solubilização com Gdn-HCl

Foi determinada a actividade enzimática de amidase presente, a concentração de proteína total e avaliada a sua constituição em proteínas por SDS-PAGE contendo ureia 8M, para as fracções S' e IS' correspondentes à solubilização das fracções IS das

diferentes condições de crescimento. O procedimento foi efectuado de acordo com o descrito anteriormente.

Capítulo III

Resultados e Discussão

3- Resultados e Discussão

3.1- Efeito de parâmetros (ambientais) na produção da amidase

De modo a ser avaliada a influência de parâmetros na produção da amidase nomeadamente, a temperatura de crescimento, concentração de IPTG e stress celular causado pelo etanol, as células *E.coli* JM 109 que contêm clonado o gene da amidase selvagem de *Pseudomonas aeruginosa* 8602 foram cultivadas em meio LB variando a temperatura de incubação (37°C ou 25°C) e na presença ou ausência de etanol a 3% (v/v).

A síntese da amidase foi induzida por adição de diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,4; 0,7 e 1mM) ao meio de cultura durante a fase exponencial (este tempo foi definido como o tempo zero para as culturas). Quando as culturas atingiram a fase estacionária, procedeu-se à produção do extracto celular total (ET) e à separação da fracção solúvel (S) da fracção insolúvel (IS), tal como referido nos materiais e métodos.

A quantificação da actividade enzimática da amidase e correspondente proteína total presente nas fracções S e IS para as diferentes condições de crescimento permitiu representar as Figuras 1 e 2. Estas figuras ilustram a influência dos diversos parâmetros de crescimento na produção de proteínas e em particular a amidase sob uma forma solúvel e/ou agregada.

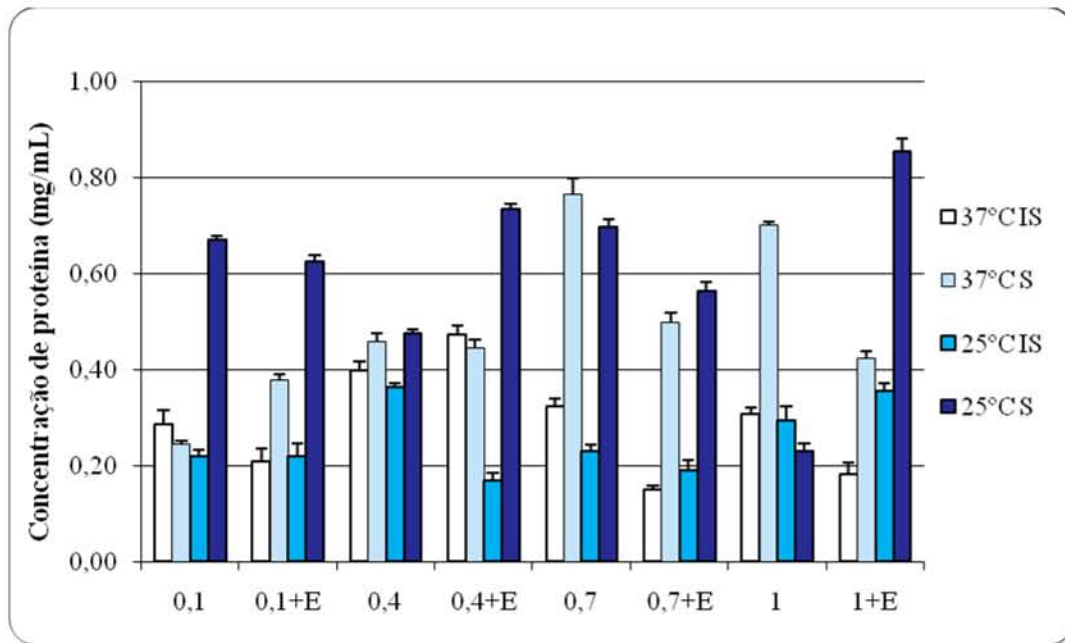


Figura 1- Efeito da temperatura, concentração de IPTG (mM) e adição de 3% etanol (+E) na concentração de proteína nas fracções solúveis (S) e insolúveis (IS) de células de *E.coli* pKK WT submetidas a diferentes condições de crescimento.

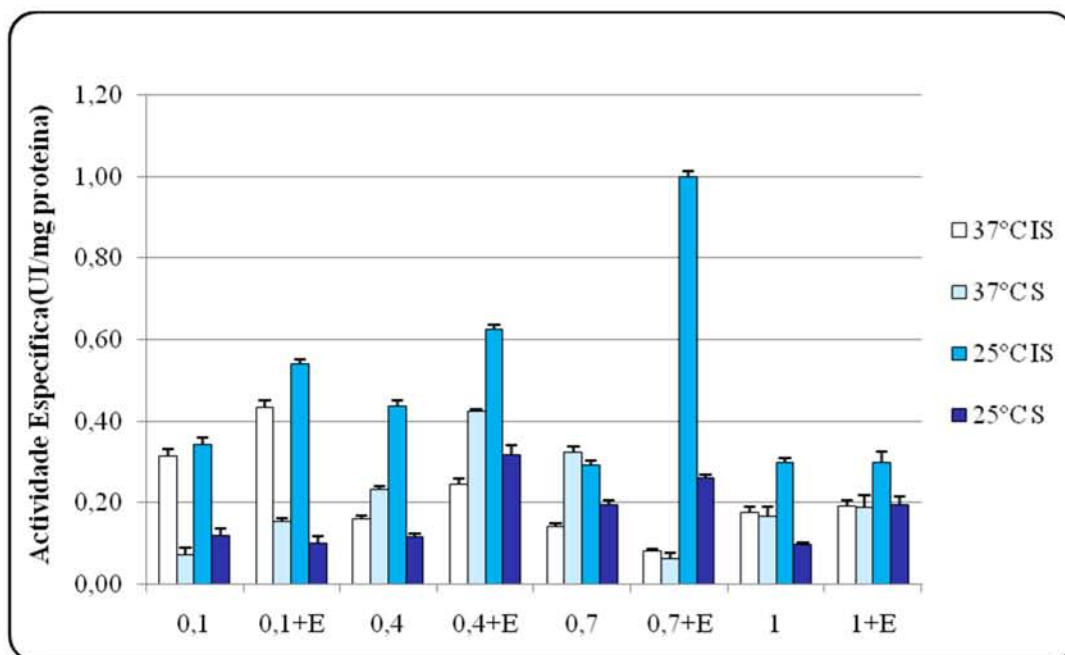


Figura 2- Efeito da temperatura, concentração de IPTG (mM) e adição de 3% etanol (+E) na actividade específica da amidase nas fracções solúveis (S) e insolúveis (IS), de células de *E.coli* pKK WT submetidas a diferentes condições de crescimento.

Na Figura 1 é possível observar o evidente aumento da quantidade de proteínas na fracção solúvel a 25°C face a 37°C (excepto para as condições de 0,7 e 1 mM IPTG) e

isto torna-se principalmente notório na presença de etanol. Para além disso, no geral todas as condições possuem aproximadamente a mesma quantidade de proteína aglomerada na fracção IS independentemente da variação da temperatura ou presença de etanol verificando-se a maior quantidade de proteína aglomerada para as condições com 0,4 mM de IPTG.

Como se pode constatar pela Figura 2 somente as condições a 37°C a partir de 0,4 mM de IPTG inclusive produziram maior actividade de amidase associada à fracção S relativamente à fracção IS (excepto para a condição de 1mM IPTG, 0,7 mM IPTG e 1mM IPTG ambas na presença de etanol). Aparentemente, estas parecem ser as condições adequadas à produção de maior quantidade de amidase na forma solúvel. No entanto, é possível verificar que todas as condições de crescimento produziram corpos de inclusão biologicamente activos, devido à existência de actividade enzimática de amidase associada às fracções insolúveis em todas as condições de crescimento sendo evidente que, no geral, mas principalmente a 25°C há notoriamente uma maior actividade de amidase associada à fracção IS comparativamente à fracção S.

Foi possível comprovar a existência destes corpos de inclusão após a visualização a um microscópio de luz polarizada, de células produzidas para as diversas condições de crescimento testadas, como representado na Figura 3, onde as áreas mais escuras no interior das células correspondem a corpos de inclusão, que são mais densos que o resto da célula.

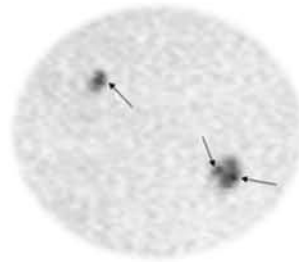


Figura 3- Corpos de inclusão no interior de células *Escherichia coli* pKK WT. Imagem obtida através de um microscópio de luz polarizada (1000x).

De facto a 25°C, como se pode constatar pelos valores de taxa específica de crescimento e tempo de duplicação da Tabela 1, o crescimento é mais lento o que possivelmente permite a expressão de proteínas maioritariamente na forma solúvel como foi verificado por Vasina e Baneyx especificamente para a proteína PreS2-S'- β -galactosidase ^[65], podendo este facto ser também observado na Figura 1. Isto é particularmente notório na

presença de etanol pois, como era esperado, na presença de temperaturas não ideais e etanol ^[67] o crescimento celular torna-se mais lento favorecendo o correcto enrolamento das proteínas ^[46] em que neste caso, a amidase adquire uma forma biologicamente activa, no entanto ao contrário do que era esperado, esta agrega substancialmente.

Verificou-se ainda que nas condições a 25°C as fracções solúveis apresentam uma menor actividade enzimática de amidase face às fracções insolúveis, apesar da quantidade de proteína nas fracções solúveis ser maior, o que aparentemente indica que a amidase para esta temperatura agrega maioritariamente livre de contaminantes numa forma biologicamente activa e esta observação foi posteriormente confirmada por PAGE nativa. Apesar de não tão evidente o mesmo sucede para as condições de crescimento a 37°C onde, no geral, também foi obtida igual ou maior quantidade de proteína nas fracções S relativamente às IS. A 37 °C as fracções IS possuem na generalidade igual ou maior actividade enzimática que as respectivas fracções S o que indica que a quantidade de amidase expressa relativamente às outras proteínas é bastante maior, excepto para 0,4 mM de IPTG, 0,7 mM de IPTG e 0,4 mM IPTG na presença de etanol.

Deste modo, quando se avalia a necessidade de solubilização e extracção do enzima o processo de purificação fica mais facilitado a partir das fracções insolúveis, tal como foi referido por Singh e Panda ^[76]. Em oposição, nas fracções solúveis existe na generalidade uma elevada quantidade de proteína face à quantidade de amidase, traduzida pela baixa actividade enzimática destas fracções, querendo assim dizer que nas fracções solúveis para além da amidase existem muitas outras proteínas contaminantes, principalmente a 25 °C. Estes resultados foram confirmados pela análise electroforética de todas as fracções em PAGE.

Constata-se também que na maioria das condições de crescimento a actividade enzimática é maior na presença de etanol e este facto verifica-se tanto na fracção S como na fracção IS (excepto para concentrações de 0,7 mM de IPTG a 37°C na presença de etanol). Este comportamento sucede pois como vários estudos demonstraram, o choque do etanol pode induzir a síntese de chaperonas intracelulares de modo a reparar os danos celulares, além de que o etanol promove uma expressão lenta das proteínas, o que irá facilitar a expressão da amidase numa forma biologicamente activa ^[67].

A maior actividade enzimática obtida na fracção solúvel, foi para a condição de 0,4 mM IPTG + Etanol a 37°C enquanto nas fracções IS a maior actividade enzimática obtida foi para a condição de 0,70 mM IPTG+ Etanol a 25°C (aproximadamente 1,00 UI/mg proteína), detendo também a última a maior actividade enzimática comparativamente às fracções solúveis das diversas condições de crescimento. Além desta condição de crescimento, pode ainda ser constatado através do Figura 2 que existem outras condições com uma actividade enzimática também relativamente elevada, nomeadamente a de 0,1 e 0,4 IPTG + Etanol a 25°C. Assim, a presença de etanol e a temperatura de 25°C parecem ter um papel extremamente importante na obtenção de amidase com actividade biológica que agrega sob a forma de corpos de inclusão biologicamente activos. Uma observação que outros autores já haviam constatado ocorrer em outras proteínas, nomeadamente na *clostridium thermocellum* endoglucanase D, que permaneceu biologicamente activa apesar de estar agregada ^[101]. Foi também determinada a taxa específica de crescimento e tempo de duplicação para todas as condições de crescimento, tendo sido obtidos os seguintes resultados:

Temperatura (°C)	[IPTG] (mM)	μ (h ⁻¹)	t _d (h)	% proteína relativa		% amidase específica	
				S	IS	S	IS
37°C	0,1	0,0566	12,246	46,0	54,0	18,8	81,2
	0,1 + E	0,0521	13,304	64,4	35,6	26,3	73,7
	0,4	0,0551	12,580	53,5	46,5	59,0	41,0
	0,4 + E	0,0501	13,835	48,4	51,6	63,2	36,8
	0,7	0,0694	9,988	70,3	29,7	69,5	30,5
	0,7 + E	0,0502	13,808	77,0	23,0	44,4	55,6
	1	0,0691	10,031	69,5	30,5	48,8	51,2
	1 + E	0,0603	11,495	69,9	30,1	49,4	50,6
25°C	0,1	0,0492	14,088	75,4	24,6	26,1	73,9
	0,1 + E	0,0407	17,031	74,0	26,0	15,7	84,3
	0,4	0,051	13,591	56,6	43,4	21,0	79,0
	0,4 + E	0,0408	16,989	81,4	18,6	33,8	66,2
	0,7	0,0451	15,369	75,1	24,9	39,9	60,1
	0,7 + E	0,0401	17,285	74,7	25,3	20,8	79,2
	1	0,0502	13,808	43,8	56,2	24,3	75,7
	1 + E	0,0424	16,348	70,6	29,4	39,5	60,5

Tabela 1- Valores de taxa específica de crescimento e tempo de duplicação para as culturas de células de *E.coli* pKK WT submetidas a diversas condições de crescimento. Efeito dos parâmetros de crescimento na produção de proteína e amidase específica nas fracções solúveis e insolúveis das células.

De acordo com a tabela anterior verifica-se assim que as condições de crescimento de 25°C e na presença de etanol são as que apresentam uma menor taxa específica de crescimento e conseqüentemente um maior tempo de duplicação. De facto como era esperado, na presença de temperaturas não ideais e etanol, o crescimento celular é mais lento o que favorece a obtenção de maiores actividades enzimáticas, pois ocorrerá maior expressão da amidase numa forma biologicamente activa ^[46].

Verifica-se ainda através da Tabela 1 que tal como já foi referido, a % de proteína nas fracções S das diversas condições de crescimento é maior comparativamente às fracções IS, e uma vez que as fracções IS possuem na generalidade maior actividade enzimática (Figura 2), então o enzima existente nestas é principalmente a amidase pois a quantidade de proteína total presente nas fracções insolúveis é baixa, o que é uma vantagem pois não são necessários inúmeros processos de purificação.

Por outro lado, observou-se também que para as condições de crescimento a 25°C as fracções IS têm maior % de amidase relativamente às fracções S, estando de acordo com o que foi referido anteriormente, pois é nas fracções IS a 25°C que existe uma maior actividade enzimática. Para a maioria das condições a 37°C, a diferença de % de amidase não é tão significativa, pois a actividade enzimática de ambas as fracções é relativamente próxima.

A análise electroforética de todas as fracções solúveis e insolúveis preparadas confirmaram as anteriores considerações. A Figura 4 representa uma análise por SDS-PAGE em gel de resolução de 10 % com 8M de ureia, das proteínas produzidas no extracto celular total (ET), fracção solúvel (S) e fracção insolúvel (IS) de culturas induzidas com 0,7 mM IPTG a 25°C e 37°C, na presença e ausência de etanol. Para as restantes concentrações de IPTG foi obtido um perfil idêntico.

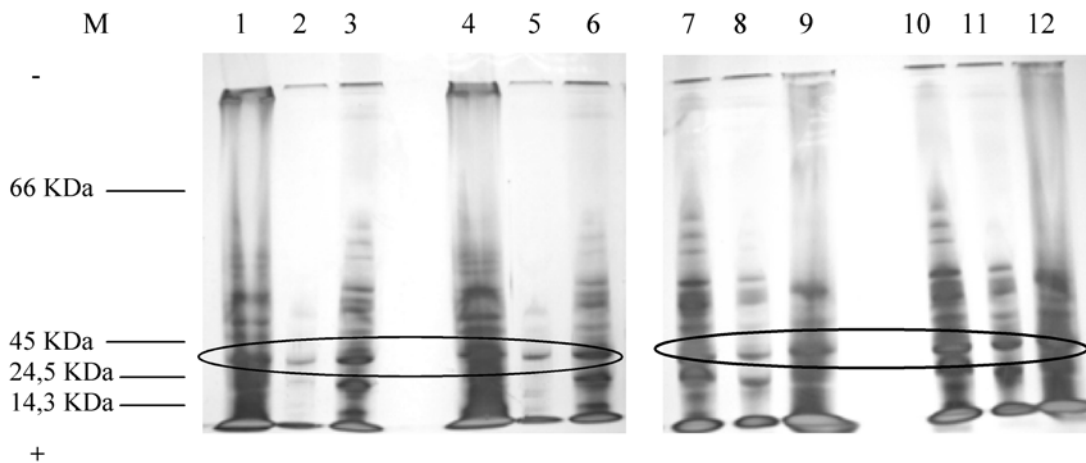


Figura 4- Análise SDS-PAGE 10 % com 8 M ureia do perfil de proteínas produzido nas diferentes fracções da estirpe recombinante de *E.coli* pKK WT em meio LB com ampicilina na presença de 0,7 mM IPTG efectuada de acordo com o método descrito nos Materiais e métodos. Poços: 1- 25°C+ Etanol, ET; 2- 25°C+ Etanol, IS; 3- 25°C+ Etanol, S; 4- 25°C, ET; 5- 25°C, IS; 6- 25°C, S; 7- 37°C+ Etanol, ET; 8- 37°C+ Etanol, S; 9- 37°C+ Etanol, IS; 10- 37°C, ET; 11- 37°C, S; 12- 37°C, IS; M- Marcadores de Mr conhecida: BSA (66000 Da), Ovalbumina (45000 Da), α -Quimiotripsina (24500 Da) e Lisozima (14300 Da) de cima para baixo. A posição da subunidade da amidase foi assinalada na figura.

A determinação de Mr da banda assinalada em todos os poços, foi efectuada com base na curva de calibração representada na Figura 5.

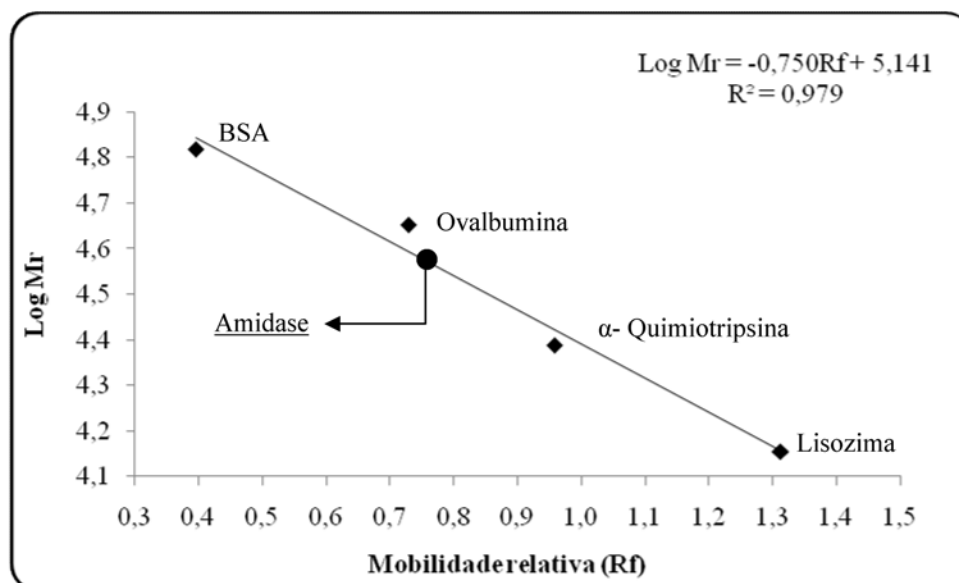


Figura 5- Determinação de Mr da subunidade da amidase por SDS-PAGE em gel de resolução 10 % com 8 M ureia esquematizado na Figura 4. As fracções contendo amidase e os padrões foram colocados no mesmo gel. Os marcadores de Mr conhecida esquematizados na Figura 4 em M são: BSA (66 KDa); Ovalbumina (45 KDa); α- Quimiotripsina (24,5 KDa) e Lisozima (14,3 KDa).

A referida proteína assinalada na Figura 4 encontra-se em todas as fracções de todas as condições de crescimento, e o seu Mr corresponde ao Mr da subunidade da amidase, ou seja, 37,9 KDa estando de acordo com resultados já publicados para este enzima ^[13].

Tal como esperado, foi possível verificar que as fracções IS da condição de 0,7 IPTG a 25°C (poços 2 e 5), apresentam uma banda predominante em oposição às respectivas fracções S (poços 3 e 6) em que foram observadas muitas outras proteínas. Este mesmo comportamento foi verificado em todas as condições de crescimento efectuadas a 25°C bem como para 37°C. No entanto, parece evidente que os corpos de inclusão das fracções IS a 25°C são bastante mais homogéneos que a 37°C (poços 9 e 12). No entanto, nas condições a 37°C a banda da proteína mais intensa é ainda assim predominantemente a da amidase, o que poderá facilitar o processo de recuperação do enzima ^[76].

Foi ainda possível confirmar através da análise electroforética, em todas as condições de crescimento submetidas ao choque do etanol, que as fracções IS (aqui representadas nos poços 2 e 9) apresentam menor quantidade de proteína (banda menos intensa) relativamente às fracções IS na ausência de etanol (respectivamente poços 5 e 12), uma vez que na presença de etanol o crescimento celular é mais lento e, tal facto, traduz-se numa menor quantidade de proteína produzida.

Uma análise electroforética em PAGE nativa com gel de resolução de 7,5% das fracções obtidas nas diferentes condições de crescimento celular permitiu avaliar a actividade enzimática associada às diferentes fracções.

Como pode ser verificado na Figura 6, todas as proteínas presentes nas diferentes fracções foram visualizadas usando o método de coloração de nitrato de prata, nomeadamente no gel B e C. E comparativamente géis idênticos, respectivamente A e D, foram corados especificamente para a actividade enzimática da amidase “*in situ*”.

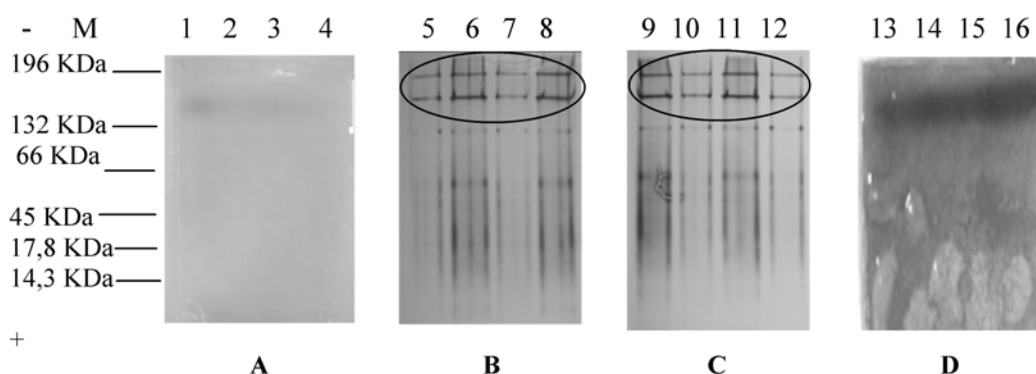


Figura 6- Análise PAGE nativa 7,5% do perfil de proteínas produzido nas diferentes fracções isoladas das células de *E.coli* pKK WT, em meio LB com ampicilina na presença de 0,7 mM IPTG. A) e D) Determinação da actividade enzimática “*in situ*” no gel de poliacrilamida de acordo com o procedimento descrito nos materiais e métodos; B) e C) Gel corado com nitrato de prata. Poços: 1, 5 - 37°C, S; 2, 6- 37°C, IS; 3, 7- 37°C + Etanol, S; 4, 8- 37°C + Etanol, IS; 9, 13- 25°C, S; 10, 14- 25°C, IS; 11, 15- 25°C + Etanol, S; 12, 16- 25°C + Etanol, IS; M- Marcadores de Mr conhecida: BSA (196000 Da-trímero, 132000 Da-dímero, 66000 Da-monómero), Ovalbumina (45000 Da), Mioglobina (17800 Da) e Lisozima (14300 Da) de cima para baixo.

Observou-se na Figura 6, que todas as fracções foram separadas em mais que uma banda na PAGE nativa, mesmo as fracções IS das condições a 25°C que em SDS-PAGE revelavam a existência de uma banda predominante.

Mais ainda, nos doseamentos da actividade de amidase “*in situ*” ambas as bandas assinaladas na Figura 6 demonstraram actividade enzimática, como se pode verificar nos poços 1-4 e 13-16, o que faz parecer que estas duas bandas são variantes da amidase uma vez que a separação neste tipo de electroforese ocorre em função da carga e da massa das proteínas.

Para além disso, foi verificado que a intensidade da coloração do gel “*in situ*” está relacionada com a actividade enzimática das fracções. Como seria de esperar, a

coloração “*in situ*” é mais intensa para as fracções a 25°C (poços de 13 a 16) do que a 37°C (poços de 1 a 4) e notoriamente mais intensa para as fracções IS de 25°C (poços 14 e 16). Este comportamento foi verificado para as fracções de todas as condições de crescimento.

Também se constatou novamente o facto de as fracções IS a 25°C conterem predominantemente bandas correspondentes à amidase, sugerindo que os corpos de inclusão nestas condições são maioritariamente constituídos pelo enzima biologicamente activo (poços 10 e 12). Em oposição haverá outras proteínas associadas às fracções IS dos crescimentos a 37°C (poços 6 e 8), no entanto a amidase estará em maior quantidade relativamente a estas, dada a intensidade da sua banda.

A determinação de Mr da banda assinalada em todos os poços, foi efectuada com base na curva de calibração representada na Figura 7.

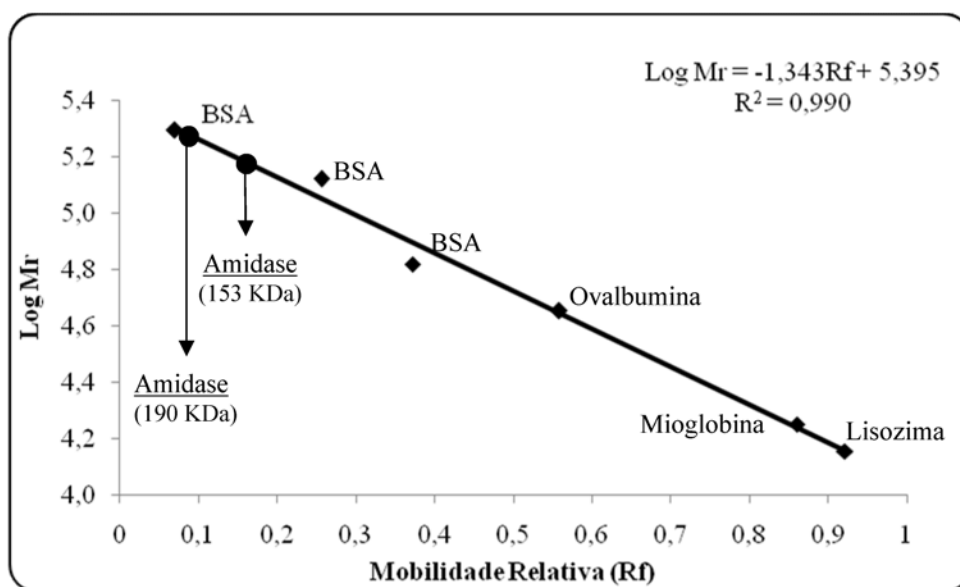


Figura 7- Determinação de Mr da amidase por PAGE nativa em gel de resolução de 7,5 % a partir da Figura 6. As fracções contendo amidase e os padrões foram colocados no mesmo gel. Os marcadores de Mr conhecida esquematizados na Figura 6 em M são: BSA (196 KDa-trímero, 132 KDa- dímero, 66 KDa-monómero); Ovalbumina (45 KDa); Mioglobina (17,8 KDa) e Lisozima (14,3 KDa).

A mobilidade da banda assinalada na Figura 6 permitiu determinar o valor de Mr obtendo-se os valores de 190 KDa e 153 KDa. No entanto, a determinação de Mr das proteínas por PAGE nativa não pode ser feita rigorosamente, uma vez que a separação neste tipo de electroforese ocorre em função da carga e da massa, assim o valor de Mr

da amidase nativa é aproximadamente 230KDa, mas em PAGE nativa geralmente assume um valor aproximado de 150 KDa, sendo que os resultados obtidos estão de acordo com resultados publicados para este enzima por Karmali *et al* ^[112].

Tendo em conta que a SDS-PAGE e a PAGE nativa das fracções S de todas as condições testadas revelaram que a amidase nestas fracções se encontra na presença de outras proteínas contaminantes, tornou-se necessário proceder à purificação de enzima solúvel, de modo a avaliar quais as alterações estruturais no enzima que justifiquem a agregação em todas as condições de crescimento, sob uma forma biologicamente activa.

3.2- Purificação da amidase

A amidase da estirpe recombinante de *E.coli* pKK WT foi purificada através de um procedimento envolvendo vários passos. O objectivo consistiu em utilizar um procedimento que se revelasse rápido e eficiente, daí se recorrer apenas a uma purificação em pequena escala.

A utilização de uma etapa de desnaturação térmica inicial e de um procedimento cromatográfico, a cromatografia de afinidade em Sepharose 6B epoxiactivada com acetamida, permitiu obter uma solução de amidase purificada e aparentemente homogénea.

A Figura 8 demonstra o comportamento cromatográfico de purificação da amidase por cromatografia de afinidade.

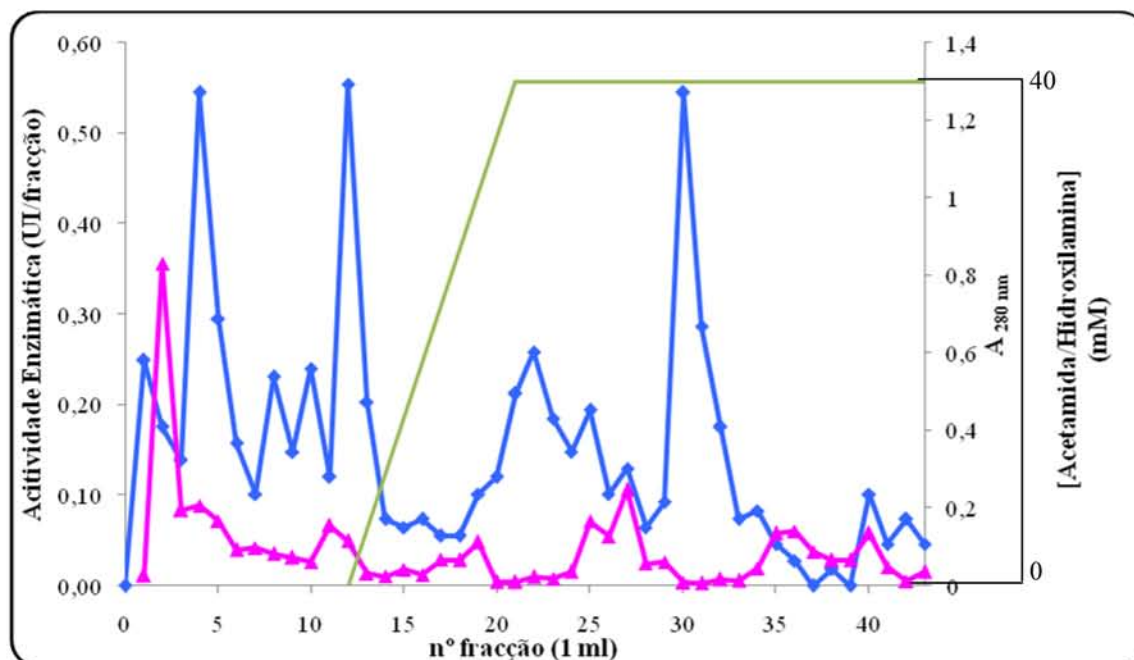


Figura 8- Perfil cromatográfico de purificação da amidase por cromatografia de afinidade em Sepharose 6B epoxi-activada com acetamida. A amidase foi eluída da coluna com um gradiente linear de 40:40 mM acetamida:hidroxilamina a pH 7. Legenda: Absorvância das fracções a 280 nm (rosa); gradiente de concentração de acetamida/hidroxilamina (verde) e a actividade enzimática das fracções (azul).

Na Figura 8, pode verificar-se que se obteve maior actividade de amidase (fracção 30) na eluição com 40 mM de acetamida/hidroxilamina. Na verdade, as fracções 4 e 12 também apresentaram uma elevada actividade enzimática de amidase, indicando elevadas perdas de enzima durante a etapa da lavagem.

Com base no cromatograma obtido (Figura 8) foram reunidas as fracções de 20 à 24 e da 30 à 33 inclusive para constituírem a solução de amidase purificada por apresentarem maior actividade enzimática. No entanto, rejeitaram-se fracções posteriores e anteriores contendo ainda actividade enzimática mas que apresentavam valores de A_{280} superiores, o que fazia supor a existência de outras proteínas contaminantes.

A pureza da solução de amidase purificada obtida durante as diferentes etapas de purificação foi seguidamente confirmada por electroforese PAGE nativa com gel de resolução de 7,5%.

A Figura 9 ilustra a presença de outras proteínas contaminantes para além da amidase ao longo das várias etapas de purificação, nomeadamente no extracto celular e no extracto celular desnaturado.

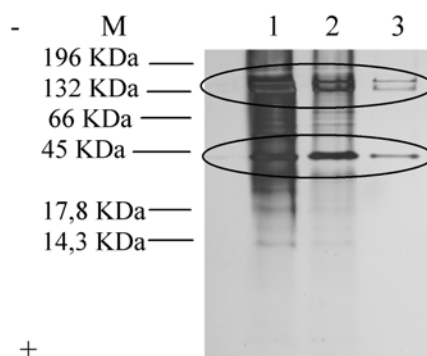


Figura 9- Análise por PAGE nativa com gel de resolução de 7,5% das diferentes etapas do processo de purificação da amidase. Poços: 1- extracto celular (10 µg); 2- extracto celular desnaturado (10 µg); 3- solução de amidase purificada em tampão TMEGB (10 µg); M- Proteínas marcadoras de Mr conhecido: BSA (196000 Da-trímero, 132000 Da-dímero, 66000 Da-monómero), Ovalbumina (45000 Da), Mioglobina (17800 Da) e Lisozima (14300 Da) de cima para baixo.

Torna-se evidente uma diminuição do número de proteínas contaminantes ao longo das várias etapas do processo de purificação. Assim, existe uma substancial diminuição do número de bandas de proteína no extracto celular desnaturado (poço 2) face ao extracto celular (poço 1). Quanto à solução de amidase purificada (poço 3) pode observar-se nitidamente a existência de três bandas, sendo que estas bandas também estão presentes no extracto celular e extracto celular desnaturado. O cálculo de Mr das proteínas representadas pelas bandas assinaladas na Figura 9 permitiu concluir que estas correspondiam à amidase. A determinação de Mr das bandas assinaladas foi feita com base na curva de calibração representada na Figura 10.

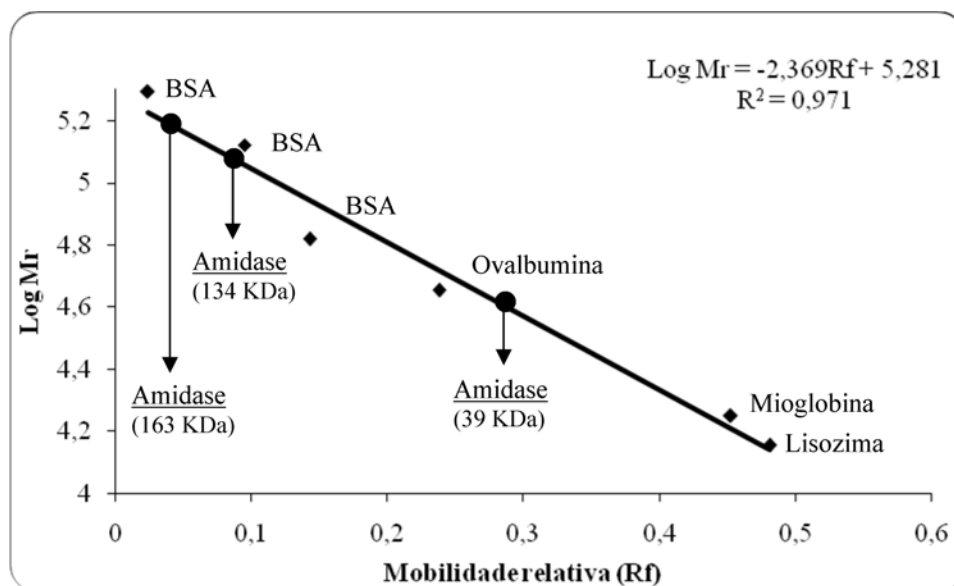


Figura 10- Determinação de Mr da amidase por PAGE nativa 7,5% a partir da Figura 9. As fracções contendo amidase e os padrões foram colocados no mesmo gel. Os marcadores de Mr conhecida esquematizados na Figura 9 em M são: BSA (196 KDa-trímero, 132 KDa- dímero, 66 KDa- monómero); Ovalbumina (45 KDa); Mioglobina (17,8 KDa) e Lisozima (14,3 KDa).

Sendo assim o valor de Mr das referidas proteínas é de 163 KDa, 134 KDa e 39 KDa. Quanto às duas primeiras bandas, possivelmente são diferentes formas poliméricas da amidase nativa, o que está de acordo com resultados já publicados por Karmali *et al* [112]. A proteína de Mr inferior (39 KDa) poderá corresponder ao Mr da subunidade da amidase. Apesar da separação neste tipo de electroforese ser em função da carga e da massa das proteínas, possivelmente durante o processo de purificação, ou mesmo durante a corrida electroforética, poderá ter ocorrido desnaturação do enzima o que levou ao aparecimento da referida banda de Mr inferior. Os resultados obtidos na Tabela 2 quanto ao factor de purificação do processo de purificação fazem prever a obtenção de uma solução de amidase purificada homogénea como ficou demonstrado na PAGE nativa.

	Concentração (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Actividade Total (UI)	Actividade Específica (UI/mg proteína)	Rendimento Actividade Enzimática (%)	Factor Purificação
Extracto celular	0,98	1,48	6,78	4,57	100,00	1,00
Extracto celular desnaturado	0,82	0,82	6,00	7,30	88,52	1,59
“Pool” afinidade	0,0065	0,077	4,27	54,93	62,94	12,01

Tabela 2- Tabela de purificação da amidase da estirpe recombinante *E.coli* pKK WT.

De acordo com a Tabela 2 a amidase recombinante produzida pela *E.coli* pKK WT foi purificada aproximadamente 12 vezes, com um rendimento de aproximadamente 63%. Esta solução de amidase purificada foi equilibrada em tampão de fosfato de sódio 10 mM a pH 7,2 e posteriormente liofilizada de modo a ser possível proceder a uma análise por FTIR da estrutura secundária deste enzima.

3.3- Análise espectroscópica por FTIR da agregação

A espectroscopia FTIR é uma ferramenta que permite a análise da expressão das proteínas. Para agregados como é o caso dos corpos de inclusão, a espectroscopia FTIR é muito utilizada para analisar proteínas, a partir da análise das bandas amida que são devidas à vibração do esqueleto peptídico [88].

As frequências de grupos de maior interesse para estudos estruturais das proteínas são a amida I e amida II.

As bandas de absorção da amida I são devidas à vibração de alongamento do grupo carbonilo, enquanto que a banda da amida II está associada à curvatura N-H e C-N. A região da amida I é utilizada com frequência para determinar a estrutura secundária da proteína. A amida II apesar de não ter sido ainda muito estudada, apresenta elevada sensibilidade para avaliar alterações na estrutura secundária da proteína [89].

As alterações nas bandas de amidas num espectro de infravermelho são geralmente devidas a modificações na estrutura secundária das proteínas. No entanto, pequenas alterações na frequência vibracional das amidas, podem ser devidas a modificações das

ligações de hidrogénio envolvidas nas ligações peptídicas [88]. As ligações (ou pontes) de hidrogénio estabilizam a estrutura das proteínas sendo essenciais para a catálise.

A espectroscopia vibracional é um dos poucos métodos que permite a avaliação directa da força dessas ligações. Assim, à medida que a frequência diminui aumenta a força das ligações de hidrogénio e vice-versa [88].

Deste modo, foram avaliadas por espectroscopia de FTIR as fracções S, IS e a solução de amidase purificada de modo a compreender o fenómeno de agregação da amidase recombinante e a obtenção de corpos de inclusão biologicamente activos.

As diversas fracções (S e IS) obtidas nas diferentes condições de crescimento e a solução de amidase purificada foram liofilizadas e preparadas em pastilhas de KBr para as análises de FTIR. O software OPUS^{NT} foi utilizado para a aquisição e edição dos espectros de FTIR.

- Amida I

Quanto à região da amida I entre 1600 e 1700 cm^{-1} , o modo vibracional mais utilizado na análise da estrutura secundária de proteínas, as características espectrais observadas são devidas maioritariamente a estruturas secundárias nomeadamente, hélices- α aproximadamente entre 1650-1658 cm^{-1} e folhas- β entre 1620-1640 cm^{-1} [113].

As Figura 11 e Figura 12 mostram, respectivamente, o espectro de absorvância no infravermelho em função da frequência, da fracção IS das células crescidas na presença de 3 % de etanol e induzidas com 0,7 mM IPTG a 25°C e 1 mM IPTG a 37 °C.

Absorvância

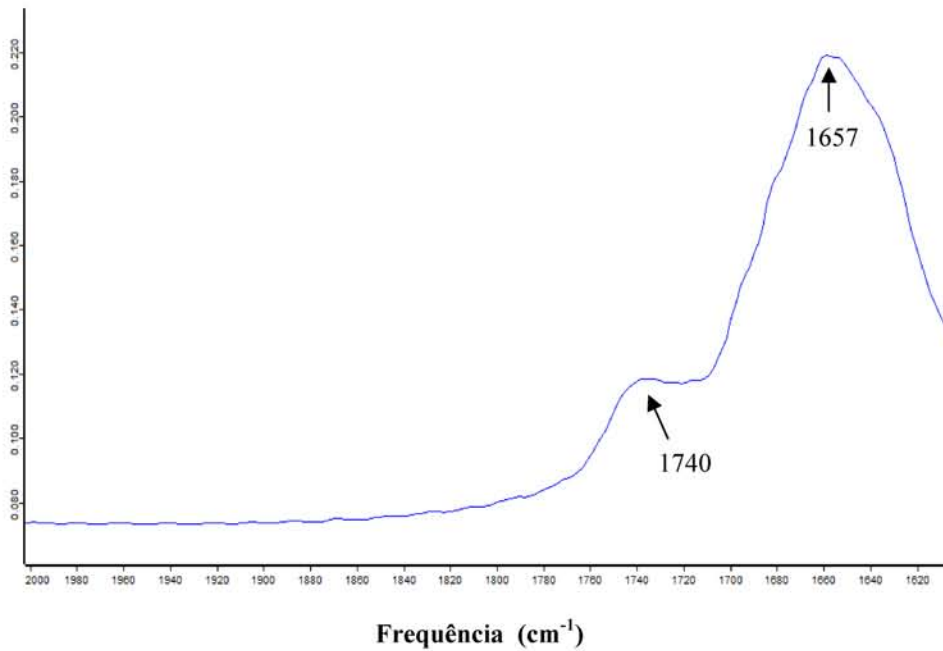


Figura 11- Espectro de FTIR na região da amida I da fração IS de células de *E.coli* pKK WT crescidas com 0,7 mM IPTG e 3 % de Etanol a 25°C.

Absorvância

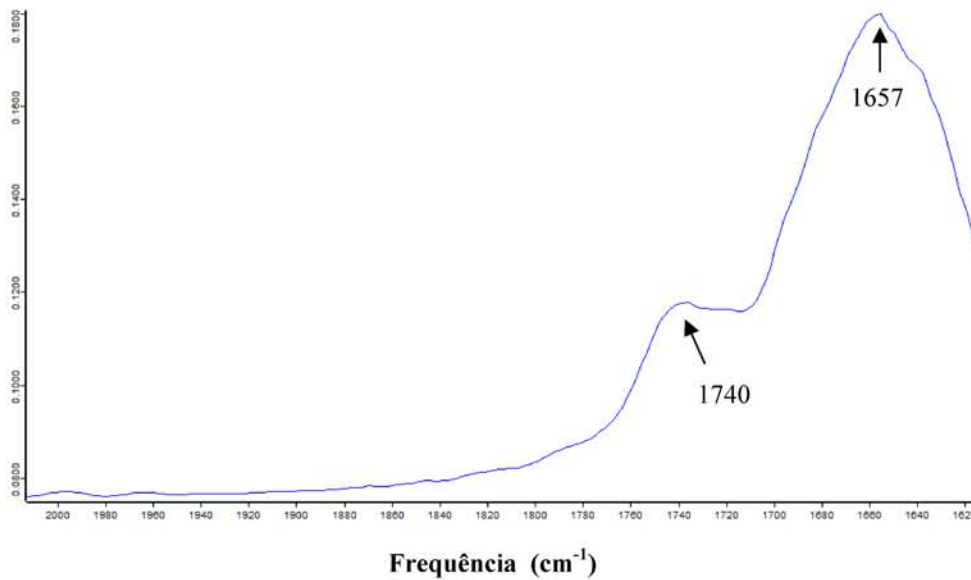


Figura 12- Espectro de FTIR na região da amida I da fração IS de células de *E.coli* pKK WT crescidas com 1 mM IPTG e 3 % de Etanol a 37°C.

A Figura 13 também mostra o espectro de absorvância na região da amida I do espectro de infravermelho da solução de amidase obtida por purificação.

Uma comparação destes espectros revela uma elevada semelhança espectral na região da amida I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) o que sugere a presença de amidase agregada nas fracções IS das células submetidas a diferentes condições de crescimento. De facto nos espectros obtidos para todas as fracções IS é visível a banda da amida I centrada a 1657 cm^{-1} .

Nas Figuras 11, 12 e 13 pode verificar-se uma linha plana de base nas frequências entre $1800-2000\text{ cm}^{-1}$ o que sugere poucas interferências e é um critério de correcção dos espectros ^[114].

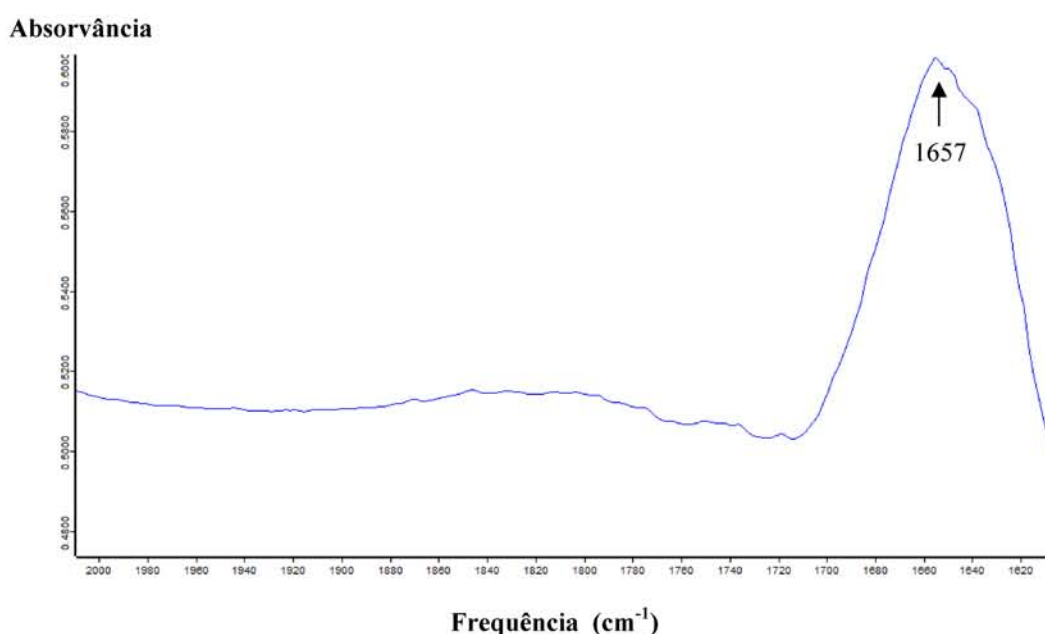


Figura 13- Espectro de FTIR na região da amida I da solução purificada da amidase recombinante de *E.coli* pKK WT.

No entanto, os espectros das fracções IS mostram o aparecimento de uma banda centrada a 1740 cm^{-1} que não ocorre no espectro da solução de amidase purificada, que reflecte a vibração dos grupos éster dos fosfolípidos presentes na membrana celular associados aos fragmentos celulares resultantes da lise e que não foram removidos ^[115].

De modo a clarificar as diferenças entre os espectros de FTIR obtidos para as diversas fracções nas diferentes condições de crescimento, foi representada a segunda derivada destes espectros.

A banda da amida I consiste em muitas bandas sobrepostas que representam diferentes elementos de estrutura secundária da proteína tal como hélices- α , folhas- β , voltas e outras, no entanto estas bandas componentes não conseguem ser resolvidas e observadas individualmente no espectro original. De modo a aumentar a separação destas bandas sobrepostas utilizam-se técnicas de aumento de resolução como a segunda derivada do espectro de absorção. Na segunda derivada os picos positivos no espectro original de FTIR tornam-se bandas negativas na mesma região da segunda derivada do espectro [88].

Através da análise dos componentes da banda da amida I pela segunda derivada (Figura 14) verificou-se que a banda da amida I do espectro de FTIR da amidase purificada é composta por três bandas: 1628; 1637,5 e 1657 cm^{-1} .

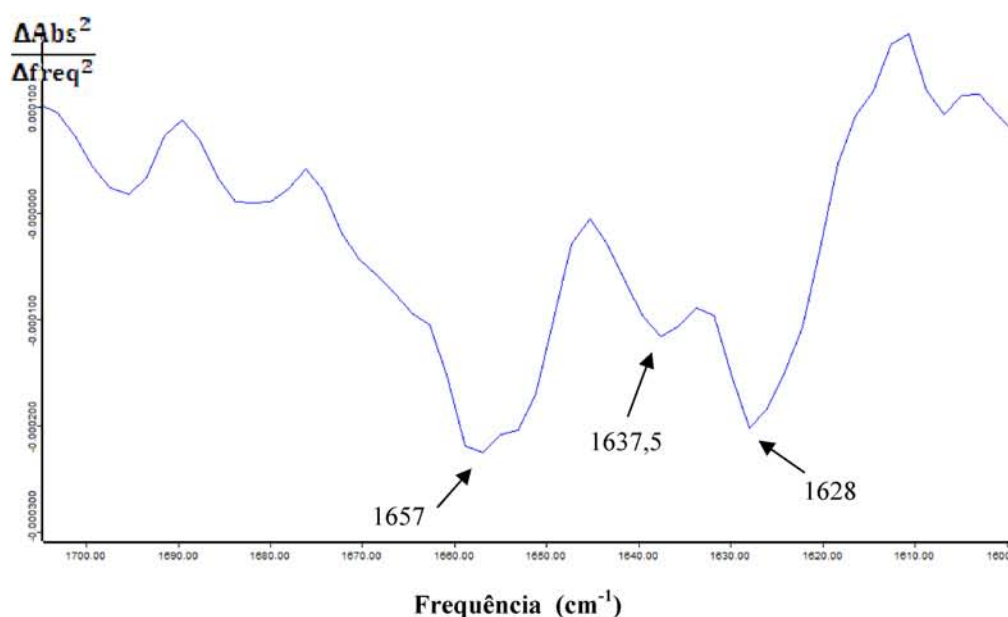


Figura 14- Espectro de segunda derivada na região da amida I da solução purificada da amidase recombinante de *E.coli* pKK WT.

A análise do espectro da segunda derivada da banda da amida I das fracções IS das diferentes condições de crescimento de 25°C revelou que esta é composta por três bandas componentes situadas a aproximadamente: 1632, 1657 e 1683 cm^{-1} (Figura 15). O mesmo tipo de comportamento surge no espectro da segunda derivada da banda da

amida I das frações IS das diferentes condições de crescimento de 37°C sendo esta composta por três bandas; 1636, 1658 e 1682 cm⁻¹(Figura 16).

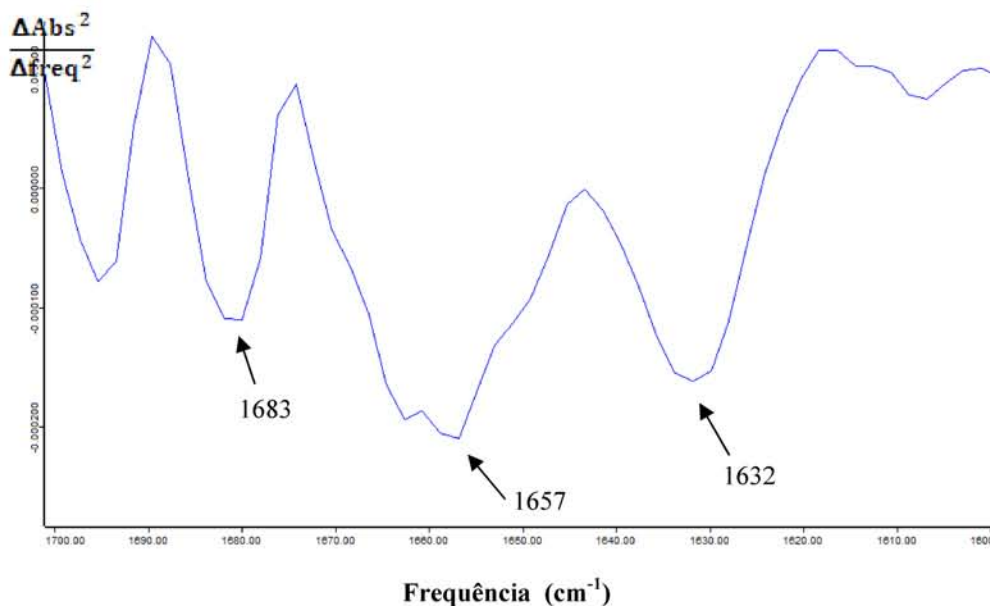


Figura 15- Espectro de segunda derivada na região da amida I da fração IS da condição de crescimento de *E.coli* pKK WT com 0,7 mM IPTG e 3 % de Etanol a 25°C.

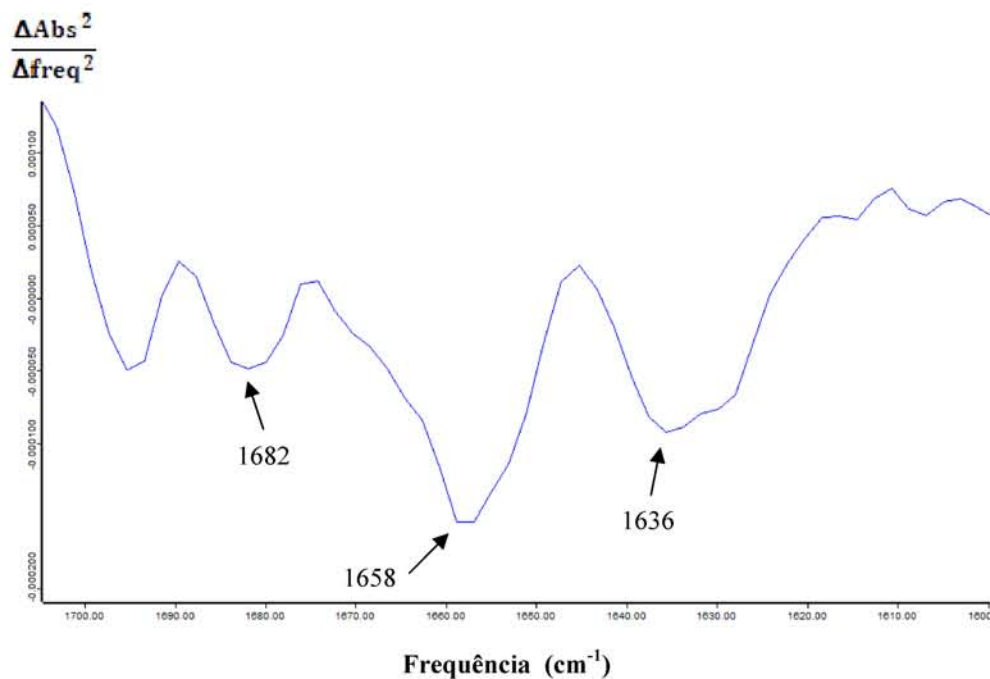


Figura 16- Espectro de segunda derivada na região da amida I da fração IS de células de *E.coli* pKK WT crescidas com 1 mM IPTG e 3 % de Etanol a 37°C.

Em todos os casos, o componente principal da banda da amida I observada a aproximadamente 1657 pode ser associado à estrutura em hélice- α . Quanto às bandas duplas, 1628 e 1637 cm^{-1} do espectro de FTIR da amidase purificada da Figura 14 são características da estrutura em folhas- β antiparalela e paralela, respectivamente ^[116].

A observação das Figuras 15 e 16 correspondentes ao espectro de FTIR das fracções IS revelam que estas duas bandas convergem numa única situada a 1632 e 1636 respectivamente e este comportamento foi também verificado para todas as fracções IS de outras condições de crescimento.

Aparentemente o enzima agrega nas fracções IS ocorrendo uma desorganização da arquitectura nativa das suas folhas- β , ocorrendo um rearranjo por formação de interacções intermoleculares, o que é corroborado pela presença de uma banda intensa a aproximadamente 1680 cm^{-1} no espectro de todas as fracções ^[117].

Foi ainda avaliada para cada uma das fracções, a largura a meia altura da banda da amida I do espectro de FTIR. Deste modo foi possível avaliar interacções intermoleculares responsáveis pela agregação, uma vez que quanto maior o alargamento da região da amida I, maior a intensidade destas interacções, tal como verificado por Muyonga *et al* no caso específico do colagénio ^[118].

Na Figura 17 estão representadas as larguras do pico da amida I dos espectros de FTIR para as fracções IS de todas as condições de crescimento e também para a solução de amidase purificada.

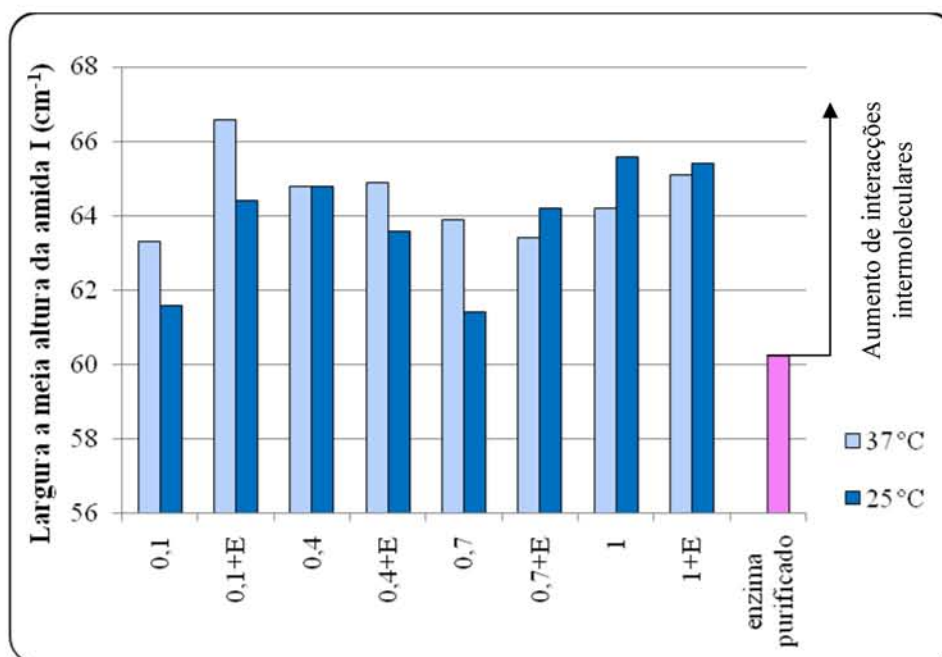


Figura 17- Largura a meia altura do pico da amida I do espectro de FTIR das frações IS das células crescidas em diferentes condições de crescimento, nomeadamente para temperaturas de 25°C e 37°C (azul escuro e claro respectivamente), diferentes concentrações de IPTG (mM) e presença de 3% de etanol (+E), e da solução de amidase purificada (rosa).

Através da Figura 17 é possível verificar nitidamente que a banda da amida I do espectro de FTIR de todas as frações IS estudadas apresenta uma largura a meia altura superior à do enzima purificado (solúvel), representativa do aumento das interações intermoleculares com a agregação. Assim, tal como assumido anteriormente verifica-se a existência de proteína agregada sob a forma de corpos de inclusão em todas as condições de crescimento.

Na análise da segunda derivada dos espectros de FTIR na região da amida I de todas as frações IS foi possível observar duas bandas componentes principais, em que uma delas está posicionada na região entre 1650-1658 cm^{-1} e outra em 1620-1640 cm^{-1} , que podem ser atribuídas respectivamente a estruturas em hélices- α e folhas- β agregadas [88]. O cálculo da razão entre a absorvância a 1620-1640 cm^{-1} (folhas- β agregadas) e a absorvância a 1650-1658 cm^{-1} (hélice- α) da segunda derivada do espectro de FTIR para todas as frações IS nas diversas condições de crescimento permitiu avaliar a diferente contribuição destas componentes para a estrutura da amidase agregada. Os resultados obtidos estão representados na Figura 18 e foram comparados com a razão entre a contribuição das folhas- β intramoleculares [98] a 1637,5 cm^{-1} e a contribuição das

hélices- α a 1657 cm^{-1} na segunda derivada do espectro de FTIR para a amidase purificada.

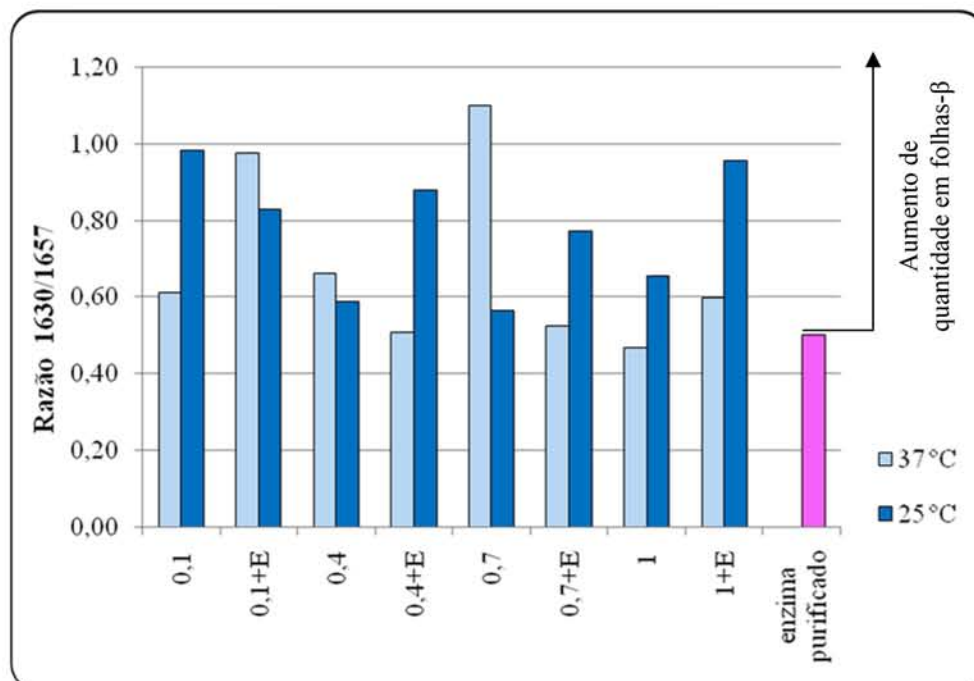


Figura 18- Razão dos valores de absorvância entre as bandas a 1630 cm^{-1} e a 1657 cm^{-1} da segunda derivada do espectro de FTIR das frações IS das diferentes condições de crescimento, nomeadamente para temperaturas de 25°C e 37°C (azul escuro e claro respectivamente), diferentes concentrações de IPTG (mM) e presença de 3% de etanol (+E), e da solução de amidase purificada (rosa).

Como pode ser facilmente observado, no geral as frações IS contêm amidase agregada que demonstra um aumento do seu conteúdo em folhas- β agregadas, comparativamente ao enzima purificado. Esta observação foi também verificada para outras proteínas agregadas em corpos de inclusão ^[45].

De um modo geral as condições a 25°C formam maior quantidade de folhas- β agregadas que as condições a 37°C , principalmente na presença de etanol e notoriamente estas são as condições com maior actividade enzimática associada às frações IS.

Esta situação foi também comprovada face a desvios na frequência dos picos representativos das folhas- β agregadas na segunda derivada dos espectros de FTIR das frações IS obtidas em diferentes condições. De facto o grupo carbonilo é muito sensível a ligações de hidrogénio ^[89] e é comum verificar-se na região da amida I um desvio para uma frequência mais baixa que resulta de um aumento do número ou

formação de ligações de hidrogénio mais fortes ^[98]. Como pode ser observado na Figura 19 o pico atribuído às folhas- β agregadas nas fracções IS das células crescidas a 25 °C está a uma frequência de 1632 cm^{-1} (verde). Nas fracções IS das células crescidas a 37 °C este pico ocorreu a uma frequência maior de 1636 cm^{-1} (rosa) que as condições a 25 °C (verde) o que pode ser atribuído a folhas- β agregadas contendo ligações de hidrogénio mais fracas. Mais ainda, foi verificada a presença de uma banda a 1683 cm^{-1} de menor intensidade para os agregados obtidos a 37 °C (rosa) relativamente aos agregados a 25 °C (verde) e que pode ser atribuída a folhas- β agregadas contendo ligações intermoleculares mais fracas. Os resultados demonstraram que, face às condições a 37 °C, as condições a 25 °C formaram amídase agregada sob a forma de corpos de inclusão com maior conteúdo de folhas- β agregadas por interações intermoleculares, principalmente na presença de etanol, e são estas as condições que formam corpos de inclusão com elevada actividade biológica.

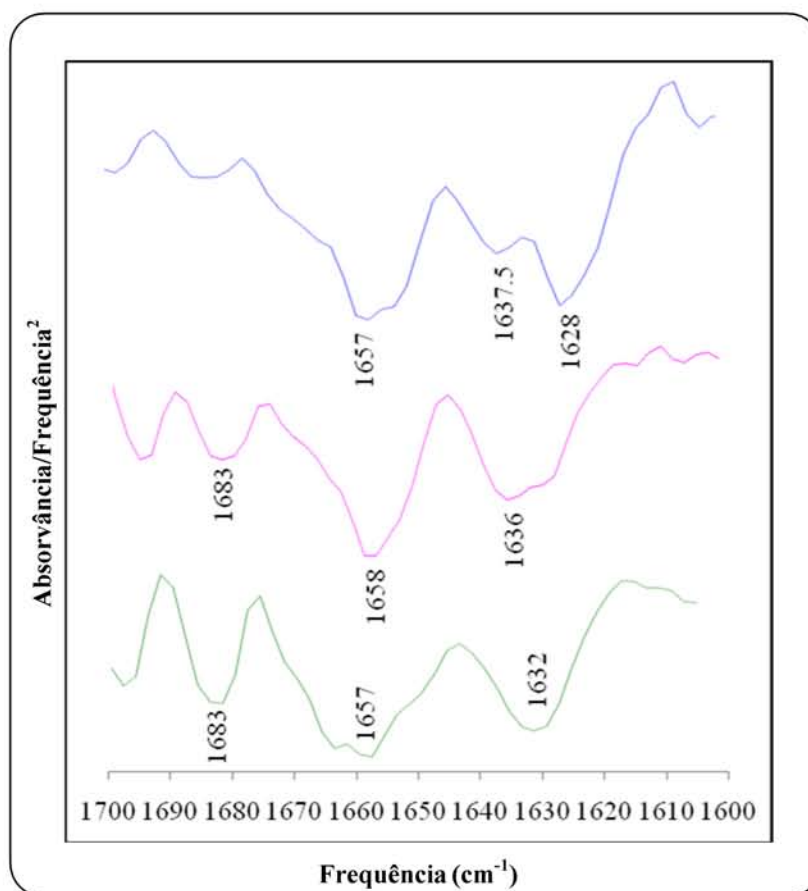


Figura 19- Comparação da segunda derivada dos espectros de FTIR na região da amida I da amidase purificada (azul) e das fracções IS das seguintes condições de crescimento: 1 mM IPTG + Etanol a 37°C (rosa) e 0,7 mM IPTG + Etanol a 25°C (verde).

- Amida II

Uma vez que a banda da amida I é mais sensível aos efeitos da hidratação^[89] observações da região da amida II permitem avaliar de uma forma mais eficiente alterações devidas a modificações conformacionais da proteína na agregação. Para além disso, a absorção pelo vapor de água atmosférico interfere menos nesta região e é uma região menos afectada por possíveis distorções dos espectros e pela amplificação do ruído que poderá surgir quando se utilizam técnicas de aumento da resolução como a segunda derivada dos espectros^[88].

Assim, será estudada a região da amida II entre 1500 e 1600 cm^{-1} . As características espectrais observadas nesta região são devidas maioritariamente a absorções que dizem respeito às estruturas secundárias em hélices- α aproximadamente entre 1540-1545 cm^{-1} e folhas- β entre 1520-1530 cm^{-1} ^[119].

As Figura 20 e 21 mostram respectivamente o espectro de absorvância no infravermelho das fracções IS da condição de crescimento com 0,7 mM IPTG e etanol a 25 °C e 1 mM IPTG a 37 °C e etanol. Nestes espectros é visível a banda da amida II centrada a 1545 cm^{-1} . O mesmo se verifica para a Figura 22 onde o espectro de absorvância no infravermelho da solução de amidase purificada demonstra a presença da banda da amida II centrada a 1545 cm^{-1} .

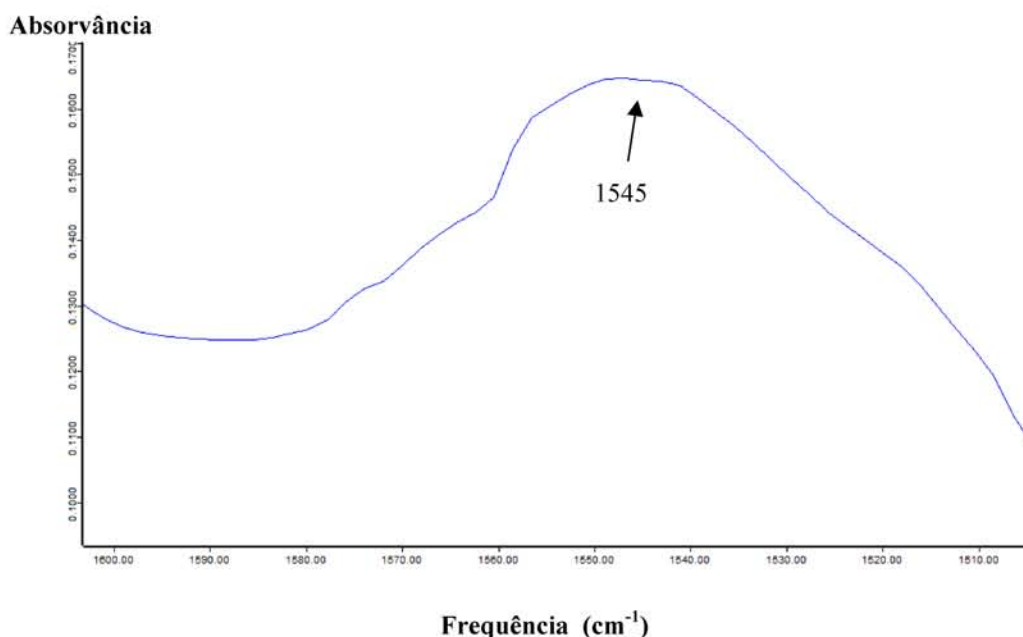


Figura 20- Espectro de FTIR na região da amida II da fracção IS de células de *E.coli* pKK WT crescidas com 0,7 mM IPTG e 3 % de Etanol a 25°C.

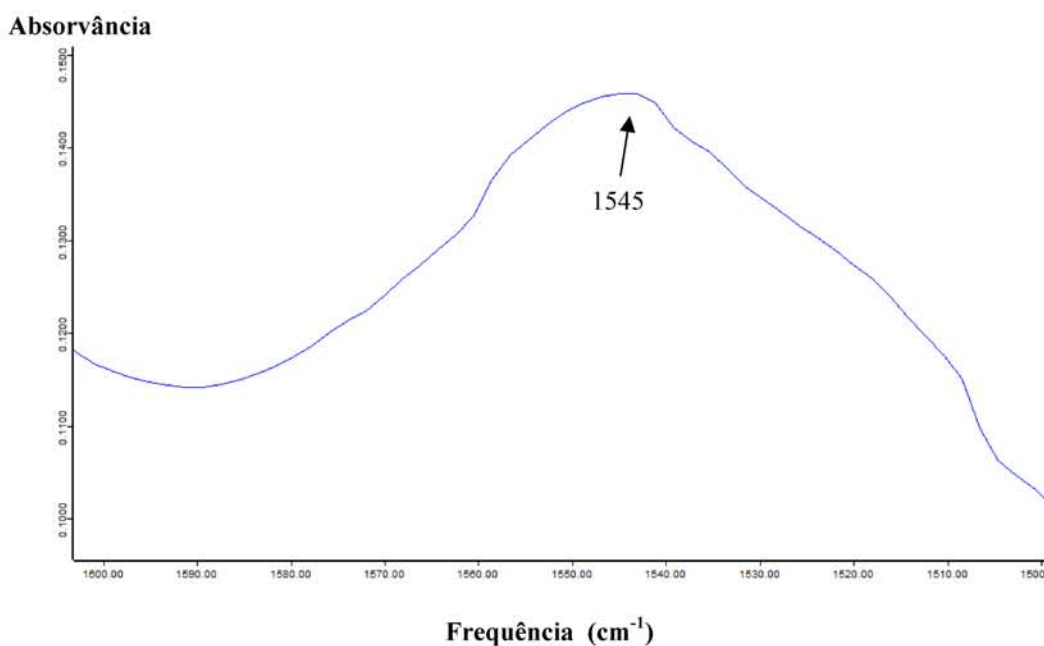


Figura 21- Espectro de FTIR na região da amida II da fração IS de células de *E.coli* pKK WT crescidas com 1 mM IPTG e 3 % de Etanol a 37°C.

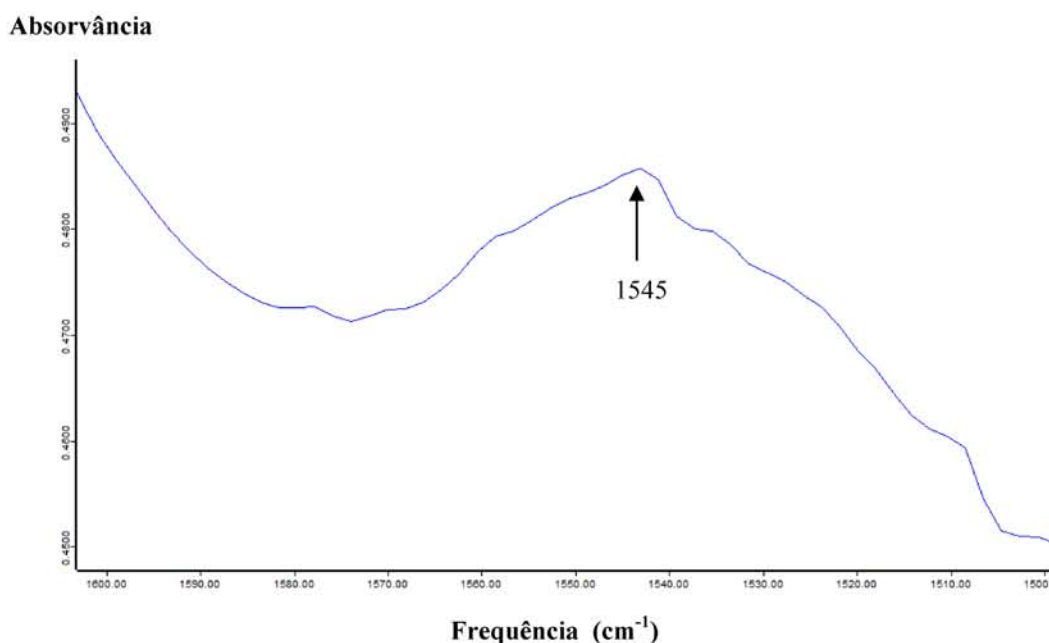


Figura 22- Espectro de FTIR na região da amida II da solução purificada da amidase recombinante de *E.coli* pKK WT.

A observação da segunda derivada do espectro na região da amida II da amidase purificada (Figura 23) revela que esta é composta por três bandas: 1524, 1545 e 1557 cm⁻¹ à semelhança da região da amida I. A banda a 1557 cm⁻¹ poderá ser atribuída a

contribuições das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos ácidos, nomeadamente do grupo carboxilo de Asp e Glu ou da extremidade C-terminal da proteína^[120]. As bandas a frequências mais baixas, 1545 e 1524 cm^{-1} serão possivelmente as bandas da amida II que reflectem diferentes estruturas secundárias do enzima^[119]. A primeira poderá ser atribuída à estrutura em hélice- α e a última devida a estruturas em folhas- β . O mesmo tipo de atribuições poderá ser efectuada nas Figuras 24 e 25 que representam a segunda derivada do espectro de FTIR das fracções IS em diferentes condições de crescimento, mas desta feita para as bandas a 1545 cm^{-1} e aproximadamente 1515 cm^{-1} .

Alguns desvios foram observados na banda representada na Figura 26, atribuída a folhas- β nos espectros da segunda derivada da região da amida II para as fracções IS das diferentes condições de crescimento. Uma vez que a banda da amida II surge das vibrações do grupo N-H, frequências mais baixas são atribuídas a grupos de proteína estabelecendo ligações de hidrogénio mais fortes. Esta situação pode ser verificada no geral para as folhas- β atribuídas ao pico de aproximadamente 1512 cm^{-1} e 1514 cm^{-1} (rosa e verde) presentes nas fracções IS das diferentes condições de crescimento no espectro da segunda derivada, o que significa que ao estarem agregadas estabelecem ligações de hidrogénio mais fortes que as folhas- β da solução de amidase purificada (azul) que tem uma frequência de 1524 cm^{-1} .

A observação detalhada das Figuras 24 e 25 revela um aumento nítido da contribuição do pico a 1557 cm^{-1} na segunda derivada do espectro das fracções IS para as diferentes condições de crescimento face à segunda derivada do espectro de FTIR do enzima puro. A existência desta banda foi devida a alterações na protonação ou ligações de hidrogénio nas cadeias laterais de resíduos de aminoácidos como o Asp e Glu ou na extremidade C-terminal da proteína que surgem como consequência da agregação, neste caso sendo maior para as condições a 25 °C na presença de etanol e que parece ter favorecido a actividade biológica dos agregados.

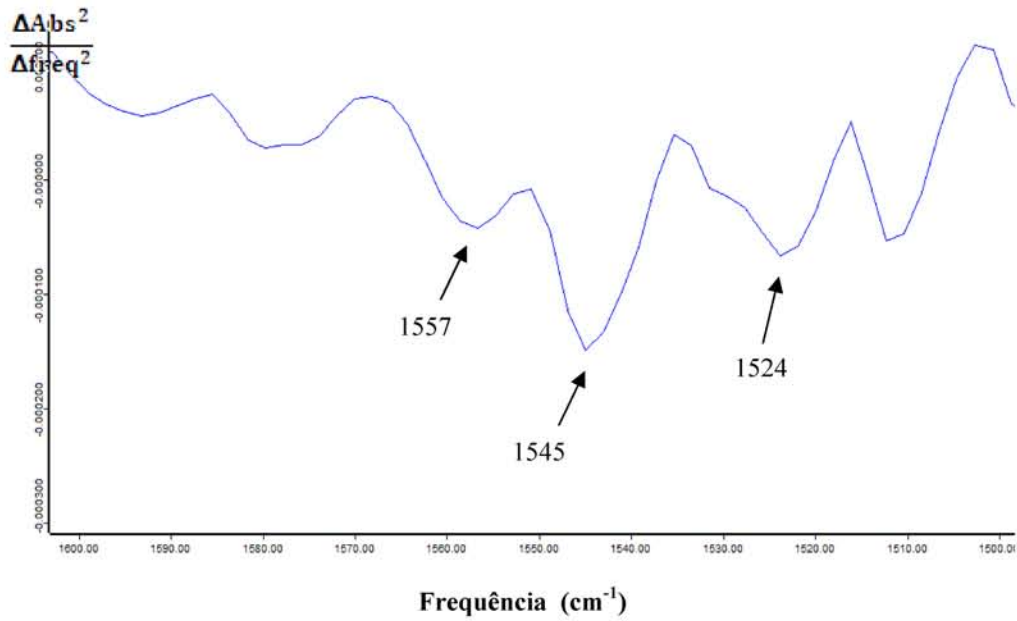


Figura 23- Espectro de segunda derivada na região da amida II da solução purificada da amidase recombinante de *E.coli* pKK WT.

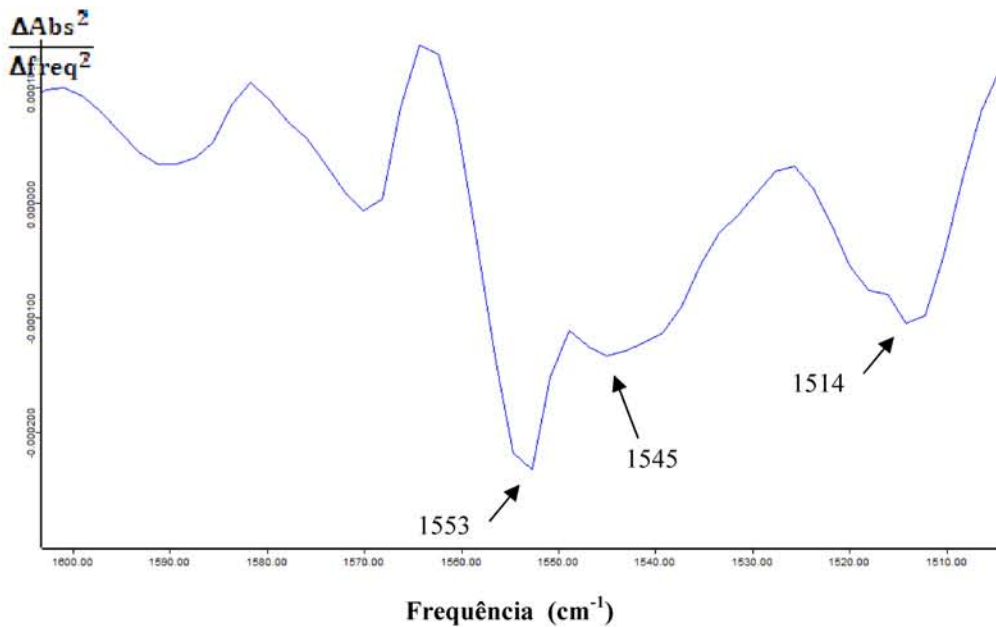


Figura 24- Segunda derivada do espectro de FTIR na região da amida II da fração IS de células de *E.coli* pKK WT crescidas com 0,7 mM IPTG e 3 % de Etanol a 25°C.

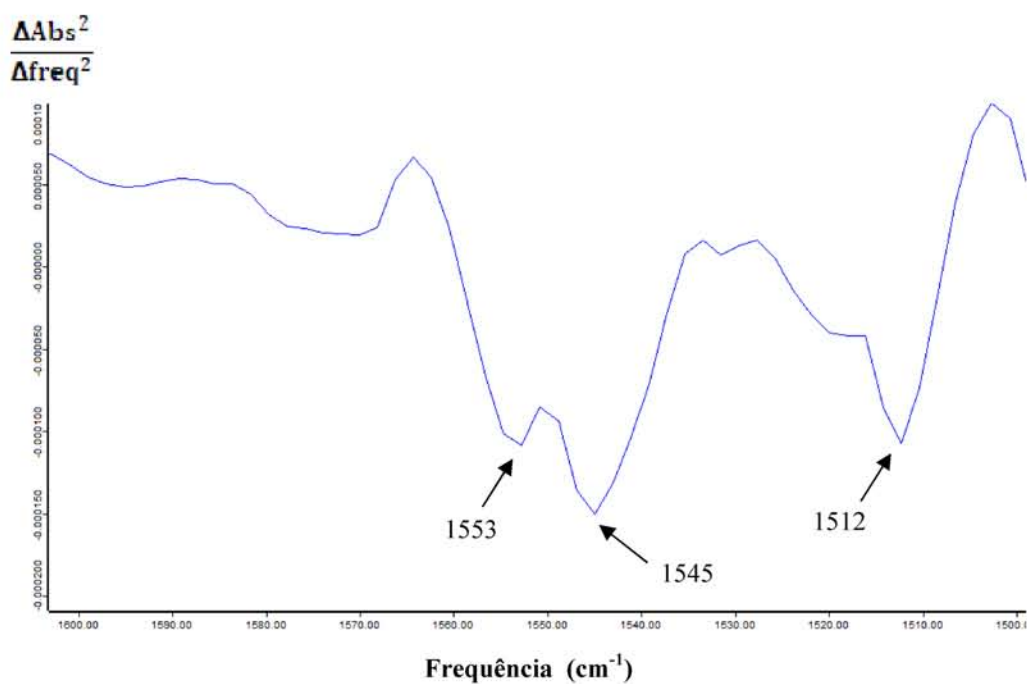


Figura 25- Espectro de segunda derivada na região da amida II da fração IS de células de *E.coli* pKK WT crescidas com 1 mM IPTG e 3 % de Etanol a 37°C.

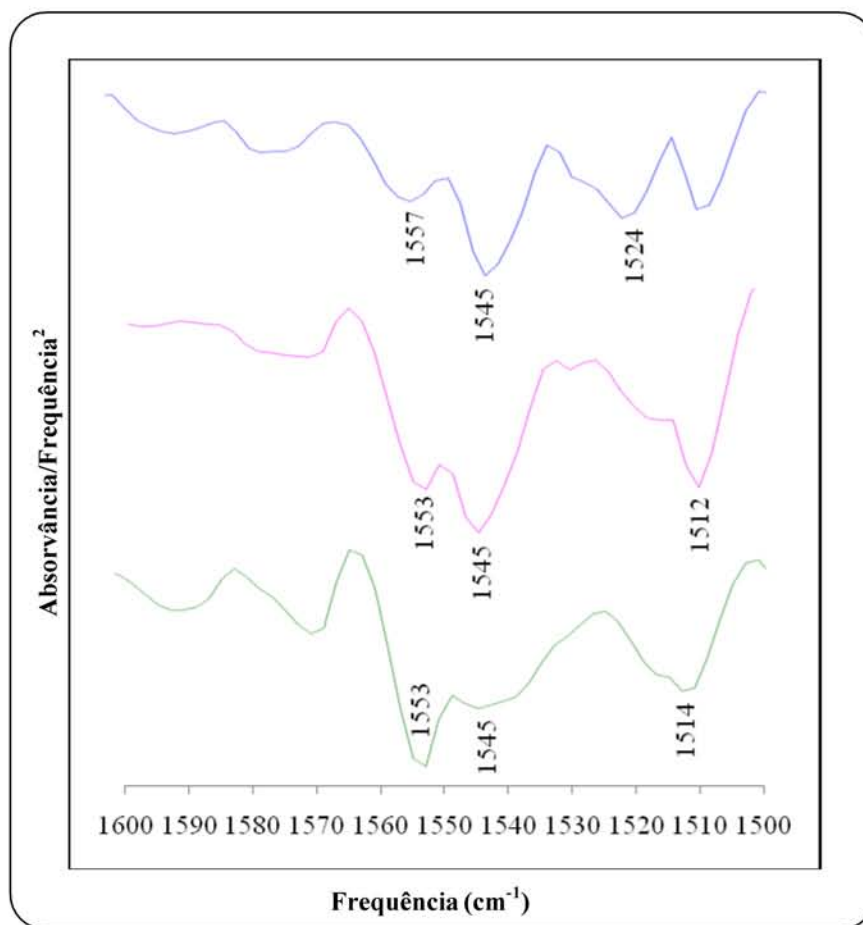


Figura 26- Comparação da segunda derivada dos espectros de FTIR na região da amida II da amidase purificada (azul) e das fracções IS das seguintes condições de crescimento: 1 mM IPTG + Etanol a 37°C (rosa) e 0,7 mM IPTG + Etanol a 25°C (verde).

As fracções IS constituídas por enzima agregada com elevadas actividades enzimáticas demonstraram uma maior contribuição relativa do pico a aproximadamente 1515 cm^{-1} face ao pico a 1545 cm^{-1} revelando um aumento da contribuição das folhas- β relativamente ao enzima puro, o que pode ser confirmado na Figura 27.

Para as restantes condições de cultura o enzima agregado nas fracções IS, aparentemente mantém uma estrutura secundária semelhante à estrutura do enzima purificado no entanto aparentemente esta estrutura não favorece a actividade biológica dos agregados.

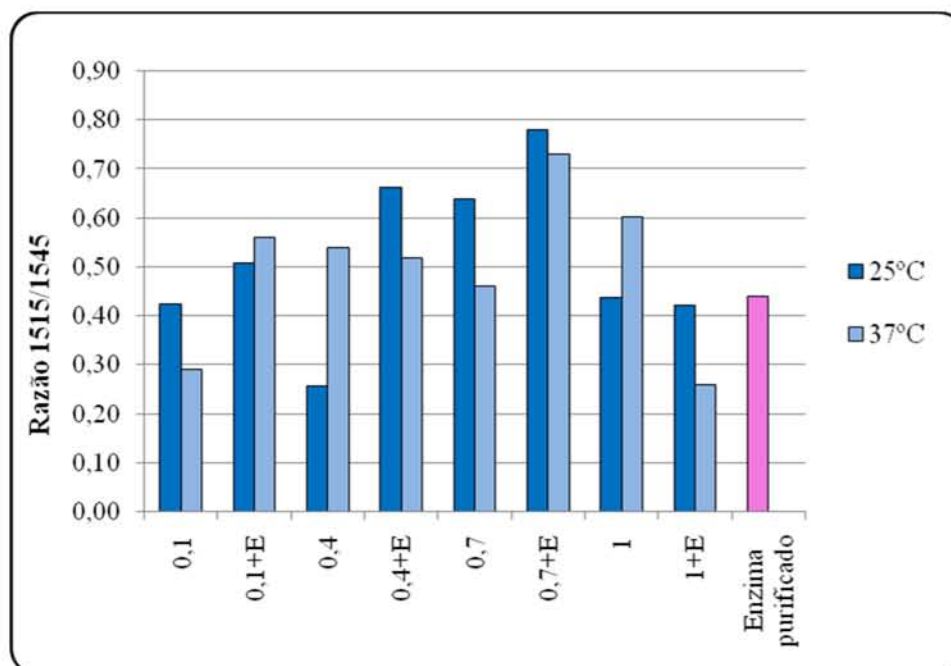


Figura 27- Razão dos valores de absorvância da segunda derivada da amida II dos espectros do FTIR, no pico a 1515 cm^{-1} e 1545 cm^{-1} das fracções IS das diferentes condições de crescimento nomeadamente para temperaturas de 25°C e 37°C (azul escuro e claro respectivamente), diferentes concentrações de IPTG (mM) e presença de 3% de etanol (+E), e da solução de amidase purificada (rosa).

Assim, a diminuição de actividade enzimática nos corpos de inclusão poderá ser devida à ocorrência de interacções intermoleculares nas suas folhas- β com uma estrutura mais aproximada da proteína purificada, e estas interacções entre várias moléculas de proteína poderão dificultar o acesso do substrato ao centro activo da amidase que está localizado numa volta entre uma folha- β e uma hélice- α ^[27] e/ou diminuir a liberdade conformacional do enzima necessária à catálise enzimática ^[1].

Em oposição alterações conformacionais devidas à agregação poderão manobrar a proteína favoravelmente no desempenho da sua actividade biológica possivelmente facilitado por um crescimento mais lento.

Na ausência de ligações dissulfureto intermoleculares, a elevada termoestabilidade da amidase parece estar dependente de factores como o efeito hidrofóbico, ligações de hidrogénio, etc ^[27]. As ligações de hidrogénio apresentam um papel importante na formação de corpos de inclusão, uma vez que a agregação poderá ser devida a um aumento de interacções intermoleculares por ligações de hidrogénio.

Assim, apesar das condições de crescimento de 37°C apresentarem uma estrutura mais semelhante com a estrutura nativa como se verifica na Figura 26, são as ligações de hidrogénio que se estabelecem intermolecularmente nas folhas- β que originam a existência de corpos de inclusão e conseqüentemente uma diminuição da actividade enzimática pois como já foi referido, estas interacções nas folhas- β poderão dificultar o acesso do substrato ao centro activo do enzima e/ou diminuir a liberdade conformacional do enzima necessária à catálise enzimática diminuindo assim a sua capacidade para catalisar reacções enzimáticas.

Assim, os corpos de inclusão menos activos agregaram com uma estrutura semelhante à do enzima solúvel (solução de amidase purificada) e este facto sugere uma solubilização dos corpos de inclusão com um solubilizante fraco nomeadamente L-Arginina ^[106], deste modo tentar-se-à a solubilização do enzima numa forma biologicamente activa. Ensaio semelhantes foram realizados com Gdn-HCl.

- Análise de Estrutura da Fracção Solúvel (S) e Solução de Amidase Purificada

Em relação às fracções solúveis (S) representadas na Figura 28, verifica-se que os espectros destas fracções diferem dos espectros da solução de amidase purificada, uma vez que os picos de maior absorvância não correspondem aos das fracções S, principalmente na região da amida II. Este facto foi também verificado para as restantes condições de crescimento.

Este comportamento ocorre porque as fracções solúveis (S) das diversas condições de crescimento possuem outras proteínas contaminantes para além da amidase, “mascarando” assim a sua presença, o que foi confirmado por análise electroforética, em SDS-PAGE com 8 M ureia, das fracções obtidas nas diferentes condições de crescimento (Figura 4).

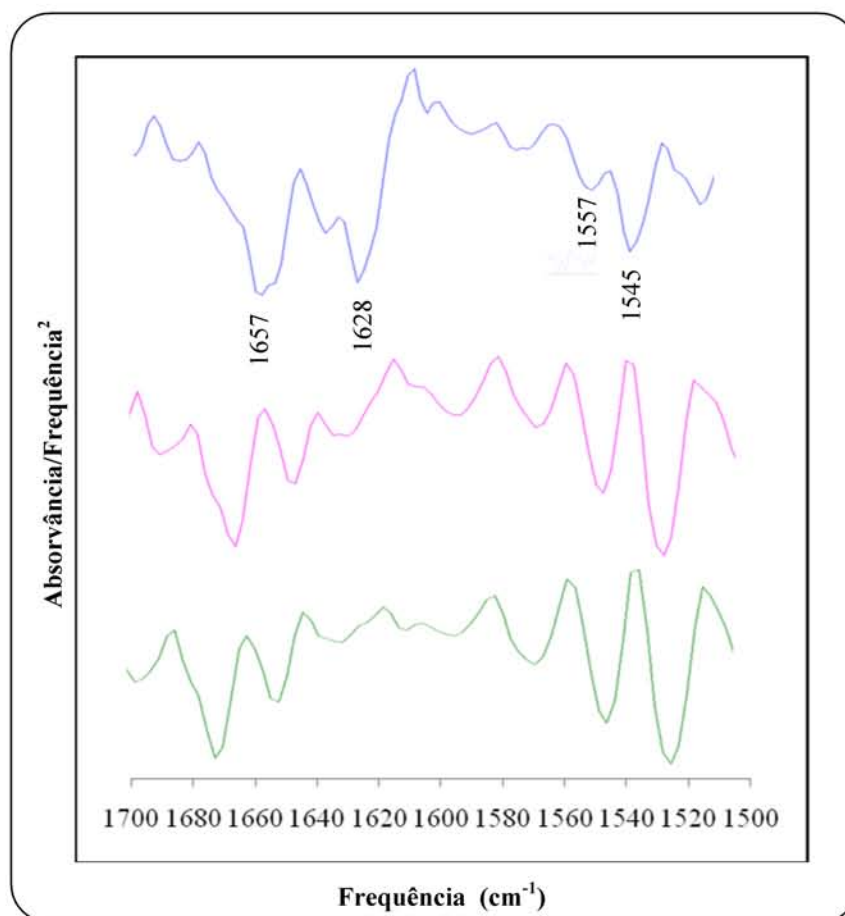


Figura 28- Comparação da segunda derivada dos espectros de FTIR da amidase purificada (azul) e das fracções S nas seguintes condições de crescimento: 1 mM IPTG + Etanol a 37°C (rosa) e 0,4 mM IPTG + Etanol a 25°C (verde).

3.4- Solubilização dos corpos de inclusão com L-Arginina e Gdn-HCl

A solubilização dos agregados formados nas diferentes condições de crescimento foi efectuada por mistura das fracções insolúveis IS das células recolhidas com soluções de diferentes concentrações de L-Arginina ou de Gdn-HCl. Após a separação das fracções solúveis (S') e insolúveis (IS'), foi avaliada a actividade enzimática de amidase e a quantidade de proteína presente.

Os resultados esquematizados nas Figuras 29 e 30 representam a actividade específica de amidase não recuperada, associada às fracções IS' após a solubilização com diferentes concentrações de L-Arginina dos agregados das fracções IS obtidas nas condições de crescimento a 25 °C e 37 °C, respectivamente. Como pode ser observado, a utilização de concentrações de L-Arginina de 0,25; 0,5 e 1 M (tonalidades rosa)

resultou em menores actividades de amidase associadas à fracção IS' de todas as condições de crescimento. Esta análise sugere que para concentrações de L-Arginina superiores a 1,25 M inclusive (tonalidades azuis) ocorrerá menor capacidade de solubilização dos agregados.

Para além disso, os resultados demonstram que a solubilização dos agregados obtidos para as condições a 25 °C aparenta ser menos eficiente que para os agregados obtidos a 37 °C uma vez que no geral os últimos apresentaram menor actividade enzimática associada às fracções IS', tendo-se obtido a menor actividade enzimática associada à fracção IS' para a solubilização com 1 M de L-Arginina dos agregados obtidos a 37 °C e 0,4 mM de IPTG na presença de etanol.

A observação das Figuras 31 e 32 confirma os resultados referidos anteriormente. As Figuras 31 e 32 representam a actividade específica de amidase recuperada na fracção solúvel S' após a solubilização com diferentes concentrações de L-Arginina, dos agregados obtidos nas condições de crescimento a 25 °C e 37 °C, respectivamente.

Como se pode verificar, para todos os agregados as concentrações de 1,25 e 1,5 M de L-Arginina (tonalidades azuis) originaram uma menor actividade enzimática de amidase recuperada na fracção S' comparativamente a concentrações mais baixas de L-Arginina (tonalidades rosa). Tal como já referenciado por outros autores ^[103] possivelmente o enzima na presença de elevadas concentrações de L-Arginina pode sofrer uma desactivação. Apesar da L-Arginina ser utilizada como fraco solubilizante, concentrações elevadas poderão não facilitar o reenrolamento da proteína numa estrutura biologicamente activa. Em oposição, para concentrações de L-Arginina de 0,25; 0,5 e 1 M (tonalidades rosa) verifica-se um aumento da actividade enzimática de amidase associada à fracção S' o que sugere que estas concentrações são adequadas para a solubilização dos agregados obtidos, com melhores resultados obtidos na presença de 1 M de L-Arginina (violeta).

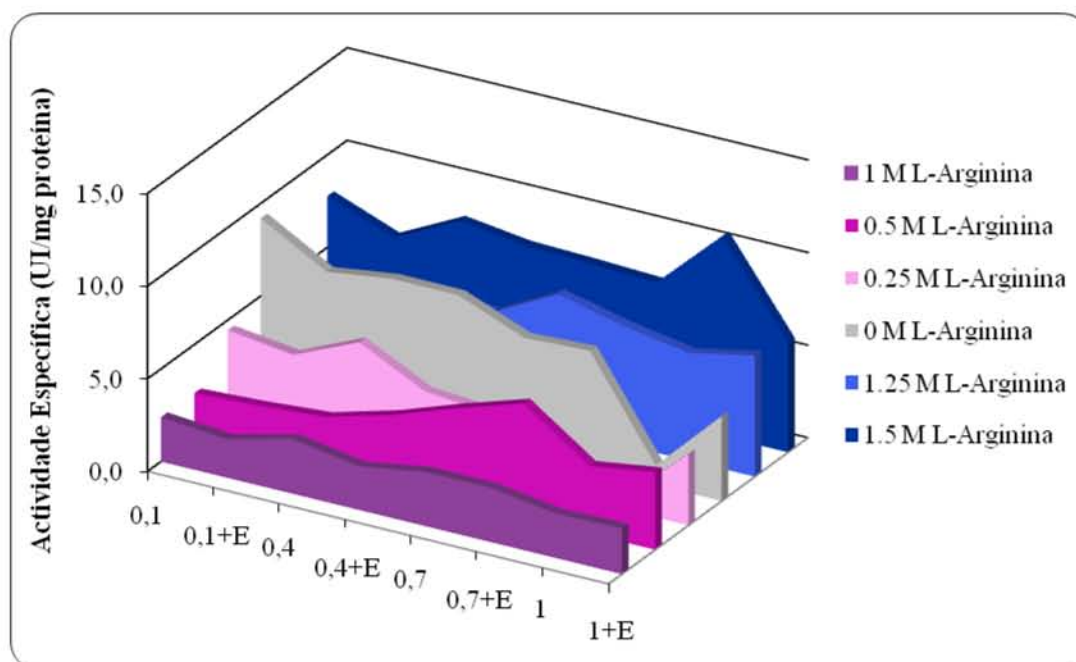


Figura 29 - Efeito da concentração de L-Arginina na solubilização dos agregados obtidos para diferentes condições de crescimento a 25 °C e sujeitos a diferentes concentrações de IPTG (mM) e presença de 3% de etanol (+E). A actividade específica de amidase associada às fracções insolúveis (IS') obtidas após a solubilização foi determinada como referido nos Materiais e métodos.

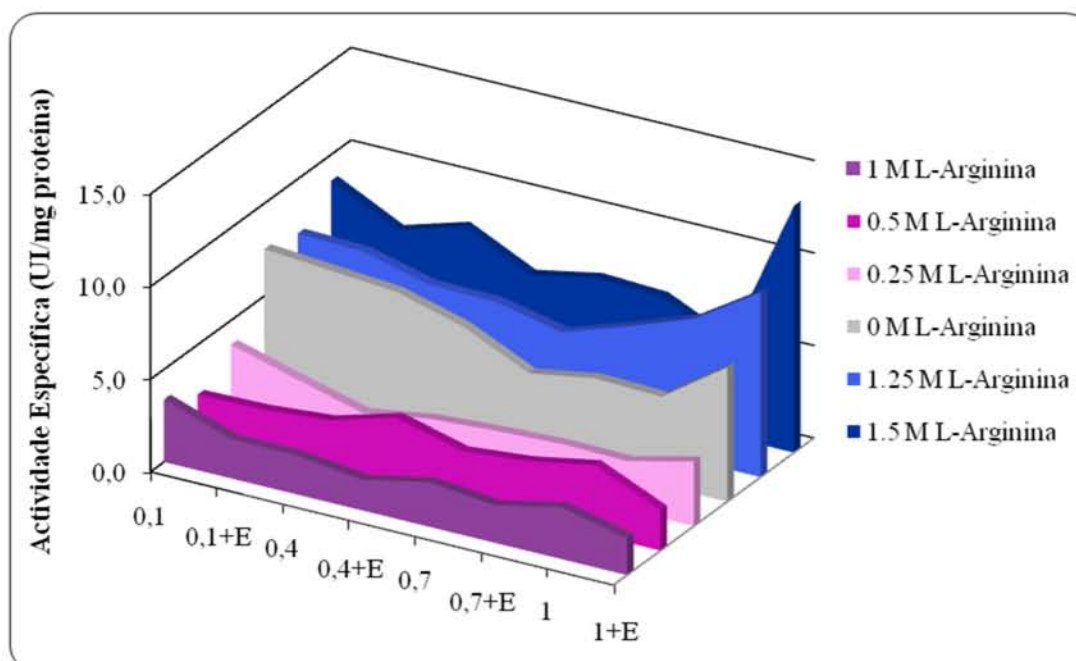


Figura 30 - Efeito da concentração de L-Arginina na solubilização dos agregados obtidos para diferentes condições de crescimento a 37 °C e sujeitos a diferentes concentrações de IPTG (mM) e presença de 3% de etanol (+E). A actividade específica de amidase associada às fracções insolúveis (IS') obtidas após a solubilização foi determinada como referido nos Materiais e métodos.

Pela análise das Figuras 31 e 32, observa-se uma maior actividade de enzima associada à fracção S' na solubilização com 1 M de L-Arginina (violeta) dos agregados obtidos nas condições de 25 °C na presença de etanol utilizando 0,4 mM e 0,7 mM IPTG, tendo-se obtido 43,08 UI/mg proteína e 45,29 UI/mg proteína respectivamente.

Tal como se constatou na Figura 2, foram estas condições a 25 °C que apresentaram as mais elevadas actividades enzimáticas de amidase agregada sob a forma de corpos de inclusão, respectivamente 0,62 UI/mg proteína e 1,00 UI/mg proteína, o que indica uma recuperação de enzima para a fracção S' de aproximadamente 70 e 45 vezes, respectivamente. Para todas os agregados obtidos foi efectuado o cálculo da razão entre actividade enzimática de amidase recuperada (fracção S') e actividade enzimática de enzima agregado (fracção IS) denominada por actividade residual, e permitiu obter a representação da Figura 33.

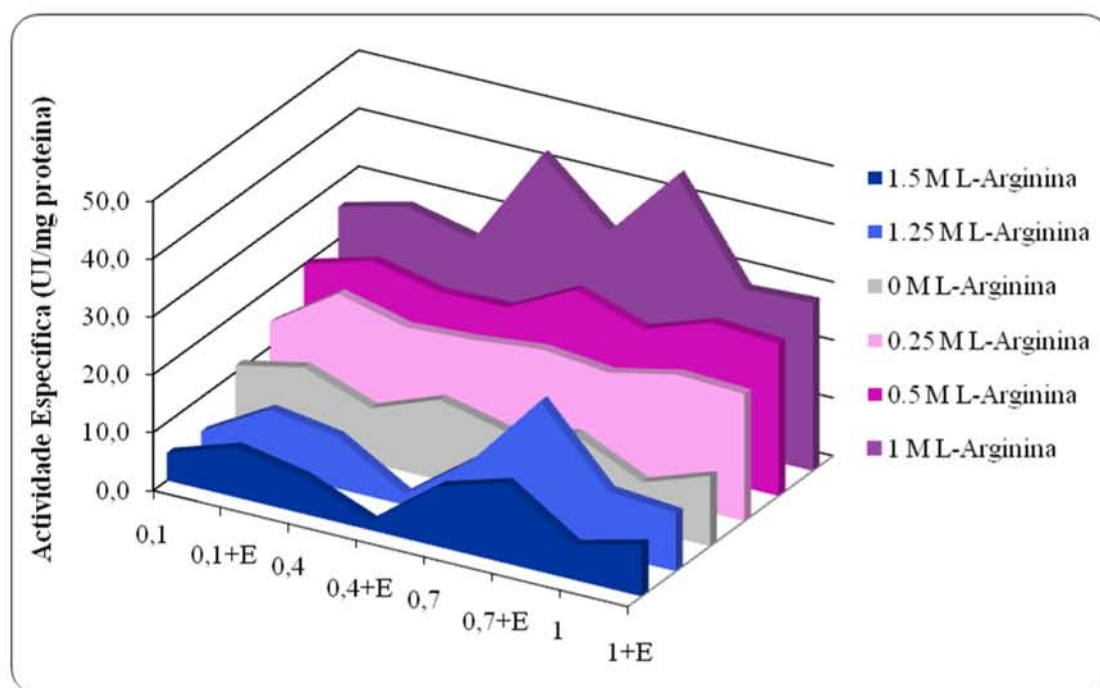


Figura 31 - Efeito da concentração de L-Arginina na solubilização dos agregados obtidos para diferentes condições de crescimento a 25 °C e sujeitos a diferentes concentrações de IPTG (mM) e presença de 3% de etanol (+E). A actividade específica de amidase associada às fracções solúveis (S') obtidas após a solubilização foi determinada como referido nos Materiais e métodos.

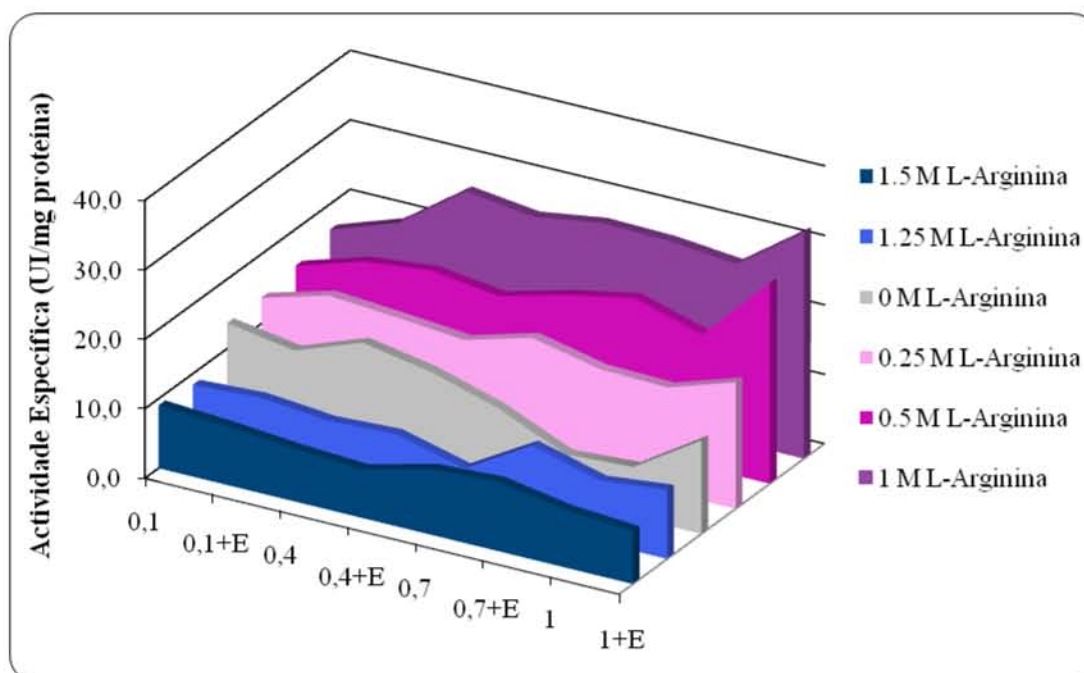


Figura 32 - Efeito da concentração de L-Arginina na solubilização dos agregados obtidos para diferentes condições de crescimento a 37 °C e sujeitos a diferentes concentrações de IPTG (mM) e presença de 3% de etanol (+E). A actividade específica de amidase associada às fracções solúveis (S') obtidas após a solubilização foi determinada como referido nos Materiais e métodos.

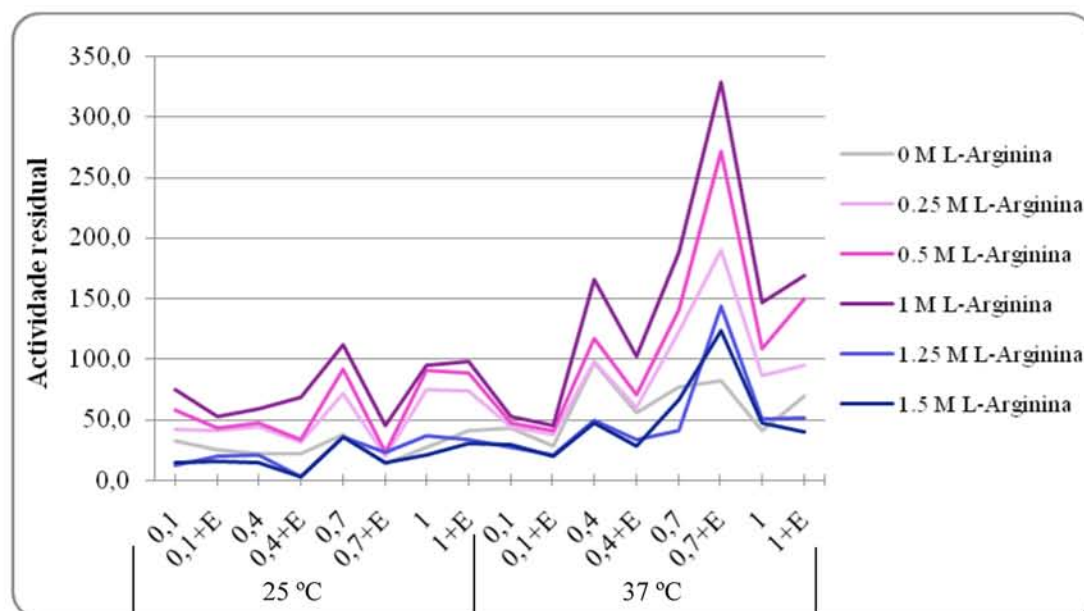


Figura 33 – Valores da razão entre a actividade específica de amidase recuperada na fracção solúvel (S'), após solubilização com diferentes concentrações de L-Arginina, e a actividade específica de enzima presente na fracção insolúvel (IS) das diferentes condições de crescimento, nomeadamente para temperaturas de 25°C e 37°C, diferentes concentrações de IPTG (mM) e presença de 3% de etanol (+E).

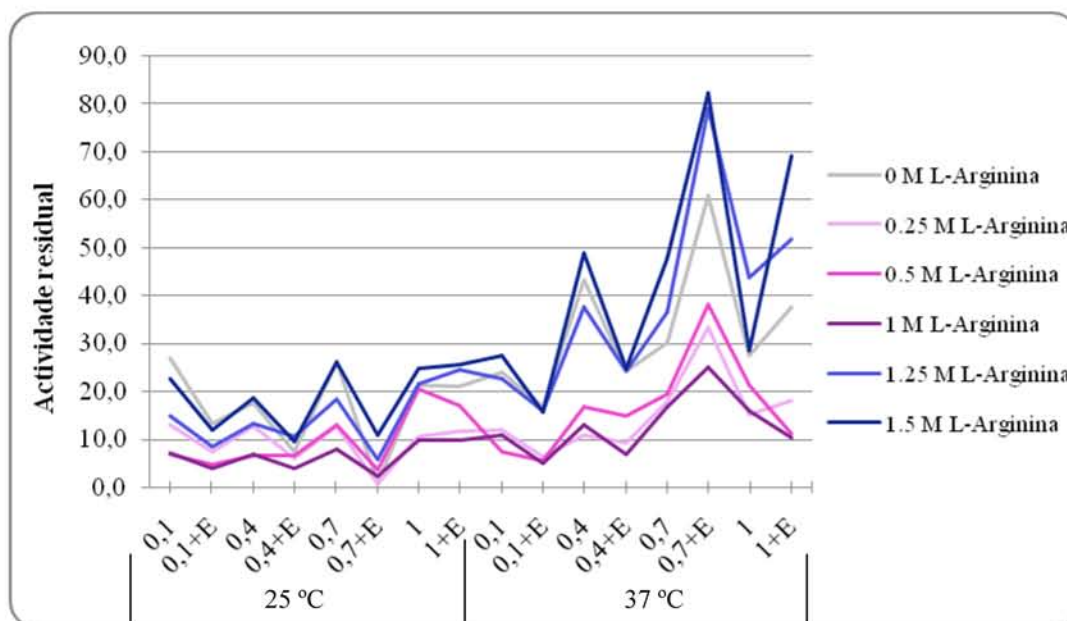


Figura 34 - Valores da razão entre a actividade específica de amidase recuperada na fracção insolúvel (IS'), após solubilização com diferentes concentrações de L-Arginina, e a actividade específica de enzima presente na fracção insolúvel (IS) das diferentes condições de crescimento, nomeadamente para temperaturas de 25°C e 37°C, diferentes concentrações de IPTG (mM) e presença de 3% de etanol (+E).

Pela análise da Figura 33 é notório um rendimento mais elevado na solubilização dos agregados com a utilização de soluções de L-Arginina com concentrações de 0,25; 0,5 e 1 M (traçados rosa), obtendo-se para esta última concentração os melhores resultados. Em oposição, uma quantidade excessiva de L-Arginina poderá ter originado uma forte interacção entre L-Arginina e as moléculas agregadas ^[121] o que impediu o reenrolamento e poderá explicar porque o rendimento da solubilização decresce para as concentrações de L-Arginina superiores de 1,25 e 1,5 M (traçados azuis). A Figura 34 representa os valores da razão entre a actividade enzimática de amidase não recuperada (fracção IS') e actividade enzimática de enzima agregado (fracção IS) por solubilização com diferentes concentrações de L-Arginina. No geral ocorreu um aumento de actividade enzimática nos agregados após a incubação com L-Arginina. No entanto, é notório que a utilização de concentrações elevadas de L-Arginina (traçados azuis na Figura 34) levou a um maior rendimento de actividade de enzima obtida numa forma agregada (IS') face às concentrações mais baixas de L-Arginina que favoreceram a obtenção do enzima na forma solúvel (S') (traçados rosa na Figura 33).

Como já referido, geralmente para os agregados obtidos a 37 °C ocorre maior recuperação do enzima na forma solúvel (Figura 33) por solubilização comparativamente aos agregados obtidos a 25 °C. Nomeadamente, na solubilização com 1 M de L-Arginina da fracção IS (Figura 33), da condição de crescimento a 37 °C com 0,7 mM IPTG em etanol, obteve-se aproximadamente 329 vezes maior actividade enzimática de amidase recuperada na fracção solúvel (S'). Adicionalmente, foi verificado que na ausência de L-Arginina (0 M) (traçado cinzento) ocorreu solubilização da amidase agregada apesar de, neste caso se ter verificado um rendimento muito baixo de recuperação do enzima. Tal facto poderá ser devido à simples agitação dos agregados à temperatura ambiente, o que fará prever a fragilidade das interacções responsáveis pela agregação da amidase, sendo que mais uma vez neste caso, ocorrerá maior rendimento de recuperação nos agregados formados a 37 °C.

O desenvolvimento de uma técnica de solubilização tem de ter em conta o tipo de agregados apresentados pela proteína de interesse ^[106]. Neste caso, tendo em conta a estrutura que os agregados do enzima apresentavam e, que ficou demonstrada anteriormente, pareceu conveniente a utilização da L-Arginina para uma eficiente solubilização dos agregados formados. Apesar do mecanismo de supressão da agregação pela L-Arginina ainda não ser bem compreendido, alguns autores, nomeadamente Tsumoto *et al*, sugerem que suprime as interacções intermoleculares entre as moléculas agregadas ^[122]. Neste caso, a amidase quando agregou nas células que cresceram em condições a 37 °C, esta apresentou uma estrutura secundária bastante semelhante à nativa (Figura 26, rosa) com interacções intermoleculares. Em oposição, nas células crescidas a 25 °C o enzima agregou substancialmente demonstrando maior conteúdo em interacções intermoleculares (Figura 19, verde). Possivelmente em ambos os casos, a supressão da formação dos agregados insolúveis poderá ser explicada pelo facto da L-Arginina actuar por diminuição das interacções intermoleculares responsáveis pela agregação. A obtenção de um rendimento de solubilização mais elevado para os agregados a 37 °C poderá ser consequência do menor conteúdo destas interacções presentes nestes face aos agregados obtidos a 25 °C.

Quanto à solubilização com o forte agente desnaturante Gdn-HCl dos agregados obtidos em todas as condições de crescimento, as fracções obtidas (S' e IS') apresentaram uma actividade específica muito baixa ou nula. De facto, este agente caotrópico ^[104] promove a desnaturação da estrutura nativa de proteínas e após eliminação deste, o reenrolamento

da proteína poderá ser facilitado. No entanto, no caso de enzimas multiméricas, como é o caso da amidase, o enrolamento e associação ficará dificultada devido à complexidade do enzima, o que poderá ser responsável pela inativação dos agregados verificada após a solubilização.

O perfil de proteínas das fracções (S' e IS') recuperadas após solubilização dos agregados com L-Arginina foi obtido por electroforese em SDS-PAGE com 8M ureia com gel de resolução de 10 %. Na Figura 35 encontra-se o resultado obtido por solubilização na presença de diferentes concentrações de L-Arginina dos agregados obtidos na condição de crescimento a 25°C com 0,7 mM IPTG e na presença de etanol.

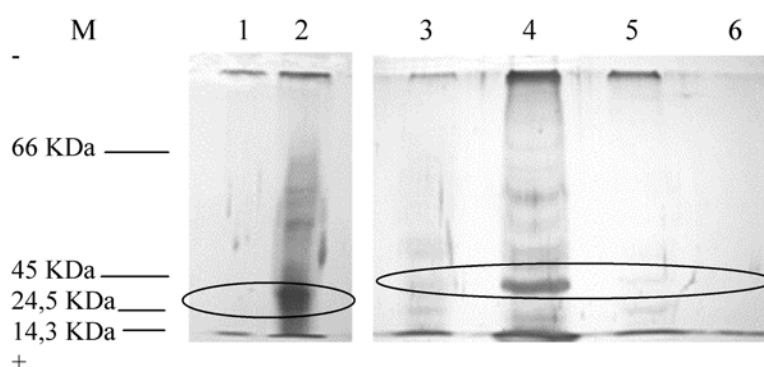


Figura 35- Análise SDS-PAGE 10% com 8M ureia do perfil de proteínas produzido na fracção solúvel (S') e insolúvel (IS'), obtidas após incubação, com diferentes concentrações de L-Arginina, da fracção insolúvel (IS) da condição de crescimento a 25°C com 0,7 mM IPTG e etanol. Poços: 1- IS', 0,25 M L-Arginina; 2- S', 0,25 M L-Arginina; 3- IS', 1 M L-Arginina; 4- S', 1 M L-Arginina; 5- IS', 1,5 M L-Arginina; 6- S', 1,5 M L-Arginina; M- Marcadores de Mr conhecida: BSA (66000 Da), Ovalbumina (45000 Da), α -Quimiotripsina (24500 Da) e Lisozima (14300 Da) de cima para baixo. A posição da subunidade da amidase foi assinalada na figura.

O cálculo de Mr da proteína assinalada nos vários poços da Figura 35, permitiu concluir que a banda correspondia à subunidade da amidase. A determinação de Mr correspondente foi efectuada com base na curva de calibração esquematizada na Figura 36. A mobilidade da banda assinalada na Figura 35 (poços 2 e 4), permitiu determinar por interpolação na curva de calibração o valor de 39,3 KDa, que corresponde, de acordo com resultados já publicados para este enzima, ao Mr da subunidade da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* ^[13].

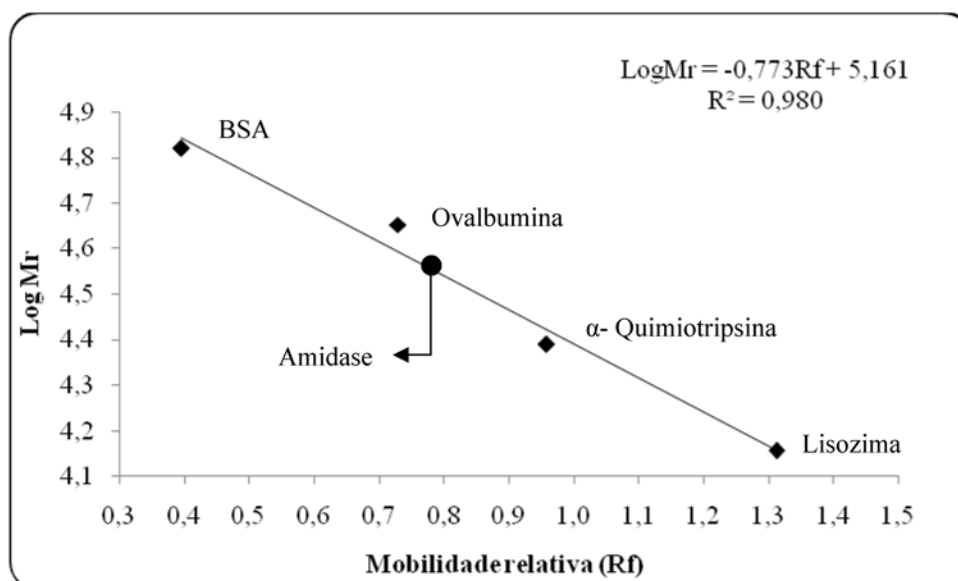


Figura 36- Determinação de Mr da subunidade da amidase por SDS-PAGE 10% a partir da Figura 35. As fracções contendo amidase e os padrões foram colocados no mesmo gel. Os marcadores de Mr conhecida esquematizados na Figura 35 em M são: BSA (66 KDa); Ovalbumina (45 KDa); α-Quimiotripsina (24,5 KDa) e Lisozima (14,3 KDa).

Na Figura 35 os resultados obtidos demonstram claramente que a amidase se encontra em maior concentração na fracção S' (poços 2 e 4) que na fracção IS' (poços 1 e 3, respectivamente) após a solubilização com concentrações de L-Arginina de 0,25 e 1 M e este facto explica o aumento de aproximadamente 45 vezes da actividade enzimática de enzima recuperada na fracção S' na presença deste fraco solubilizante. Adicionalmente, após uma solubilização na presença de uma concentração mais elevada, nomeadamente 1,5 M de L-Arginina, é visível a presença de algumas bandas no entanto estas são muito ténues em ambas as fracções IS' e S' (poços 5 e 6), o que estará associado a uma baixa concentração de proteína após solubilização com esta concentração de L-Arginina o que explica a considerável diminuição da actividade enzimática obtida após solubilização com esta concentração de L-Arginina.

Este mesmo tipo de comportamento electroforético foi verificado no geral para as fracções S' e IS' obtidas após solubilização com diferentes concentrações de L-Arginina dos agregados obtidos nas restantes condições de crescimento.

Conclui-se assim, que o enzima foi solubilizado com sucesso por um processo simples, utilizando a L-Arginina numa concentração ideal de 1 M, obtendo-se aumentos de actividade enzimática de amidase recuperada para todos os agregados obtidos e, em especial para as condições a 37 °C onde se verificaram recuperações da ordem de 329

vezes. A utilização de um agente desnaturante como a Gdn-HCl não revelou ser uma boa opção face à inativação da amidase que ocorreu após a solubilização do enzima.

Capítulo IV

Conclusões

4- Conclusões

Os resultados demonstraram que houve formação de amidase agregada na forma de corpos de inclusão em todas as condições de crescimento.

A fracção solúvel com maior actividade biológica foi obtida para as condições a 37°C a partir de 0,4 mM de IPTG inclusive. O que indica que estas condições parecem ser mais adequadas à produção de maior quantidade de amidase na forma solúvel.

Verificou-se ainda que a adição de etanol nas condições de crescimento de 25°C, permitiu uma elevada expressão de amidase que agregou na forma de corpos de inclusão biologicamente activos, apresentando para determinadas condições um aumento de 60 % de actividade específica em relação à fracção solúvel. Aparentemente baixas temperaturas e a presença de etanol favorecem o aumento de actividade enzimática da amidase agregada uma vez que foi verificado que para estas condições o crescimento celular é mais lento, possibilitando o correcto enrolamento do enzima na obtenção da sua estrutura nativa.

Uma análise espectroscópica por FTIR permitiu o estudo das alterações estruturais responsáveis pela agregação nas diferentes condições de crescimento e pela obtenção de agregados biologicamente activos.

Os resultados demonstraram nitidamente para todas as condições de crescimento que os corpos de inclusão formados apresentavam um aumento do conteúdo em folhas- β agregadas como consequência de um aumento de interacções intermoleculares face ao enzima nativo, como foi também demonstrado ter ocorrido para outras proteínas por outros autores, nomeadamente para a interleucina-2 [45].

Este estudo permitiu verificar que os corpos de inclusão obtidos nas condições de crescimento a 37°C apresentam uma estrutura semelhante à estrutura demonstrada pela solução de amidase purificada, em oposição aos agregados obtidos nas condições de 25°C. A menor actividade biológica demonstrada pelos corpos de inclusão produzidos a 37°C poderá resultar do facto das interacções intermoleculares estabelecidas pelas folhas- β agregadas dificultarem o acesso do substrato ao centro catalítico do enzima e/ou diminuírem a liberdade conformacional do enzima necessária à catálise enzimática [1].

A solubilização do enzima agregado foi efectuada com sucesso para todas as condições de crescimento com L-Arginina (fraco solubilizante). Verificou-se que, para todas as condições, após a utilização de L-Arginina em contacto com os agregados, a amidase

estava presente maioritariamente na fracção solúvel, atingindo maior rendimento de solubilização para as condições a 37°C e, em particular, para a condição de 0,7 mM IPTG na presença de etanol. Este facto poderá ser justificado tendo em conta que, a 37 °C, os agregados formados apresentaram menor quantidade de interacções intermoleculares que a 25 °C. Tendo em conta que a L-Arginina é referenciada como supressora da agregação por impedimento de interacções intermoleculares ^[103] e dada a menor quantidade de interacções a 37 °C, atingiu-se assim um maior rendimento de solubilização nestes agregados.

Quanto à solubilização dos corpos de inclusão na presença de Gdn-HCl o enzima demonstrou uma significativa diminuição da sua actividade enzimática, no entanto tal era esperado visto a Gdn-HCl ser um forte agente desnaturante o que possivelmente destruiu a estrutura do enzima agregado. Neste caso uma etapa de renaturação adicional tornaria o processo menos expedito e possivelmente diminuiria o rendimento de obtenção do enzima solúvel. A L-Arginina possivelmente torna o processo de solubilização facilitado devido a condições mais moderadas de solubilização e que resultam numa aparente diminuição das interacções intermoleculares responsáveis pela agregação ^[103].

No final deste trabalho surgem ainda algumas considerações que devem ser tomadas em atenção para o desenvolvimento de um processo de produção de amidase com elevado rendimento. Em primeiro lugar há que avaliar a necessidade de maior ou menor pureza da solução de enzima pretendida face às várias aplicações da amidase de *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo os resultados previamente demonstrados, na maioria das condições de crescimento a 37°C a amidase possui maior actividade na forma solúvel que agregada. Nestes casos, para melhorar o rendimento de produção de enzima solúvel poder-se-á proceder à solubilização dos corpos de inclusão, processo este que para os agregados formados a esta temperatura demonstra elevado rendimento, no entanto outras proteínas contaminantes estão presentes nos corpos de inclusão assim o grau de pureza do enzima não será tão elevado.

Quanto às condições de crescimento a 25°C, os corpos de inclusão formados são bastante homogéneos e biologicamente activos principalmente na presença de etanol, ou seja a maior parte da proteína agregada é a amidase. Tal facilita o processo de obtenção do enzima numa forma maioritariamente pura. Igualmente o processo de solubilização

destes agregados é relativamente simples e linear o que facilita a obtenção do enzima com elevada actividade biológica.

Capítulo V

Perspectivas Futuras

5- Perspectivas Futuras

Como perspectivas futuras deste trabalho experimental propõem-se a análise de outros parâmetros de crescimento na produção de amidase para além dos estudados nomeadamente, diferentes temperaturas (para além de 25°C e 37°C), diferentes gamas de pH, alteração da velocidade de agitação e diversas concentrações de oxigénio.

De modo a confirmar o efeito da L-Arginina e da Gnd-HCl na solubilização da amidase torna-se necessário um estudo das alterações conformacionais e tipo de interacções na agregação por espectroscopia de infravermelho (FTIR) nos corpos de inclusão solubilizados com estes agentes.

É importante ainda salientar, que actualmente não existe uma técnica que forneça informação acerca de todos aspectos da estrutura das proteínas. Assim, uma possível solução consiste em caracterizar determinada proteína recorrendo-se a diversas técnicas estruturais e a informação recolhida poderá ser correlacionada de modo a dar uma caracterização química e física mais completa da proteína em diversas condições, nomeadamente por NMR (ressonância magnética nuclear) ou CD (dicroísmo circular).

Para além da L-Arginina, na solubilização poderão ser utilizados outros aditivos, nomeadamente ciclodextrinas, prolina ou polietilenoglicol que, à semelhança da L-Arginina, são conhecidos por suprimir a agregação das proteínas por inibição das interacções intermoleculares. Além destes supressores de agregação também poderão ser utilizados aditivos potenciadores de enrolamento, nomeadamente sacarose e glicerol de modo a verificar o seu efeito no reenrolamento da proteína e obtenção de um melhor rendimento de recuperação da amidase dos corpos de inclusão.

Para além da *E.coli*, utilizada no presente trabalho também se podem analisar em outros microrganismos produtores de amidase, nomeadamente a *Pseudomonas aeruginosa*, a influência dos parâmetros de crescimento na produção do enzima evitando a formação de corpos de inclusão e o tipo de estrutura e interacções responsáveis pelos mesmos.

Resta acrescentar que os corpos de inclusão não têm apenas aspectos negativos, na realidade a obtenção de corpos de inclusão biologicamente activos poderá facilitar as etapas de extracção e obtenção de um enzima com um elevado grau de pureza. Como perspectiva futura de elevada relevância podem efectuar-se estudos no sentido de utilizar estes corpos de inclusão biologicamente activos sem proceder à purificação da amidase agregada nas inúmeras vertentes de aplicação deste versátil enzima.

Capítulo VI

Bibliografía

6- Bibliografia

- [1]– Lima, N. e Mota, M. “*Biotecnologia-Fundamentos e Aplicações*”, 2003, Lidel, Lisboa.
- [2]– Prescott, Harley e Klein “*Microbiology*”, 2005, 6^a Ed., McGraw-Hill, New York.
- [3]– Robertis, E. e Robertis, E.M. “*Biologia Celular e Molecular*”, 1996, 8^a Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- [4]– Bailey, J.E. e Ollis, D.F. “*Biochemical Engineering Fundamentals*”, 1986, 2^a Ed., McGraw-Hill, New York.
- [5]– <http://www.mclab.com/product.php?productid=19045&cat=315> (consultado em 5/09/2008)
- [6]–http://www3.niaid.nih.gov/NR/rdonlyres/49477C30-0513-47BE-88FC-17974CB1F952/0/e_coli.jpg (consultado em 14/07/2008)
- [7]– Bull, A.T., Goodfellow, M. e Slater, J.H. “*Biodiversity as a source of innovation in biotechnology*”, 1992, *Annual Reviews of Microbiology*, 46:219-252.
- [8]– Fonseca, A. e Madeira Lopes, A. “*A diversidade microbiana como fonte de inovação em biotecnologia*”, 1996, *Boletim de Biotecnologia*, 54:3-13.
- [9]– Nicholl, D.S.T. “*An introduction to genetic engineering*”, 2002, 2^a Ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- [10]– Fournand, D. e Arnaud, A. “*Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity*”, 2001, *Journal of Applied Microbiology*, 91:381-393.
- [11]– Kobayashi, M., Fujiwara, Y., Goda, M., Komeda, H. e Shimizu, S. “*Identification of active sites in amidase: Evolutionary relationship between amide bond and peptide bond-cleaving enzymes*”, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:11986-11991.
- [12]– Nawaz, M.S., Khan, A.A., Seng, J.E., Leakey, J.E., Siitonen, P.H. e Cerniglia, C.E. “*Purification and characterization of an amidase from an acrylamide-degrading *Rhodococcus* sp*”, 1994, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:3343-3348.
- [13]– Brown, P.R., Smyth, M.J., Clarke, P.H. e Rosemeyer, M.A. “*The subunit structure of the aliphatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa**”, 1973, *Eur. J. Biochem.*, 34:177-187.
- [14]– McFarlane, N.D., Brammar, W.J. e Clarke, P.H. “*Esterase activity of *Pseudomonas aeruginosa* amidase*”, 1965, *Biochem. J.*, 95:24c-25c.

- [15]– Pacheco, R., Serralheiro, M.L.M., Karmali, A. e Haris, P.I. “*Measuring enzymatic activity of a recombinant amidase using Fourier transform infrared spectroscopy*”, 2003, *Analytical Biochemistry*, 322:208-214.
- [16]– Maestracci, M., Thiery, A., Arnaud, A. e Galzy, P. “*A study of the mechanism of the reactions catalyzed by the amidase Brevibacterium sp. R312*”, 1986, *Agric. Biol Chem.*, 50:2237-2241.
- [17]– Brammar, W.J. e Clarke, P.H. “*Induction and repression of Pseudomonas aeruginosa amidase*”, 1964, *J. Gen. Microbiol.*, 37:307-319.
- [18]– Galat, A. e Elion, G. “*The interaction of amides with amines: A general method of acylation*”, 1943, *J. Amer. Chem. Soc.*, 65:1566.
- [19]– Den Dooren de Jong, L.E. “*Bijdrage tot de kennis van het mineralsatiesproces*”, 1926, Dissertation, Rotterdam.
- [20]– Kelly, M. e Clarke, P.H. “*An inducible amidase produced by a strain of Pseudomonas aeruginosa*”, 1962, *J. Gen. Microbiol.*, 27:305-316.
- [21]– Kelly, M. e Kornberg, H.L. “*Purification and properties of acyltransferases from Pseudomonas aeruginosa*”, 1964, *Biochem. J.*, 93:557-566.
- [22]– Brammar, W.J., Charles, I.G., Matfield, M., Liu, C.P., Drew, R.E. e Clarke, P.H. “*The nucleotide sequence of the amiE gene of Pseudomonas aeruginosa*”, 1987, *FEBS Letters*, 215:291-294.
- [23]– Farnaud, S., Tata, R., Sohi, M.K., Wan, T., Brown, P.R. e Sutton, B.J. “*Evidence that cysteine-166 is the active-site nucleophile of Pseudomonas aeruginosa amidase: crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the enzyme*”, 1999, *Biochem. J.*, 340:711-714.
- [24]– Novo, C., Tata, R., Clemente, A. e Brown, P.R. “*Pseudomonas aeruginosa aliphatic amidase is related to the nitrilase/cyanide hydratase enzyme family and Cys¹⁶⁶ is predicted to be the active site nucleophile of the catalytic mechanism*”, 1995, *FEBS Letters*, 367:275-279.
- [25]– Mayaux, J.F., Cerebelaud, E., Soubrier, F., Faucher, D. e Pétré, D. “*Purification, cloning, and primary structure of an enantiomer-selective amidase from Brevibacterium sp. Strain R312: Structural Evidence for Genetic Coupling with Nitrile Hydratase*”, 1990, *Journal of Bacteriology*, 172:6764-6773.
- [26]– Almatawah, Q.A. e Cowan, D.A. “*Thermostable nitrilase catalysed production of nicotinic acid from 3-cyanopyridine*”, 1999, *Enzyme and Microbial Technology*, 25:718-724.

- [27]– Andrade, J., Karmali, A., Carrondo, M.A. e Frazão, C. “Structure of amidase from *Pseudomonas aeruginosa* showing a trapped acyl transfer reaction intermediate state”, 2007, *The Journal of Biological Chemistry*, 282:19598-19605.
- [28]– Novo, C., Tata, R., Farnaud, S., Clemente, A. e Brown, P.R. “Support for a three dimensional structure predicting a Cys-Glu-Lys catalytic triad for *Pseudomonas aeruginosa* amidase comes from site-directed mutagenesis and mutations altering substrate specificity”, 2002, *Biochem. J.*, 365:731-738.
- [29]– Nawaz, M.S. e Chapatwala, K.D. “Simultaneous degradation of acetonitrile and biphenyl by *Pseudomonas aeruginosa*”, 1991, *Can. J. Microbiol.*, 37:411-418.
- [30]– Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A. e Gilula, N.B. “Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides”, 1996, *Nature*, 384:83-87.
- [31]– Klee, H., Montoya, A., Horodyski, F., Lichtenstein, C., Garfinkel, D., Fuller, S., Flores, C., Peschon, J., Nester, E. e Gordon, M. “Nucleotide sequence of the *tms* genes of the *pTiA6NC* octopine *Ti* plasmid: Two gene products involved in plant tumorigenesis”, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1728-1732.
- [32]– Fournand, D., Vaysse, L., Dubreucq, E., Arnaud, A. e Galzy, P. “Monohydroxamic acid biosynthesis”, 1998, *Journal of Molecular Catalysis*, 5:207-211.
- [33]– Kurzak, B., Kozłowski, H. e Farkas, E. “Hydroxamic and aminohydroxamic acids and their complexes with metal ions”, 1992, *Coord. Chem. Rev.*, 114:169-200.
- [34]– Fournand, D., Bigey, F., Ratomahenina, R., Arnaud, A. e Galzy, P. “Biocatalyst improvement for the production of short-chain hydroxamic acids”, 1997, *Enzyme and Microbial Technology*, 20:424-431.
- [35]– Pacheco, R., Serralheiro, M.L.M., Karmali, A. e Haris, P.I. “Application of Fourier transform infrared spectroscopy for monitoring hydrolysis and synthesis reactions catalyzed by a recombinant amidase”, 2005, *Analytical Biochemistry*, 346: 49-58.
- [36]– Betz, J.L., Brown, P.R., Smyth, M.J., Clarke, P.H., “Evolution in action”, 1974, *Nature*, 247:261-264.
- [37]– Fournand, D., Bigey, F. e Arnaud, A. “Acyl transfer activity of an amidase from *Rhodococcus sp.* strain R312: Formation of a wide range of hydroxamic acids”, 1998, *Applied Environmental Microbiology*, 64:2844-2852.
- [38]– Brown, J.E. e Clarke, P.H. “Mutations in a regulator gene allowing *P. aeruginosa* 8602 to grow on butyramide”, 1970, *J. Gen. Microbiol.*, 64:329-342.

- [39]– Middelberg, A.P.J. “Preparative protein refolding”, 2002, *Trends in Biotechnology*, 20:437-443.
- [40]– Karmali, A., Pacheco, R., Tata, R. e Brown, P.R. “Substitutions of Thr-103-Ile and Trp-138-Gly in amidase from *Pseudomonas aeruginosa* are responsible for altered kinetics properties and enzyme instability”, 2001, *Molecular Biotech.*, 17:200-212.
- [41]– Clark, Eliana de Bernardez “Refolding of recombinant proteins”, 1998, *Current Opinion in Biotechnology*, 9:157-163.
- [42]– Carrió, M.M. e Villaverde, A. “Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible” 2001, *FEBS Letters*, 489:29-33.
- [43]– Nygaard, F.B. e Harlow, K.W. “Heterologous expression of soluble, active proteins in *Escherichia coli*: The human estrogen receptor hormone-binding domain as paradigm”, 2001, *Protein Expression and Purification*, 21:500-509.
- [44]– Lilie, H., Schwarz, E. e Rudolph, R. “Advances in refolding of proteins produced in *E.coli*”, 1998, *Current Opinion in Biotechnology*, 9:497-501.
- [45]– Fink, A.L. “Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid”, 1998, *Fold Des.*, 3:R9-R23.
- [46]– Georgiou, G. e Valax, P. “Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*”, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7:190-197.
- [47]– Buchner, J. e Rudolph, R. “Renaturation, purification and characterization of recombinant F_{ab} -fragments produced in *Escherichia coli*”, 1991, *Biol Technology*, 9:157-162.
- [48]– Carrió, M.M. e Villaverde, A. “Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies”, 2002, *Journal of Biotechnology*, 96:3-12.
- [49]– Raina, K., Panda, A.K., Ali, M.M. e Talwar, G.P. “Purification, refolding and characterization of recombinant LHRH-T multimer”, 2004, *Protein Expression and Purification*, 37:8-17.
- [50]– Hockney, R.C. “Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*”, 1994, *Trends Biotechnol.*, 12:456-463.
- [51]– Thomas, S.I. e Balaji, P.V. “Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*”, 2005, *Protein Sci.*, 14:582-592.
- [52]– Umetsu, M., Tsumoto, K., Ashish, K., Nitta, S., Tanaka, Y., Adschiri, T. e Kumagai, I. “Structural characteristics and refolding of in vivo aggregated hyperthermophilic archaeon proteins”, 2004, *FEBS Letters*, 557:49-56.

- [53]– King, J., Haase-Pettingell, C., Robinson, A.S., Speed, M. e Mittraki, A. “*Thermolabile folding intermediates: Inclusion body precursors and chaperonin substrates*”, 1996, *FASEB J.*, 10:57-66.
- [54]– Wetzel, R., Perry, L.J. e Veilleux, C. “*Mutations in human interferon γ affecting inclusion body formation identified by a general immunochemical screen*”, 1991, *Biotechnology*, 9:731-737.
- [55]– Georgiou, G., Telford, J.N., Shuler, M.L. e Wilson, D.B. “*Localization of inclusion bodies in Escherichia coli overproducing β -lactamase or alkaline phosphatase*”, 1986, *Appl. Environ Microbiol.*, 52:1157-1161.
- [56]– Carrió, M.M., Cubarsi, R. e Villaverde, A. “*Fine architecture of bacterial inclusion bodies*”, 2000, *FEBS Letters*, 471:7-11.
- [57]– Ventura, S. e Villaverde, A. “*Protein quality in bacterial inclusion bodies*”, 2006, *TRENDS in Biotechnology*, 24:179-185.
- [58]– <http://www.roche.com/pages/facets/6/microorganisms.jpg> (consultado em 17/09/2008)
- [59]– Bowden, G.A., Paredes, A.M. e Georgiou, G. “*Structure and morphology of protein in inclusion bodies in E.coli*”, 1991, *Biotechnology*, 9:725-730.
- [60]– Carrió, M. e Villaverde, A. “*Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies*”, 2003, *Biotechnology Letters*, 25:1385-1395.
- [61]– Wetzel, R. “*Mutations and off-pathway aggregation of proteins*”, 1994, *Trends in Biotechnology*, 12:193-198.
- [62]– http://srs.dl.ac.uk/Annual_Reports/AnRep02_03/cd12-fig1.jpg (consultado em 25/09/2008)
- [63]– Stempfer, G., Holl-Neugebauer, B. e Rudolph, R. “*Improved refolding of an immobilized fusion protein*”, 1996, *Nat. Biotechnol.*, 14:329-334.
- [64]– Ghosh, S., Rasheedi, S., Rahim, S.S., Banerjee, S., Choudhary, R.K., Chakhaiyar, P., Ehtesham, N.Z., Mukhopadhyay, S. e Hasnain, S.E. “*Method for enhancing solubility of the expressed recombinant proteins in Escherichia coli*”, 2004, *Biotechniques*, 37:418, 420, 422-423.
- [65]– Vasina, J.A. e Baneyx, F. “*Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: A comparative study of the E.coli cspA and tac promoter systems*”, 1997, *Protein Expression and Purification*, 9:211-218.
- [66]– Schein, C.H. e Noteborn, M.H.M. “*Formation of soluble recombinant proteins in E.coli is favored by lower growth temperatures*”, 1988, *Bio/Technology*, 6:291-294.

- [67]– Thomas, J.G. e Baneyx, F. “*Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant Escherichia coli*”, 1997, *Protein Expression and Purification*, 11:289-296.
- [68]– Thomas, J.G., Ayling, A. e Baneyx, F. “*Molecular chaperones, folding catalysts and the recovery of active recombinant proteins from E.coli: To fold or to refold?*”, 1997, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 66:197-238.
- [69]– Cole, P.A. “*Chaperone-assisted protein expression*”, 1996, *Structure*, 4:239-242.
- [70]– Ellis, R.J. e Hartl, F.U. “*Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function*”, 1996, *FASEB*, 10:20-26.
- [71]– Guisbert, E., Herman, C., Lu, C.Z. e Gross, C.A. “*A chaperone network controls the heat shock response in E.coli*”, 2004, *Genes & Development*, 18:2812-2821.
- [72]– Agashe, V.R. e Hartl, F.U. “*Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding*” 2000, *Cell & Developmental Biology*, 11:15-25.
- [73]– Carrió, M.M. e Villaverde, A. “*Role of molecular chaperones in inclusion body formation*”, 2003, *FEBS Letters*, 537:215-221.
- [74]– Thomas, J.G. e Baneyx, F. “*Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant Escherichia coli cells overexpressing heat-shock proteins*”, 1996, *J. Biol. Chem.*, 271:11141-11147.
- [75]– Yang, Q.H., Wu, C.L., Lin, K. e Li, L. “*Low concentration of inducer favors production of active form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in Escherichia coli*”, 1997, *Protein Expr. Purif.*, 10:320-324.
- [76]– Singh, S.M. e Panda, A.K. “*Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins*”, 2005, *Protein Engineering*, 99:303-310.
- [77]– Rudolph, R. e Lilie, H. “*In vitro folding of inclusion bodies proteins*”, 1996, *FASEB Journal*, 10: 49-56.
- [78]– Ho, J.G.S., Middelberg, A.P.J., Ramage, P. e Kocher, H.P. “*The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient*”, 2003, *Protein Science*, 12:708-716.
- [79]– Miele, L., Cordella-Miele, E. e Mukherjee, A.B. “*High level bacterial expression of uteroglobin, a dimeric eukaryotic protein with two interchain disulfide bridges, in its natural quaternary structure*”, 1990, *J Biol. Chem.*, 265:6427-6435.
- [80]– Goldberg, ME., Rudolph R. e Jaenicke, R. “*A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme*”, 1991, *Biochemistry*, 30:2790-2797.

- [81]– Carrió, M., González-Montalbán, N., Vera, A., Villaverde, A. e Ventura, S. “*Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies*”, 2005, *J. Mol. Biol.*, 347:1025-1037.
- [82]– Sorensen, H.P. e Mortensen, K.K. “*Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in E.coli*”, 2005, *Journal of Biotechnology*, 115:113-128.
- [83]– Orosz, F., Kovács, G.G., Lehotzky, A., Oláh, J., Vincze, O. e Ovádi, J. “*TPPP/p25:from unfolded protein to misfolding disease:prediction and experiments*”, 2004, *Biology of the Cell*, 96:701-711.
- [84]– Jackson, M., Sowa, M.G. e Mantsch, H.H. “*Infrared spectroscopy: a new frontier in medicine*”, 1997, *Biophys. Chem.*, 68:109-125.
- [85]– Snabe, T. e Petersen, S.B. “*Application of infrared spectroscopy (attenuated total reflection) for monitoring enzymatic activity on substrate films*”, 2002, *J. Biotechnology*, 95:145-155.
- [86]– Zanier, A. “*Thermogravimetric Fourier Transform Infrared spectroscopy of hydrocarbon fuel residues*”, 1999, *J. Therm. Anal. Cal.*, 56:1389-1396.
- [87]– Wang, J., Sowa, M., Mantsch, H.H., Bittner, A. e Heise, H.M. “*Comparison of different infrared measurement techniques in the clinical analysis of biofluids*”, 1996, *Trends Anal. Biochem.*, 15:286-296.
- [88]– Haris, P.I. e Severcan, F. “*FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media*”, 1999, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7:207-221.
- [89]– Weert, M., Haris, P.I., Hennink, W.E. e Crommelin, D.J.A. “*Fourier Transform Infrared Spectrometric analysis of protein conformation: Effect of sampling method and stress factors*”, 2001, *Analytical Biochemistry*, 297:160-169.
- [90]– Pelton, J.T. e McLean, L.R. “*Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure*”, 2000, *Anal. Biochem.*, 277:167-176
- [91]– Schindler, R., Lendl, B. e Kellner, R. “*Determination of Amyloglucosidase activity using flow injection analysis with Fourier Transform Infrared Spectrometric detection*”, 1997, *Analyst.*, 122:531-534.
- [92]– Karmali, K., Karmali, A., Teixeira, A. e Curto, M.J.M. “*The use of Fourier transform infrared spectroscopy to assay for urease from Pseudomonas aeruginosa and Carnivalia ensiformis*”, 2004, *Analytical Biochemistry*, 331:115-121.
- [93]– Susi, H., Timasheff, S.N. e Stevens, L. “*Infrared spectra and protein conformations in aqueous solutions*”, 1967, *The Journal of Biological Chemistry*, 242: 5460-5466.

- [94]– Zandomenighi, G., Krebs, M.R.H., McCammon, M.G. e Fändrich, M. “*FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils*”, 2004, *Protein Science*, 13:3314-3321.
- [95]– Kauppinen, J.K., Moffatt, D.J., Mantsch, H.H. e Cameron, D.G. “*Resolution of complex band contours by means of Fourier Self-Deconvolution*”, 1981, *Society for Photo-Optical Instrumentation Engineers*, 260-262.
- [96]– Maddams, W. e Southon, M. “*The effect of band width and band shape on resolution enhancement by derivative spectroscopy*”, 1982, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 38:459-466.
- [97]– Lee, D.C., Haris, P.I., Chapman, D. e Mitchell, R.C. “*Determination of protein secondary structure using factor analysis of infrared spectra*”, 1990, *Biochemistry*, 29: 9185-9193.
- [98]– Jackson, M., Mantsch, H. “*Protein secondary structure from FT-IR spectroscopy: correlation with dihedral angles from three-dimensional Ramachandran plots¹*”, 1991, *Can. J. Chem.*, 69:1639-1642.
- [99]– Oberg, K., Chrnyk, B.A., Wetzel, R. e Fink, A.L. “*Native like secondary structure in interleukin-1 beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR*”, 1994, *Biochemistry*, 33:2628-2634.
- [100]– Adeishvili, K. “*Glycerol-induced aggregation of the oligomeric L-Asparaginase II from *E.coli* monitored with ATR-FTIR*”, 2001, *Int. J. Mol. Sci.*, 2:109-120.
- [101]– Tokatlidis, K., Dhurjati, P., Millet, J., Béguin, P. e Albert, J.P. “*High activity of inclusion bodies formed in *Escherichia coli* overproducing *Clostridium thermocellum* endoglucanase D*” 1991, *FEBS Letters*, 282:205-208.
- [102]– Lin, W.J. e Traugh, J.A. “*Renaturation of casein kinase II from recombinant subunits produced in *Escherichia coli*: purification and characterization of the reconstituted holoenzyme*”, 1993, *Expr. Purif.*, 4:256-264.
- [103]– Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T., Umetsu, M. e Philo, J.S. “*Role of arginine in protein refolding, solubilization and purification*”, 2004, *Biotechnol. Prog.*, 20:1301-1308.
- [104]– Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. e Arakawa, T. “*Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies*”, 2003, *Protein Expression and Purification*, 28:1-8.
- [105]– Arakawa, T. e Tsumoto, K. “*The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: Not facilitate refolding, but suppress aggregation*”, 2003, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304: 148-152.

- [106]– Umetsu, M., Tsumoto, K., Ejima, D., Nitta, S., Adschiri, T., Arakawa, T. e Kumagai, I. “*Nondenaturing solubilization of β 2 microglobulin from inclusion bodies by L-arginine*”, 2005, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328:189-197.
- [107]– Bradford, M.M. “*A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*”, 1976, *Analytical Biochemistry*, 101:200-203.
- [108]– Hames, B.D. e Rickwood, D. “*Gel Electrophoresis of Proteins - A Practical Approach*”, 1990, 2^a Ed, *The Practical Approach Series*, New York.
- [109]– Rothe, G.M. “*Electrophoresis of Enzymes*”, 1994, *Springer Lab Manual*, New York.
- [110]– Sasse, J. e Gallagher, S.R. “*Current Protocols in Molecular Biology-Laboratory Manuals*”, 2003, *John Wiley & Sons*, New York.
- [111]– Janson, J.C. e Rydén, L. “*Protein Purification*”, 1998, 2^a Ed, *Wiley & Sons*, New York.
- [112]– Martins, S., Farnaud, S., Pacheco, V., Pacheco, R., Karmali, A., Tata, R. e Brown, P.R. “*Differential behaviour of recombinant wild-type and altered amidases on immobilized metal-ion affinity chromatography*”, 2000, *IJBC*, 5:111-129.
- [113]– Naumann, D., Schultz, C. e Helm, U. “*Infrared Spectroscopy of Biomolecules*”, Wiley, New York, 1995.
- [114]– Wolkers, W.F., Haris, P.I., Pistorius, A.M.A., Chapman, D. e Hemminga, A. “*FT-IR Spectroscopy of the major coat protein of M13 e Pfl in the phage and reconstituted into phospholipid systems*”, 1995, *Biochemistry*, 34:7825-7833.
- [115]– Haris, P.I., Chapman, D. e Renga, G. “*A Fourier- transform infrared spectroscopic investigation of the hydrogen-deuterium exchange and secondary structure of the 28-kDa channel-forming integral membrane protein (CHIP28)*”, 1995, *Eur. J. Biochem.*, 233:659-664.
- [116]– Krimm, S. e Bandekar, J. “*Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins*”, 1986, *Adv. Protein Chem.*, 8:181-364.
- [117]– Srisailam, S., Kumar, T.K.S., Rajalingam, D., Kathir, K.M., Sheu, H.S., Jan, F.J., Chao, P.C. e Yu, C. “*Amyloid-like fibril formation in an all β -barrel protein*”, 2003, *The Journal of Biological Chemistry*, 278:17701-17709.
- [118]– Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., Duodu, K.G., “*Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatine from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*)*”, 2004, *Food Chemistry*, 86:325-332.

- [119]– Orfanidou, C.C., Hamodrakas, S. J., Chryssikos, G.D., Kamitsos, E.I., Wellman, S.E. e Case, S.T. “*Spectroscopic studies of Manduca sexta and Sesamia nonagrioides chorion protein structure*”, 1995, *Int. J. Biol. Macromol.*, 17:93-98.
- [120]– Bonnin, S., Besson, F., Gelhausen, M., Chierici, S. e Roux, B. “*A FTIR spectroscopy evidence of the interactions between wheat germ agglutinin and N-acetylglucosamine residues*”, 1999, *FEBS Letters*, 456:361-364.
- [121]– Liu, Y-D., Li, J-J., Wang, F-W., Chen, J., Li, P. e Su, Z-G. “*A newly proposed mechanism for arginine-assisted protein refolding—not inhibiting soluble oligomers although promoting a correct structure*”, 2007, *Protein Expression and Purification*, 51:235-242.
- [122]– Tsumoto, K., Shinoki, K., Kondo, H., Uchikawa, M., Juji, T. e Kumagai, I. “*Highly efficient recovery of functional single chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in Escherichia coli by controlled introduction of oxidizing reagent – application to a human single-chain Fv fragment*”, 1998, *J. Immunol. Methods*, 219:119-129.