

CLEONICE APARECIDA SALGADO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA POLIURETANASE COM
ATIVIDADE LIPOLÍTICA SECRETADA POR *Serratia liquefaciens* L135 ISOLADA
DE LEITE CRU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S164i
2019 Salgado, Cleonice Aparecida, 1990-
Identificação e caracterização de uma polinretanase com
atividade lipolítica secretada por *Serratia liquefaciens* L135
isolada de leite cru / Cleonice Aparecida Salgado. – Viçosa, MG,
2019.

vii, 54 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-54.

1. Psicotróficos. 2. Enzimas lipolíticas. 3. Leite cru -
Deterioração. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 615.788

CLEONICE APARECIDA SALGADO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA POLIURETANASE
COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA SECRETADA POR *Serratia liquefaciens*
L135 ISOLADA DE LEITE CRU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2019.



Solimar Gonçalves Machado



José Guilherme Prado Martin



Maria Cristina Baracat Pereira



Edvaldo Barros
(Coorientador)



Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

À minha mãe Lourdes, pelo apoio e ajuda durante todos os momentos da minha vida e pela sua fé que me ajuda nesta caminhada.

Ao meu filho Henrique Ailton, que é a minha fonte de inspiração que me impulsiona a sempre buscar o melhor.

Ao meu marido Ângelo, que sempre me apoiou e me incentivou a nunca desistir perante as dificuldades.

Aos meus irmãos, Ana, Jacira, Isabel, Lúcia, Silvano, Nelci, Maria e José Arlindo, pelo incentivo em estudar e pelas boas energias.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela orientação, ensinamentos, atenção, disponibilidade e competência. Agradeço pela oportunidade de trabalhar em sua equipe no laboratório de Microbiologia de Alimentos, uma vez que, foi imprescindível para o meu amadurecimento científico.

Ao François Baglinière, pela coorientação, ensinamentos e sugestões durante a execução da metodologia e confiança no meu trabalho.

Ao Edvaldo Barros, pela coorientação, dedicação, paciência, ensinamentos e identificação da lipase.

À professora Maria Cristina Baracat Pereira, pela disponibilidade e ensinamentos. Pela confiança no meu trabalho no HPLC no Laboratório de Proteômica, Bioquímica de Proteínas e Bioinformática e por me atender sempre com carinho e atenção.

À professora Solimar Gonçalves Machado, pela oportunidade de continuar com pesquisas envolvendo o isolado *Serratia liquefaciens* e pelas sugestões e disposição em ajudar.

Ao professor José Guilherme Prado Martin, pela disponibilidade e sugestões.

Ao professor Humberto Josué de Oliveira Ramos, pelo apoio na aquisição dos dados pela plataforma de LC-MS/MS.

Ao meu amigo Felipe, que sempre me deu dicas valiosas durante a execução dos experimentos e pelas análises de bioinformática.

Ao NuBioMol-UFV, pelo uso de equipamentos e análises de dados.

Ao técnico Marcinho e ao professor Patarroyo do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, pelo uso de equipamentos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Ramila, Cleriane, Gabriel, Leonardo, Leandro, Deisy, Érika, Felipe, Fernanda, Isabel e Poliane, por todo auxílio, aprendizado e acima de tudo, a amizade.

Aos amigos do Laboratório de Virologia, Bruna, Rafael, Flávia, Renan, Jonas, Thamylls e Patrícia.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia, Vanessa, Thércia, Nívea, Isabella, Dalila, Lorena.

Aos demais amigos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, Emiliane, Marliane, Thomás e Leandro (Micorrizas), Leandro (Genética), Janaína e Ana (Génética), Yasmin, Déborah, Juliana e Sophia (Anaeróbios), Maura (DTA) e Jean (Bioquímica).

Aos funcionários, Sandra, Gabriel, Letícia, José Carlos, Raquel, Iraci, Aline, Emília, Célio, Sr. Paulo, Cesáreo, Robson e Sr. Paulo da portaria, pelo convívio.

Pelo apoio e solicitude de todos, fica minha eterna gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Enzimas lipolíticas	2
2.2 Estrutura e mecanismo de ação das lipases.....	3
2.3 Lipases de origem bacteriana.....	5
2.4 Classificação das lipases bacterianas	6
2.5 Impacto das lipases na indústria laticinista.....	7
2.6 Purificação, caracterização e aplicações biotecnológicas de lipases	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Estirpe bacteriana e condições de cultivo	13
3.2 Avaliação da atividade lipolítica de <i>S. liquefaciens</i> L135 em ágar tributirina em diferentes temperaturas	13
3.3 Determinação da atividade lipolítica de <i>S. liquefaciens</i> ao longo do crescimento	13
3.4 Determinação da termoestabilidade da enzima lipolítica no leite	14
3.5 Purificação da enzima lipolítica.....	15
3.5.1 Etapas da purificação da enzima lipolítica	15
3.5.2 Eletroforese e zimografia da enzima lipolítica durante a purificação	16
3.6 Identificação da enzima lipolítica	16
3.6.1 Digestão enzimática e preparo das amostras para análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)	16
3.6.2 Análise por LC-MS/MS	16
3.6.3 Identificação das proteínas	17
3.6.4 Predição do peptídeo sinal da enzima lipolítica homóloga de <i>S. liquefaciens</i> ...	18
3.6.5 Modelagem molecular da enzima lipolítica homóloga de <i>S. liquefaciens</i>	18
3.7 <i>Docking</i> molecular da enzima lipolítica homóloga de <i>S. liquefaciens</i> identificada com ácidos graxos saturados e poliuretano.....	18
3.8 Caracterização bioquímica e físico-química da enzima lipolítica	19
3.8.1 Determinação do pH ótimo	19
3.8.2 Determinação da carga, da energia livre de dobramento e do potencial eletrostático da enzima lipolítica modelada em diferentes valores de pH <i>in silico</i>	19
3.8.3 Determinação da temperatura ótima.....	19

3.8.4	Efeito de íons metálicos sobre a atividade lipolítica da enzima	19
3.8.5	Efeito de reagentes e modificadores sobre a atividade lipolítica da enzima	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Atividade lipolítica de <i>S. liquefaciens</i> L135 em ágar tributirina em diferentes temperaturas	21
4.2	Atividade lipolítica de <i>S. liquefaciens</i> L135 ao longo do crescimento	22
4.3	Termoestabilidade da enzima lipolítica no leite	22
4.4	Purificação parcial da enzima lipolítica	25
4.5	Identificação da enzima lipolítica	28
4.5.1	Dados da identificação por LC-MS/MS da enzima lipolítica	28
4.5.2	Modelagem molecular da poliuretase homóloga de <i>S. liquefaciens</i> L135 identificada	30
4.5.3	Predição do peptídeo sinal da poliuretase homóloga de <i>S. liquefaciens</i> L13533	
4.6	<i>Docking</i> molecular da poliuretase homóloga de <i>S. liquefaciens</i> identificada com ácidos graxos saturados e poliuretano	34
4.7	Caracterização bioquímica e físico-química da poliuretase de <i>S. liquefaciens</i> L135	36
4.7.1	Determinação do pH ótimo	36
4.7.2	Determinação da temperatura ótima	40
4.7.3	Efeito de íons metálicos	41
4.7.4	Efeito de reagentes e modificadores	42
5	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

RESUMO

SALGADO, Cleonice Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Identificação e caracterização de uma poliuretanasase com atividade lipolítica secretada por *Serratia liquefaciens* L135 isolada de leite cru.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: François Baglinière e Edvaldo Barros.

Serratia liquefaciens é uma bactéria frequentemente encontrada no leite cru refrigerado e possui alto potencial de deterioração proteolítica. Neste trabalho, o potencial lipolítico de *S. liquefaciens* L135, isolada do leite cru refrigerado, foi avaliado e uma enzima lipolítica foi purificada e caracterizada. A atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L135 foi verificada em diferentes temperaturas, sendo 30 °C a temperatura ótima de atividade da enzima. A termoestabilidade da enzima foi avaliada em leite desnatado reconstituído a 10% e o valor *D* encontrado nas temperaturas de 65, 72, 85 e 95 °C foi de, aproximadamente, 97, 66, 50 e 28 min, respectivamente. O valor *Z* da enzima foi de 60 °C e a simulação do tempo / temperatura de pasteurização lenta e rápida não resultou na inativação completa da atividade lipolítica. Além disso, esta enzima foi purificada 3,1 vezes com 21,5% de recuperação e apresentou, por zimografia, massa molecular de, aproximadamente, 65 kDa. A identificação por LC-MS/MS indicou tratar-se de uma poliuretanasase, com massa molecular teórica de 64,864 kDa, confirmando a estimativa feita por zimografia, e pI teórico de 4,35. A poliuretanasase homóloga identificada possui 615 resíduos de aminoácidos, sequência altamente conservada de lipase (GX SXG) que envolve a serina catalítica e é secretada pelo sistema de secreção do tipo I, chamado transportador ABC. *In silico*, a poliuretanasase complexou-se com substratos de cadeia longa, média e curta, confirmando a atividade lipolítica. A poliuretanasase exibiu atividade máxima em pH 8,0 e a 30 °C, foi estimulada na presença dos íons Ca²⁺ e Ba²⁺ e inibida pelos íons Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ e Mn²⁺ na concentração final de 10 mM. Na presença de ditioneitol (DTT), β-mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS), a atividade da enzima foi aumentada ou pouco influenciada. No entanto, na presença de Tween-80, Triton X-100 e de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), a atividade lipolítica foi inibida. Além disso, dietil pirocarbonato (DEPC) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), na concentração de 10 mM, inibiram completamente a atividade da poliuretanasase, mostrando que os resíduos de serina e histidina são importantes para manter a conformação ativa. Este estudo é o primeiro que descreve que *S. liquefaciens* isolada do leite cru produz uma enzima lipolítica que apresenta estabilidade nas temperaturas de pasteurização, o que pode comprometer a qualidade do leite e seus derivados.

ABSTRACT

SALGADO, Cleonice Aparecida, M.Sc., Universidade Federal Viçosa, February, 2019. **Identification and characterization of a polyurethanase with lipolytic activity secreted by *Serratia liquefaciens* L135 isolated from raw milk.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: François Baglinière and Edvaldo Barros.

Serratia liquefaciens is a bacterium frequently found in refrigerated raw milk and has a high potential for proteolytic deterioration. In this work, the lipolytic potential of *S. liquefaciens* L135, isolated from refrigerated raw milk, was evaluated and a lipolytic enzyme was purified and characterized. The lipolytic activity of *S. liquefaciens* L135 was verified at different temperatures, with 30 °C being the optimum temperature of enzyme activity. Thermostability of the enzyme was evaluated in 10% reconstituted skimmed milk and the D value found at temperatures of 65, 72, 85 and 95 °C was approximately 97, 66, 50 and 28 min, respectively. The Z-value of the enzyme was 60 °C and the slow and rapid pasteurization time / temperature simulation did not result in complete inactivation of lipolytic activity. In addition, this enzyme was purified 3.1 times with 21.5% recovery and presented, by zymography, molecular mass of approximately 65 kDa. Identification by LC-MS/MS indicated that it was a polyurethanase with a theoretical molecular weight of 64.864 kDa, confirming the estimate made by zymography, and theoretical pI of 4.35. The identified homologous polyurethanase has 615 aminoacid residues, highly conserved lipase sequence (GX SXG) which involves the catalytic serine and is secreted by the type I secretion system, called the ABC transporter. *In silico*, the polyurethanase complexes with medium and short chain long chain substrates, confirming the lipolytic activity. The polyurethanase showed maximum activity at pH 8.0 and at 30 °C, was stimulated in the presence of Ca²⁺ and Ba²⁺ ions and inhibited by the Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, and Mn²⁺, ions at the final concentration of 10 mM. In the presence of dithiothreitol (DTT), β-mercaptoethanol and dodecyl sulfate sodium (SDS), the enzyme activity was increased or little influenced. However, in the presence of Tween-80, Triton X-100 and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), lipolytic activity was inhibited. In addition, diethyl pyrocarbonate (DEPC) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), at the concentration of 10 mM, completely inhibited the activity of the polyurethanase, showing that serine and histidine residues are important to maintain the active conformation. This is the first study to describe that *S. liquefaciens* isolated from raw milk produces a lipolytic enzyme that shows stability at pasteurization temperatures, which may compromise the quality of milk and its derivatives.

1 INTRODUÇÃO

O leite é um excelente meio de cultura para a multiplicação de micro-organismos e, para minimizar a deterioração desta matéria-prima, o leite cru é armazenado e transportado sob baixas temperaturas até chegar na indústria laticinista, onde é tratado termicamente. No entanto, a refrigeração não é suficiente para inibir a atividade de micro-organismos psicrotróficos, uma vez que estes conseguem crescer em temperaturas de refrigeração. Dentre estes micro-organismos, destacam-se as bactérias *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp. que possuem alto potencial deteriorador proteolítico e lipolítico.

Enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por bactérias psicrotróficas são reconhecidamente termorresistentes, ou seja, os tratamentos de pasteurização e esterilização do leite são insuficientes para inativá-las. A atividade residual dessas enzimas pode tornar o produto inaceitável pelo consumidor com conseqüente prejuízo para a indústria. As lipases hidrolisam os triacilgliceróis liberando ácidos graxos que conferem sabores descritos como forte, picante, ranço, butírico, amargo, imundo, sabão e adstringente. Logo, lipases termorresistentes podem apresentar efeitos indesejáveis na indústria laticinista.

Por outro lado, lipases que apresentam elevada estabilidade térmica, atividade em valores de pH alcalinos, em solventes e em surfactantes, possuem alto potencial para aplicação industrial e, muitas vezes, representam uma solução sustentável para muitas indústrias, diminuindo os impactos no meio ambiente por substituírem catalisadores químicos.

Serratia liquefaciens é frequentemente encontrada no leite cru refrigerado e possui alto potencial de deterioração proteolítica. Entretanto, não foram encontrados estudos que descrevam o potencial deteriorador lipolítico deste psicrotrófico. Portanto, o objetivo deste trabalho foi relatar a capacidade deste micro-organismo em secretar enzima lipolítica em diferentes temperaturas, avaliar a termoestabilidade dessa enzima além de purificá-la, identificá-la e caracterizá-la bioquímica e físico-quimicamente. Busca-se, além de compreender o potencial deteriorador lipolítico de *S. liquefaciens*, caracterizar a enzima lipolítica produzida para posterior consideração do seu potencial biotecnológico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas lipolíticas

Enzimas lipolíticas, também chamadas de carboxilesterases, são divididas em dois grupos, as lipases ou triacilglicerol acil hidrolases (EC 3.1.1.3) e as esterases ou carboxilases (EC 3.1.1.1). As lipases e as esterases pertencem ao grupo de serino hidrolases e catalisam a hidrólise de ligações éster-carboxílicas de triacilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (JAEGER et al., 1994; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; NAGARAJAN, 2012). As lipases hidrolisam, preferencialmente, substratos de cadeia longa, maiores do que 10 carbonos, enquanto as esterases são capazes de hidrolisar substratos de cadeia curta, menores do que 10 carbonos (ANTHONSEN et al., 1995; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; NAGARAJAN, 2012). A maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; MESSIAS et al., 2011).

Os substratos das lipases, os acilgliceróis de cadeia longa, são insolúveis em água, enquanto as lipases são hidrossolúveis e podem catalisar reações em dois tipos de sistemas, incluindo meios hidrofóbico e hidrofílico. Logo, as lipases apresentam a característica única de serem ativas na interface hidrofóbica-hidrofílica, enquanto as esterases atuam somente em condição aquosa, em substratos hidrossolúveis (KUNCOVA et al., 2003; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; SOLIMAN et al., 2007).

Baseadas na especificidade, as lipases podem ser divididas em três classes: lipases inespecíficas, lipases 1,3 específicas e lipases específicas de ácidos graxos (JAVED et al., 2018). Lipases não específicas catalisam a hidrólise do triacilglicerol em ácidos graxos e glicerol, com intermediários mono e diacilglicerol, podendo remover o ácido graxo de qualquer posição do substrato. Lipases 1,3 específicas liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triacilglicerol e não podem hidrolisar ligações ésteres em posições secundárias. Lipases específicas para ácidos graxos apresentam seletividade de ácidos graxos e catalisam a hidrólise de ésteres que possuem ácidos graxos de cadeia longa com ligações duplas na posição cis entre C-9 e C-10 (RIBEIRO et al., 2011; KAPOOR; GUPTA, 2012; JAVED et al., 2018).

As lipases e esterases também podem apresentar atividade de hidrólise de poliésteres, polímeros biodegradáveis que estão dentro da classe de poliuretanos (PUs) e,

consequentemente, são comumente chamadas de poliuretase (STERN; HOWARD, 2000; COSTA et al., 2015).

2.2 Estrutura e mecanismo de ação das lipases

As lipases possuem uma dobra α/β hidrolase, que é comum a muitas outras hidrolases, tais como proteases, esterases, dehalogenases, hidrolases de epóxido e as peroxidases. A dobra α/β hidrolase é caracterizada pela presença de uma fita β central pregueada (Figura 1, em azul) que contém sete fitas paralelas e a fita $\beta 2$ anti-paralela em relação às outras. As fitas $\beta 3$ para $\beta 8$ estão ligados por α hélices (Figura 1, em laranja), que embalam os dois lados da fita β central (BORRELLI e TRONO, 2015).

O sítio ativo das hidrolases α/β é constituído pela tríade catalítica: um resíduo nucleofílico (por exemplo, serina, cisteína, ácido aspártico), um resíduo ácido catalítico, isto é, ácido aspártico ou ácido glutâmico e uma histidina que atua como um resíduo catalítico de base geral. Nas lipases, o resíduo nucleofílico é sempre uma serina, que está localizada no chamado *nucleophilic elbow*, identificado pelo pentapeptídeo GX SXG, altamente conservado entre a cadeia $\beta 5$ e a α hélice C (Figura 1) (ANOBOM et al., 2014; BORRELLI e TRONO, 2015).

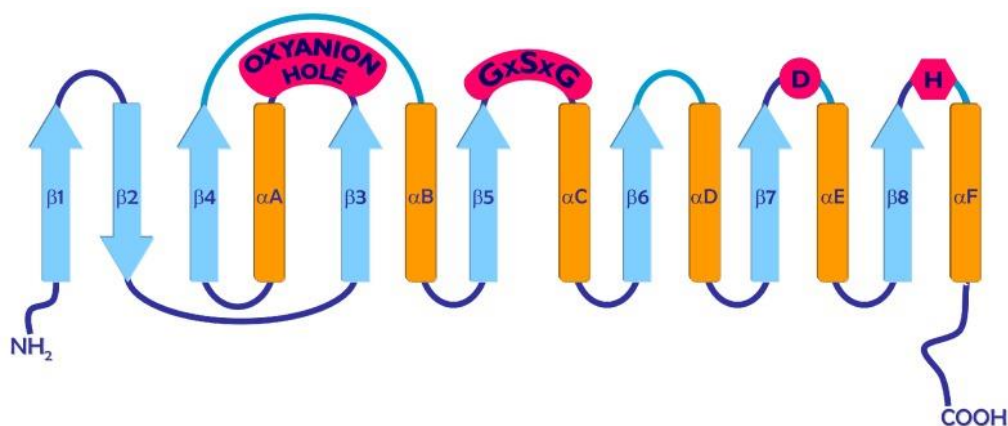


Figura 1. Estrutura da lipase. As fitas beta são indicadas por setas azuis e as alfa hélices, por cilindros alaranjados. As posições dos resíduos de histidina (H), aspartato (D), bem como o pentapeptídeo GX SXG e a cavidade oxiânion são indicados. Fonte: Borrelli e Trono (2015).

Borrelli e Trono (2015) descreveram o mecanismo de ação da lipase em que a hidrólise do substrato inicia-se com a ligação da serina catalítica a ligação éster. A serina se liga ao átomo de carbono do grupo carbonila da ligação éster (Figura 2a). Isto gera um intermediário tetraédrico que é caracterizado pela formação de uma carga negativa no átomo de oxigênio da carbonila e a ligação de átomos de carbono dispostos como um tetraedro

(Figura 2b). O intermediário é estabilizado por ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da carbonila carregado negativamente e os grupos $-NH$ da cadeia principal de dois resíduos de aminoácidos. Nas lipases, uma das duas ligações de hidrogênio é formada com o grupo hidroxila da cadeia lateral da tirosina. A nucleofilicidade do resíduo de serina é reforçada pela histidina catalítica, para que um próton, a partir do grupo hidroxila de serina, seja transferido. Esta transferência é facilitada pelo resíduo ácido catalítico, que orienta o anel de imidazole da histidina de forma a neutralizar a carga que é gerada sobre ele. Subsequentemente, o próton é doado para o átomo de oxigênio da ligação éster que é então, clivada, com a consequente libertação do produto de álcool, enquanto a cadeia acil é esterificada pela serina nucleofílica (Figura 2c). O próximo passo é a desacilação, em que uma molécula de água hidrolisa a ligação covalente, com a consequente libertação de acil como produto e a regeneração da enzima (Figura 2d).

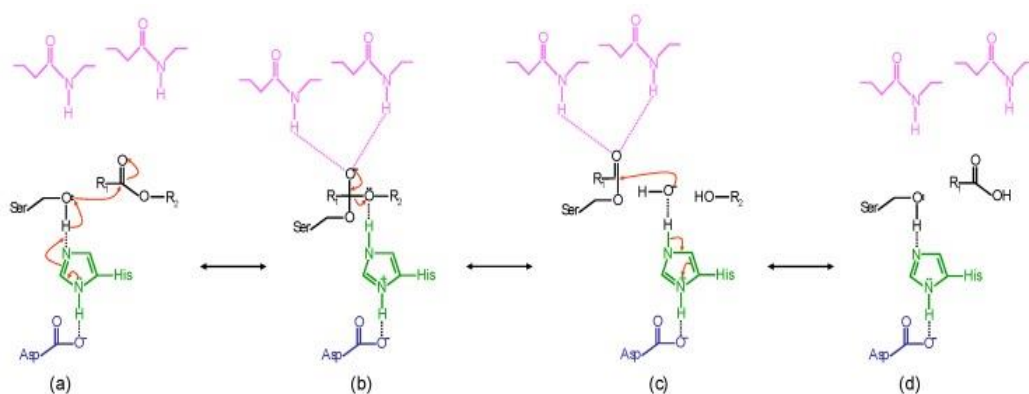


Figura 2. Mecanismo de reação de hidrólise de ligações éster catalisadas por lipases. Aspartato e histidina são mostrados em azul e verde, respectivamente; serina, substrato e água são mostrados em preto; os resíduos da cavidade oxianion são mostrados em lilás. (a) ataque nucleofílico da hidroxila da serina na carbonila da ligação éster suscetível; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil-enzima, álcool liberado e ataque nucleofílico por água; (d) enzima livre e produto acil liberado. Fonte: Borrelli e Trono (2015).

O maquinário catalítico é composto por um componente muito importante, conhecido como cavidade de oxianion. Durante a hidrólise, um intermediário tetraédrico carregado negativamente é gerado e o íon de oxigênio formado afeta a eficiência catalítica da enzima. Os resíduos da cavidade de oxianion desempenham função crucial na estabilização deste íon de oxigênio pela ligação de hidrogênio (BORRELLI e TRONO, 2015; GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015).

O sítio ativo da lipase é hidrofóbico e acessível aos ácidos graxos que acomodam a cadeia acil da ligação éster para ser hidrolisada. A maioria das lipases é caracterizada por inclusão de uma estrutura móvel, conhecido como tampa, que controla o acesso de moléculas de substrato ao centro catalítico. Estruturas cristalográficas mostraram que a tampa é extremamente flexível e é capaz de adotar duas conformações distintas: os estados fechado e aberto. No estado fechado, o sítio ativo não é acessível ao solvente e, como consequência, a superfície da enzima é principalmente hidrofílica, tornando a lipase inativa. No estado aberto, o sítio ativo se torna acessível, revelando uma grande superfície hidrofóbica que torna a enzima funcional (ANOBOM et al., 2014; BORRELLI e TRONO, 2015).

Neves Petersen, Fojan e Petersen (2001) mapearam a superfície eletrostática de várias lipases e esterases e mostraram que o sítio ativo dessas enzimas é carregado negativamente na faixa ideal de pH, que situa-se entre pH 6 e 10. Assim, após a clivagem do éster, o ácido carboxílico ionizado é imediatamente expelido do sítio ativo devido à repulsão eletrostática entre o grupo carboxila carregado negativamente e o potencial eletrostático negativo do sítio ativo, no chamado mecanismo catapulta eletrostática.

2.3 Lipases de origem bacteriana

A maioria das lipases bacterianas é secretada extracelularmente, sendo consideradas biocatalizadores versáteis que realizam uma variedade de reações como hidrólise, esterificação, transesterificação, interesterificação, acidólise e aminólise. Existem muitos micro-organismos conhecidos por produzirem diferentes lipases, mas de acordo com Javed et al. (2018), lipases de fontes bacterianas são consideradas mais adequadas para suportar o ambiente industrial.

Várias bactérias são relatadas na literatura com capacidade de produzir lipases, podendo-se citar *Acinetobacter bayli* (UTTATREE et al., 2010), *Bacillus cereus* (AKANBI et al., 2010), *Burkholderia cepacia* (LIU et al., 2011), *Enterococcus faecium* (RAMAKRISHNAN et al., 2012), *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (MASOMIAN et al., 2013), *Staphylococcus warneri* (YELE E DESAI, 2015), *Geobacillus thermoleovorans* (ABOL-FOTOUH et al., 2016), *Pelosinus fermentans* (BIUNDO et al., 2016), *Burkholderia ubonensis* (YANG et al., 2016) e *Janibacter* sp. (CASTILLA et al., 2017).

Entre as bactérias psicrotólicas que produzem enzimas lipolíticas, *Pseudomonas* é o gênero predominante entre os gram-negativos e *Bacillus* é o predominante entre os gram-positivos (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003;

VITHANAGE et al., 2016). No entanto, outros gêneros isolados a partir de leite cru também podem produzir enzimas lipolíticas, como *Serratia*, *Hafnia*, *Acinetobacter*, *Microbacterium* e *Enterobacter* (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007; DECIMO et al., 2014; VITHANAGE et al., 2016).

Machado et al. (2015) identificaram, por técnicas moleculares, *S. liquefaciens* e *Pseudomonas* spp. como as bactérias psicotróficas dominantes no leite cru analisado. O gênero *Serratia* é frequentemente encontrado no leite cru refrigerado (ARCURI et al., 2008; NÖRNBERG et al., 2010; DECIMO et al., 2014; MACHADO et al., 2015) e apresenta elevado potencial deteriorador proteolítico (MACHADO et al., 2016; BAGLINIÈRE et al., 2017a, 2017b). Entretanto, as lipases de *Serratia* spp. isoladas do leite cru são pouco estudadas.

2.4 Classificação das lipases bacterianas

Segundo a classificação de Arpigny e Jaeger (1999), as lipases de bactérias pertencem a família I das oito famílias de enzimas lipolíticas bacterianas enquanto as famílias II a VIII compreendem as esterases. A maioria das lipases secretadas pelo gênero *Pseudomonas* encontradas no leite cru, como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. fragi*, pertence à subfamília I.1 e I.3 (ARPIGNY; JAEGER, 1999; ZHANG et al., 2009).

A subfamília I.1 corresponde às lipases com massa molecular (MM) de, aproximadamente, 30 kDa, com cerca de 285 aminoácidos, incluindo dois resíduos de cisteína, para formar uma ligação dissulfeto. Todas as lipases desta subfamília apresentam o pentapeptídeo consenso GX SXG correspondente ao local da catálise. Para serem secretadas, as lipases deste grupo apresentam uma sequência específica no seu grupamento N-terminal. Além disso, para ser dobrada e secretada corretamente, esta subfamília necessita da presença de foldases específicas de lipase (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Enzimas desta subfamília apresentam dois resíduos aspárticos envolvidos no sítio de ligação do Ca^{2+} . A proximidade da ponte dissulfeto e do resíduo aspártico ao sítio catalítico poderia explicar a sua importância para a estabilidade do sítio ativo desta subfamília de lipases (KIM et al., 1998).

A subfamília I.3 corresponde às lipases com MM de 50 a 65 kDa. Este grupo de lipases também apresenta o pentapeptídeo consenso GX SXG e tem características diferentes da subfamília I.1, pois não possui o resíduo de cisteína, não apresenta uma sequência sinal N-terminal e não necessita de quaisquer foldases específicas de lipase para serem dobradas (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Sabe-se que lipases de *P. fluorescens* (KUMURA; MIKAWA;

SAITO, 1993) e *S. marcescens* (AKATSUKA et al., 1995) são desta subfamília. As lipases de subfamília I.3 não têm uma sequência típica de sinal N-terminal e utilizam o sistema de secreção do tipo I chamado transportador ABC (ROSENAU; JAEGER, 2000; SON et al., 2012).

Esse sistema de secreção do tipo I depende de exportadores mediados por proteínas ABC, que consiste em três proteínas do envelope celular: duas proteínas da membrana interna, um transportador do tipo ABC com um domínio de ligação ao ATP, uma proteína de fusão de membrana (MFP) e uma proteína de membrana externa (OMP). Esses exportadores de proteínas em bactérias gram-negativas são dedicados à secreção de uma ou várias proteínas intimamente relacionadas pertencentes às famílias de toxinas, proteases e lipases (BINET et al., 1997).

2.5 Impacto das lipases na indústria laticinista

A gordura do leite é secretada em uma única estrutura denominada glóbulo de gordura de leite (MFG) e consiste de um núcleo composto por, aproximadamente, 98% de triacilgliceróis (TAG) coberto com três camadas de fosfolípidios (PL) e proteínas (ARGOV-ARGAMAN et al., 2013). O diâmetro médio dos MFG natural é de cerca de 4 μm , mas pode variar de cerca de 0,2 a 15 μm (MICHALSKI et al., 2004). São envolvidos por uma membrana composta por lípidios polares (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina e esfingomielina), gangliosídeos, colesterol, proteínas e glicoproteínas (LOPEZ; CAUTY; GUYOMARC'H, 2015).

Destaca-se que as lipases são capazes de hidrolisar os MFG intactos enquanto que, as esterases não o são. Sem hidrólise dos MFG, as enzimas lipolíticas não têm acesso aos triacilgliceróis (DEETH, 2006). Outra enzima capaz de hidrolisar o MFG é a fosfolipase que atua rompendo a membrana dos MFG e expõe os triacilgliceróis à ação de lipases e esterases. Uma importante fosfolipase é a lecitinase (KOKA; WEIMER, 2001), que é mais estudada e foi detectada nos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Hafnia*, *Acinobacter* e *Microbacterium* isolados do leite cru por Vithanage et al. (2016).

Os triacilgliceróis presentes no interior dos MFG possuem mais de 400 ácidos graxos diferentes já identificados, sendo a gordura do leite a mais complexa encontrada na natureza (LOPEZ et al., 2011). Gresti et al. (1993) determinaram, por cromatografia gasosa capilar, as composições de ácidos graxos dos triacilgliceróis do leite e concluíram que, a maior parte é composta de um ácido graxo de cadeia curta (C4:0 ou C6:0) e dois ácidos graxos de cadeia

média e longa (C12:0 a C18:0). Os três principais triacilgliceróis encontrados foram butiroilpalmitoil-oleoilglicerol (4,2%), butiroildipalmitoilglicerol (3,2%) e butiroil-miristoilpalmitoilglicerol (3,1%).

Ácidos graxos livres e de cadeia curta, como o ácido butírico (C4:0), ácido capróico (C6:0) e ácido caprílico (C8:0) conferem sabor forte e picante. Ácidos graxos de cadeia média, como o ácido cáprico (C10:0) e ácido láurico (C12:0) têm maior participação na formação de sabor de sabão, enquanto que os ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0) contribuem pouco para o sabor (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003). Outros sabores desagradáveis, como "ranço, butírico, amargo, imundo, sabão e adstringente", em leite e produtos lácteos também têm sido atribuídas à lipólise (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; DEETH, 2011). Além disso, como descrito por Chen, Daniel e Coolbear (2003), um sabor oxidado pode ser gerado pela oxidação de ácidos graxos insaturados livres em aldeídos e cetonas.

A presença de lipase bacteriana pode afetar a qualidade do leite fluido, leite em pó integral, queijo e manteiga (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003). Assim, todos os produtos lácteos contendo gordura têm potencial para apresentarem defeitos de origem lipolítica (DEETH, 2011). No leite pasteurizado, a lipólise é menos provável em razão da temperatura baixa de armazenamento e da vida de prateleira relativamente curta. Geralmente, a lipólise ocorre apenas ao final da vida útil do leite pasteurizado e é caracterizada por sabores como amargo, azedo e, ou pútrido (DEETH, 2011). Entretanto, no leite UHT, que é armazenado a temperaturas ambientes e a vida útil se estende por meses, a lipólise por lipases estáveis ao calor ocorre mais comumente e os sabores indesejáveis são mais percebidos (ADAMS; BRAWLEY, 1981; DEETH, 2011). Devido à presença de lipases termoestáveis no leite cru, esses sabores indesejáveis, como rancidez, podem ocorrer no leite UHT (ADAMS; BRAWLEY, 1981). Decimo et al. (2018) verificaram que um total de 47 compostos orgânicos voláteis pertencentes a sete grupos químicos foram identificados no leite inoculado com bactérias psicrotóxicas. Dentre estes compostos, destacam-se os ácidos graxos, produtos da lipólise, butanóico e hexanóico, indicados como potenciais deterioradores do leite.

A presença de lipases em queijos promove a hidrólise da gordura com liberação de ácidos graxos e a formação, principalmente, de ácido butírico, que confere sabor de sabão ao produto. O defeito aparece ao longo da maturação e é comum em queijos de maturação prolongada, como Emmental, Gruyère e Parmesão. Pode ser percebido também no queijo

Prato de maturação mais avançada, fazendo com que ele apresente sabor ardido ou saponificado (FURTADO, 2005). Na maioria dos queijos, o pH baixo previne a atividade da lipase; no entanto, em alguns queijos como Camembert e Brie, o pH atinge, ao final do processo, um valor próximo da neutralidade, favorável para a lipólise (DUMONT et al., 1977).

No leite em pó, a atividade residual das lipases bacterianas é uma preocupação. Como essas enzimas geralmente agem lentamente no produto durante o armazenamento, a lipólise pode ser detectada meses após fabricação e, quando usado na produção de outros alimentos, como produtos lácteos reconstituídos e confeitaria, isso pode ter sérios prejuízos econômicos (DEETH, 2011). Chen, Daniel e Coolbear (2003) mostraram que o teor de ácidos graxos no leite em pó fabricado com leite cru armazenado por quatro dias foi significativamente maior do que no leite em pó fabricado com leite fresco. Este resultado mostra o impacto da produção de lipases no leite cru por psicrotróficos na qualidade do produto após processamento.

Em razão do aumento de interação enzima-substrato, produtos como manteiga e creme de leite apresentam, após a fabricação, sabores de sabão, amargo e azedo, caracterizado por um alto teor de ácidos graxos. Os ácidos graxos presentes são geralmente de cadeia mais longa, porque os ácidos de cadeia mais curta apresentam solubilidade em água e são perdidos no soro de leite (DEETH, 2011).

Entretanto, nem todos os efeitos da lipólise são indesejáveis. Muitas lipases são amplamente utilizadas durante o processamento de alimentos, resultando em modificações desejáveis na qualidade sensorial, como textura, sabor e aroma, além de promover o aumento do valor nutricional (TAVANO, 2013). No processamento de queijos, a lipólise é importante para o desenvolvimento de sabor característico. Por exemplo, o queijo Roquefort apresenta sabor picante resultante da ação de lipases sobre os triacilgliceróis de cadeia curta. Outro exemplo é o queijo Parmesão, que é feito a partir do leite cru e apresenta sabor adocicado, ligeiramente picante também em razão da atividade lipolítica (DEETH, 2011).

2.6 Purificação, caracterização e aplicações biotecnológicas de lipases

A purificação tem como objetivo reduzir ou eliminar as impurezas presentes na amostra, isolando a enzima com suas propriedades catalíticas. Os passos para purificação de lipases de origem microbiana envolvem a remoção das células da cultura após o processo de crescimento celular para obter lipases extracelulares. O extrato livre de células é então concentrado por extração com solventes orgânicos, por ultrafiltração ou por precipitação

com sulfato de amônio (SAXENA et al., 2003; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; KANWAR et al., 2006). Saxena et al. (2003) mostraram que, após a concentração de lipases, a combinação de métodos cromatográficos deve ser aplicada para obter a enzima pura; dentre estes métodos, destacam-se: troca iônica, exclusão molecular, afinidade e interação hidrofóbica.

As lipases são um importante grupo de enzimas biotecnologicamente relevantes e encontram muitas e diversas aplicações nas indústrias alimentícia, láctea, química e farmacêutica (JAVED et al., 2018). Por apresentarem propriedades catalíticas distintas, é imprescindível fazer a caracterização e identificação desta enzima após a purificação para compreender, ao máximo, o desempenho catalítico, o que, por sua vez, é necessário para sua melhor exploração industrial. As características normalmente estudadas são temperatura e pH ótimos, estabilidade à temperatura, massa molecular, sensibilidade a íons, a inibidores e a surfactantes.

As lipases bacterianas são, principalmente, de natureza alcalina e lipases alcalinas são catalisadores promissores para muitos processos industriais (SANGEETHA; ARULPANDI; GEETHA, 2011). Apesar de muitos relatos sobre lipases e seus micro-organismos produtores, as lipases ácidas são raramente descritas. Exceção são a lipase ácida produzida por *Pseudomonas gessardii* (RAMANI; CHOCKALINGAM; SEKARAN, 2010) e as lipases ácidas produzidas por *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* (SARANYA et al. (2014).

A estabilidade térmica de lipases é uma característica desejável para indústrias que requerem temperaturas superiores a 60 °C nos processos. Isso ocorre devido às altas temperaturas empregadas nas reações lipolíticas, principalmente devido ao alto ponto de fusão dos substratos lipídicos que participam do processo (SANGEETHA; ARULPANDI; GEETHA, 2011). No entanto, lipases termoestáveis de micro-organismos psicrotróficos tornam-se um problema para a indústria laticinista, uma vez que resistem aos tratamentos térmicos utilizados e permanecem no produto acabado.

A atividade catalítica das lipases ocorre através da ativação interfacial, uma propriedade observada quando o substrato lipídico começa a formar uma emulsão, apresentando assim uma interface para a enzima atuar (SANGEETHA; ARULPANDI; GEETHA, 2011). Os surfactantes, compostos que reduzem a tensão superficial de um líquido aumentando a solubilidade de compostos orgânicos, aumentam a interface lipídio-água e, conseqüentemente, aumentam a taxa de lipólise. No entanto, isso não vale para todos os

surfactantes. Além disso, o efeito dos surfactantes é dependente da concentração (SANGEETHA; ARULPANDI; GEETHA, 2011; RIOS et al., 2018).

Muitas lipases são metal-dependentes, ou seja, requerem a presença de íons metálicos para manutenção de suas estruturas ativas (RIOS et al., 2018). A enzima dobrada abriga uma região de resíduos de aminoácidos carregados negativamente que tentam se afastar para reduzir as repulsões eletrostáticas e isso é prejudicial para a estabilidade da enzima. O íon metálico, no entanto, liga-se à enzima e forma uma ponte que reticula a cadeia polipeptídica e o complexo enzima-íon metálico torna-se estável e rígido (RIOS et al., 2018). O produto da hidrólise, os ácidos graxos ionizados, complexa-se com os íons metálicos alterando sua solubilidade e comportamento nas interfaces (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009).

As aplicações biotecnológicas de lipases são diversas e, como exemplo, cita-se a atuação como biocatalisador e uso em indústria de detergentes. A lipase de *Burkholderia ubonensis* SL-4 foi empregada para catalisar o óleo de soja para a produção de biodiesel, alcançando-se rendimento de 92,24% em um sistema livre de solvente a 45 °C (YANG et al., 2016). A lipase extracelular de *Bacillus methylotrophicus* PS3, por apresentar atividade relativa de 100% com surfactante Triton X-100, foi indicada como potencial para ser eficientemente utilizada na indústria de detergentes (SHARMA et al., 2017).

Fontes microbianas são descritas como potenciais biodegradadores de poliuretanos (PU), que são uma classe de polímeros plásticos, amplamente utilizados como matérias-primas em várias indústrias devido à sua alta durabilidade. Os PUs são sintetizados a partir de polióis e poliisocianatos e são classificados em dois tipos, PU poliéster e PU poliéter, sendo o PU de poliéster considerado suscetível à degradação microbiana. À medida que os resíduos de poliuretano à base de poliéster se acumulam, métodos estão sendo buscados para degradar e reciclar este polímero recalcitrante e artificial. Assim, microrganismos capazes de degradarem os PUs apresentam características de considerável interesse biotecnológico pois é alternativa para a reciclagem deste composto xenobiótico (HOWARD; NORTON; BURKS, 2012; SHAH et al., 2013).

Allen, Hilliard e Howard (1999) identificaram *Comamonas acidovorans* por sua capacidade de secretar uma esterase com atividade de poliuretanase capaz de degradar o poliuretano Impranil DLNTM, após 18 h de incubação com zonas de hidrólise de 2 cm de diâmetro em torno das colônias. Rowe e Howard (2002) isolaram *B. subtilis* do solo e mostraram que este micro-organismo tem capacidade em secretar uma poliuretanase que

degrada o poliéster Impranil DLNTM, usando-o como única fonte de carbono e energia, além de apresentar atividade de lipase e esterase.

Stern e Howard (2000) clonaram o gene *pueA* de *Pseudomonas chlororaphis* que codifica uma poliuretanase extracelular A (PueA) em *Escherichia coli*. A enzima secretada a partir de *E. coli* mostrou atividade de esterase quando ensaiada com *p*-nitrofenil acetato e também degradou o Impranil DLNTM. Howard, Norton e Burks (2012) verificaram que *Acinetobacter gernerii* P7 também possui capacidade de degradar o Impranil DLNTM adicionado em ágar LB observando, após incubação a 30 °C por 48 h, zonas claras devido à hidrólise do poliuretano.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Industrial, Laboratório de Proteômica, Bioquímica de Proteínas e Bioinformática, Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO / UFV) e no Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) localizado na Vila Gianetti, Campus Viçosa da UFV.

3.1 Estirpe bacteriana e condições de cultivo

S. liquefaciens L135 foi isolada do leite cru mantido em condições simuladas de refrigeração de armazenamento e transporte permitidos pelas leis brasileiras (MACHADO et al., 2015). A cultura foi conservada a -20 °C em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, HIMEDIA, Índia), adicionado de solução de glicerol 20% (v/v). A ativação foi feita adicionando-se 50 µL da cultura em 5 mL de caldo BHI, seguida pela incubação a 30 °C, durante 18 h.

3.2 Avaliação da atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L135 em ágar tributirina em diferentes temperaturas

Alíquota de 0,5 mL da cultura ativada de *S. liquefaciens* L135 foi transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de caldo BHI e incubado sob agitação de 200 RPM, durante 24 h a 30 °C. Posteriormente, uma alíquota foi inoculada com alça de picada em ágar tributirina (extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5%, ágar 1,2% e tributirina 1,0%, pH 7,5) seguindo de incubação nas temperaturas de 4, 7, 17, 25, 30 e 37 °C durante 25 dias, sob condições aeróbias. O diâmetro dos halos de hidrólise foi medido, em milímetros (mm), ao longo do período de incubação.

3.3 Determinação da atividade lipolítica de *S. liquefaciens* ao longo do crescimento

Alíquota de 0,5 mL da cultura ativada de *S. liquefaciens* L135 foi transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de caldo BHI e incubada sob agitação de 200 RPM, durante 24 h a 30 °C. Durante o período de incubação, em intervalos pré-definidos, alíquotas de 1 mL foram retiradas para determinação do crescimento celular e da atividade lipolítica. O crescimento celular foi avaliado por densidade óptica (600 nm) em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Finlândia). A atividade lipolítica foi determinada de acordo com Christensen et al. (2003), com modificações. A alíquota da cultura foi

centrifugada a 5.000 x g durante 15 min e, em seguida, 15 µL do sobrenadante foram transferidos para microplaca de 96 poços de fundo plano, posteriormente, 150 µL da solução do substrato foram adicionado em cada poço e seguiu-se a incubação durante 1 h a 30 °C. Após o período de incubação, foi feita a leitura da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro. A solução do substrato era constituída pela mistura de solução A: um volume de 0,3% (m/v) de *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) em 2-propanol com a solução B: nove volumes de 0,2% (m/v) de desoxicolato de sódio e 0,1% (m/v) de goma arábica em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 8,0). A mistura da solução A e B foi feita imediatamente antes de ser utilizada na análise.

Foi feita a curva padrão do produto da hidrólise do *p*-NPP, o *p*-nitrofenol (*p*-NP), na concentração de 300, 800, 1.500, 2.300 e 3.000 µM. A curva padrão foi feita conforme descrito anteriormente, com as seguintes modificações: meio BHI não inoculado substituindo o sobrenadante da cultura e *p*-NP substituindo o substrato *p*-NPP. O gráfico foi plotado com os dados da concentração de *p*-NP no eixo X e os de absorbância no eixo Y e calculada a equação da reta por regressão linear. Uma unidade de enzima lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera um µM de *p*-NP por minuto, nas condições descritas anteriormente.

3.4 Determinação da termoestabilidade da enzima lipolítica no leite

A cultura de *S. liquefaciens* L135 foi inoculada em leite em pó desnatado reconstituído a 10% e incubada sob agitação de 200 RPM a 30 °C, durante 24 h. Após o período de incubação, 15 µL da cultura foram colocados em tubo capilar de 1 mm de diâmetro (Precision, China) e incubados em banho-maria (Fisher Scientific, Estados Unidos) nas temperaturas de 65, 72 e 85 °C durante 60 min e na temperatura de 95 °C durante 30 min. Em intervalos de tempo pré-definidos, os capilares foram retirados, imediatamente submersos em banho de gelo e a amostra submetida ao ensaio da atividade lipolítica, conforme descrito no item 3.3. Em cada temperatura, amostras não tratadas termicamente foram usadas como controle e consideradas como 100% da atividade enzimática. Os valores de constante da taxa de inativação (*k*), meia vida da enzima ($t_{1/2}$), tempo de redução decimal (*D*) e *Z* foram calculados para representar a inativação térmica da enzima lipolítica. O valor *k* foi calculado a partir do coeficiente angular (*a*) da regressão linear e correspondeu ao logaritmo natural (ln) dos valores da atividade residual em U/mL em função do tempo de incubação (min) na temperatura de tratamento térmico, sendo o valor $k = - (a)$. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi

calculado a partir dos valores de k , sendo $t_{1/2} = \ln 2/k$. O valor D é o tempo necessário para reduzir 90% do valor original da atividade enzimática e foi calculado a partir do coeficiente angular (a) da regressão linear. Corresponde ao logaritmo (\log) dos valores da atividade residual em U/mL em função do tempo de incubação (min) na temperatura de tratamento térmico, sendo o valor $D = -1/a$. O valor Z representa a temperatura, em graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$), necessária para que a curva de inativação térmica atravessasse um ciclo logarítmico. Este valor foi calculado a partir do coeficiente angular (a) da regressão linear corresponde ao logaritmo (\log) dos valores de D em função da temperatura de tratamento térmico, sendo o valor $Z = -1/a$. Os binômios tempo/temperatura utilizados na indústria do leite foram simulados, para pasteurização lenta (65°C por 30 min) e pasteurização rápida (72°C por 15).

3.5 Purificação da enzima lipolítica

3.5.1 Etapas da purificação da enzima lipolítica

A cultura ativada de *S. liquefaciens* L135 foi reativada em 50 mL de caldo BHI, sob agitação de 200 RPM, durante 24 h a 30°C . A amostra foi centrifugada a $5.000 \times g$ por 15 min e o sobrenadante foi utilizado para a purificação da enzima lipolítica. O sobrenadante foi concentrado em dispositivo de ultrafiltração Amicon Cell Modelo 8050, 50 mL (Cole-Parmer, Estados Unidos) com membrana de massa molecular de corte de 30 kDa. A amostra ultrafiltrada foi separada por cromatografia de exclusão molecular em HPLC (Waters Corporation, Estados Unidos), utilizando a coluna Protein-Pak 125 Å ($7,8 \times 300$ mm, faixa de separação 2-80 kDa, Waters Corporation, Estados Unidos) com detector UV operando a 280 nm (Waters Corporation, Estados Unidos). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) em fluxo de 0,25 mL/min com coleta de 1 mL por microtubo em coletor automático (Waters Corporation, Inglaterra) durante 60 min. As frações foram monitoradas conforme item 3.3 e, as que apresentaram atividade lipolítica foram concentradas em seis volumes de acetona a -20°C por 18 h. Depois da concentração, as amostras foram centrifugadas $5.000 \times g$ por 15 min e o *pellet* foi ressuscitado em volume mínimo de tampão Tris-HCl pH 7,5. A concentração de proteína nas etapas de purificação da enzima lipolítica foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

3.5.2 Eletroforese e zimografia da enzima lipolítica durante a purificação

A amostra purificada conforme descrito no item 3.5.1 foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (LAEMMLI, 1970). Para estimar a massa molecular da enzima lipolítica, foi realizado o zimograma juntamente com o SDS-PAGE. Após a corrida, as proteínas foram renaturadas, lavando-se o gel duas vezes em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; isopropanol a 25% (v/v) durante 15 min à temperatura ambiente e uma vez em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 durante 15 min. Após a renaturação, o gel foi coberto com o substrato fluorescente metilumbeliferil butirato 0,01 M em dimetilformamida e exposto a luz UV a 360 nm, onde as bandas fluorescentes azuis indicaram atividade lipolítica (CHRISTENSEN et al., 2003). A banda referente à ação da enzima lipolítica foi excisada do SDS-PAGE e armazenada em ácido acético 10% a - 20 °C para ser identificada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LS-MS/MS).

3.6 Identificação da enzima lipolítica

3.6.1 Digestão enzimática e preparo das amostras para análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

As bandas oriundas do SDS-PAGE 1D excisadas como descrito no item 3.5.2 foram picotadas e submetidas à digestão enzimática, a qual foi efetuada com tripsina de pâncreas suíno, indicada para utilização em proteômica, tratada com tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), referência T-6567 (Sigma Aldrich, Estados Unidos). O protocolo de digestão enzimática foi procedido conforme descrito por Shevchenko et al. (2006), com uma solução de tripsina na concentração de 25 ng/μL, adicionada no volume de 50 μL em cada amostra. Após a digestão, os peptídeos trípticos foram secos em centrífuga a vácuo (Eppendorf, Alemanha). Os peptídeos trípticos foram ressuspensos em 80 μL de solução de ácido fórmico 0,1%, homogeneizados, centrifugados a 10.000 x g por 5 min e deixados em repouso por 15 min. Em seguida, 70 μL das soluções de peptídeos trípticos foram transferidos para tubos apropriados para análise por LC-MS/MS.

3.6.2 Análise por LC-MS/MS

A análise de peptídeos trípticos foi realizada em sistema LC-MS/MS, composto de UPLC nanoAcquity (Waters, Estados Unidos) e espectrômetro de massas modelo micrOTOF

QII-QTOF (Bruker Daltonics, Alemanha). A análise cromatográfica das amostras ocorreu em coluna trap e em coluna capilar Protecol C18 GHQ303 3,0 μm –300 μm x 150 mm, operando com taxa de fluxo de 4,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os peptídeos foram eluídos automaticamente e injetados em espectrômetro de massas, atuando no modo *online*, com o auxílio de agulha de ionização microESI. Nesta etapa, as soluções de fase móvel utilizadas para o programa de gradiente foram: solvente A contendo água e ácido fórmico 0,1% (v/v) e solvente B contendo acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v). A programação iniciou com um passo de dessalinização, com a manutenção de 5% do solvente B durante 14 min. Seguiu-se um gradiente consistindo de uma rampa de subida linear, partindo de 5% até 50% do solvente B durante 30 min, mantendo a concentração de 50% de B durante 5 min; uma rampa de subida linear partindo de 50% até 90% do solvente B durante 3 min, manutenção da concentração de 90% de B durante 2 min e uma rampa de descida linear, partindo de 90% até 10% do solvente B durante 3 min, seguido pela manutenção da concentração de 10% de B durante 3 min. A aquisição de dados teve a duração de, aproximadamente, 60 min. O escaneamento dos íons ocorreu no modo positivo para os espectros de MS1 na faixa de massas entre 100 e 2000 m/z e MS2 entre 70 e 2000 m/z. O espectrômetro de massas QTOF foi operado no modo auto-MSn e adquiriu espectros de MS2 dos íons mais intensos em cada espectro de varredura completo, excluindo os íons de carga simples. As análises no micrOTOF QII, foram gerenciadas pelo aplicativo Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros processados com o auxílio dos aplicativos Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha) e CompassXport, versão 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando-se as configurações padrões para proteômica. As listas de picos foram geradas no formato *extensible mark-up language* (*.mzXML).

3.6.3 Identificação das proteínas

A identificação das proteínas foi realizada pelo confronto das listas de massas geradas contra as sequências de proteínas da espécie *S. liquefaciens*, depositadas no Uniprot (*download* em 06/09/2018, com 4.893 entradas). As listas de massas geradas no item 3.6.2 foram confrontadas contra o referido banco de dado por meio do programa PEAKS, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) (MA et al., 2003). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável; tolerância de erro de 30 ppm para o íon parental e de 0,02 Da para os

fragmentos. As proteínas foram consideradas identificadas quando apresentassem, pelo menos, um peptídeo único com FDR (*False Discovery Rate*) com valor menor que um. As planilhas de identificação exportadas pelos aplicativos em cada análise foram manualmente verificadas.

3.6.4 Predição do peptídeo sinal da enzima lipolítica homóloga de *S. liquefaciens*

O peptídeo sinal foi predito utilizando o programa *SignalP 4.1 Server* com os seguintes parâmetros: “*Gram-negative bacteria*” e valores de *D-cutoff* igual a 0,34 (PETERSEN et al., 2011, NIELSEN, 2017 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)).

3.6.5 Modelagem molecular da enzima lipolítica homóloga de *S. liquefaciens*

A modelagem molecular da enzima lipolítica homóloga de *S. liquefaciens* L135 identificada foi realizada a partir da sua sequência de aminoácidos (UniProtKB: A0A109Z2V1; <https://www.uniprot.org/>) com a proteína cristalizada depositada no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB; <https://www.rcsb.org/>) que apresentou maior *Global Model Quality Estimation* (GMQE) e identidade utilizando o programa SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>). Em seguida, a estrutura modelada da enzima lipolítica foi validada pelo programa SWISS-MODEL.

3.7 Docking molecular da enzima lipolítica homóloga de *S. liquefaciens* identificada com ácidos graxos saturados e poliuretano

O *docking* molecular da estrutura modelada da enzima lipolítica com *p*-nitrofenil acetato (C2; ChemSpider ID: 12687), *p*-nitrofenil butirato (C4; ChemSpider ID: 68343), *p*-nitrofenil hexanoato (C6; ChemSpider ID: 493064), *p*-nitrofenil octanoato (C8; ChemSpider ID: 87927), *p*-nitrofenil decanoato (C10; ChemSpider ID: 3627799); *p*-nitrofenil laurato (C12; ChemSpider ID: 67349), *p*-nitrofenil miristato (C14; ChemSpider ID: 76277), *p*-nitrofenil palmitato (C16; ChemSpider ID: 66524), *p*-nitrofenil estearato (C18; ChemSpider ID: 3587771), *p*-nitrofenil uretano (ChemSpider ID: 200420) foi realizado no *CLC Drug Discovery Workbench* (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>), sendo os compostos obtidos no banco de dados ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>). Com cada composto, foram realizadas 1.000 interações com a estrutura modelada da enzima lipolítica. Em seguida, os *scores* gerados pela mudança de energia potencial com base nas ligações de hidrogênio, íons metálicos e interações estéricas entre a proteína e o composto foram anotados e realizada a

inspeção visual das ligações de hidrogênio. Os *scores* mais baixos, ou seja, mais negativos correspondem às maiores afinidades de ligação (ALMEIDA et al., 2016).

3.8 Caracterização bioquímica e físico-química da enzima lipolítica

3.8.1 Determinação do pH ótimo

O tampão citrato fosfato 50 mM nos valores de pH de 4,6; 5,0; 6,2 e 6,6, bem como o tampão Tris-HCl 50 mM nos valores de pH de 7,5; 8,0; 9,0 e 10,0 substituiu o tampão fosfato de sódio da solução B (item 3.3) e a atividade da enzima lipolítica solubilizada nesses tampões foi determinada. A atividade lipolítica residual da enzima em diferentes valores de pH foi expressa em termos de atividade relativa, considerando o pH ótimo como 100%.

3.8.2 Determinação da carga, da energia livre de dobramento e do potencial eletrostático da enzima lipolítica modelada em diferentes valores de pH *in silico*

A carga e a energia livre de dobramento da estrutura modelada da enzima lipolítica foram determinadas em diferentes valores de pH *in silico*, utilizando o programa PDB2PQR *Server* versão 2.1.1 (http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.1.1/) com a extensão PROPKA versão 3.0. O potencial eletrostático da superfície da estrutura modelada da enzima lipolítica foi avaliado em diferentes valores de pH *in silico*, utilizando o programa PDB2PQR *Server* versão 2.1.1 e, em seguida, o programa PyMOL (<https://pymol.org/2/>) com a extensão APBS *Electrostatics*.

3.8.3 Determinação da temperatura ótima

A mistura da reação enzimática conforme descrito no item 3.3 foi incubada nas temperaturas de 4, 15, 25, 30, 37, 45 e 55 °C durante 1 h e em seguida, determinada a atividade lipolítica. A atividade lipolítica residual nas diferentes temperaturas foi expressa em termos de atividade relativa, considerando a temperatura ótima como 100%. Posteriormente, no restante dos experimentos, foi utilizada a temperatura ótima definida neste experimento.

3.8.4 Efeito de íons metálicos sobre a atividade lipolítica da enzima

Os íons metálicos na forma de MnCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, CdCl₂, MgCl₂, FeCl₃, CoCl₂, CuCl₂, NiCl₂ e BaCl₂ foram adicionados na mistura reacional, descrita no item 3.3, na

concentração final de 1 e 10 mM. A atividade lipolítica residual foi determinada em relação ao controle, sem nenhum íon metálico e considerada como 100%.

3.8.5 Efeito de reagentes e modificadores sobre a atividade lipolítica da enzima

Os reagentes EDTA, Tween-80, β -mercaptoetanol, DTT, Triton X-100 e SDS foram adicionados na mistura reacional, conforme item 3.3, na concentração final de 1 e 5 mM (BORAN; UGUR, 2010), assim como os modificadores de serina (PMSF) e histidina (DEPC), na concentração final variando de 0,01 a 10 mM (RHEE et al., 2005). A atividade lipolítica residual foi medida e o controle consistiu da análise da mistura reacional na ausência de reagente ou modificador e o resultado considerado como 100% da atividade lipolítica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L135 em ágar tributirina em diferentes temperaturas

Na presença de micro-organismos produtores de enzimas lipolíticas, o triacilglicerol tributirina adicionado ao meio de cultura é hidrolisado, possibilitando visualizar halos ao redor da colônia referente a esta atividade enzimática. A determinação do diâmetro do halo de hidrólise de *S. liquefaciens* L135 ao longo da incubação em ágar tributirina permitiu comparar a atividade lipolítica em diferentes temperaturas e verificar que a enzima lipolítica extracelular foi produzida com maior atividade a 30 °C (Figura 3). A atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L135 nas temperaturas avaliadas foi aumentada conforme o tempo de cultivo na seguinte ordem: 4, 7, 37, 17, 25 e 30 °C (Figura 3). Abdou (2003) também verificou que *S. marcescens*, isolada do leite cru, produziu uma lipase extracelular com maior atividade a 30 °C no ágar Spirit blue.

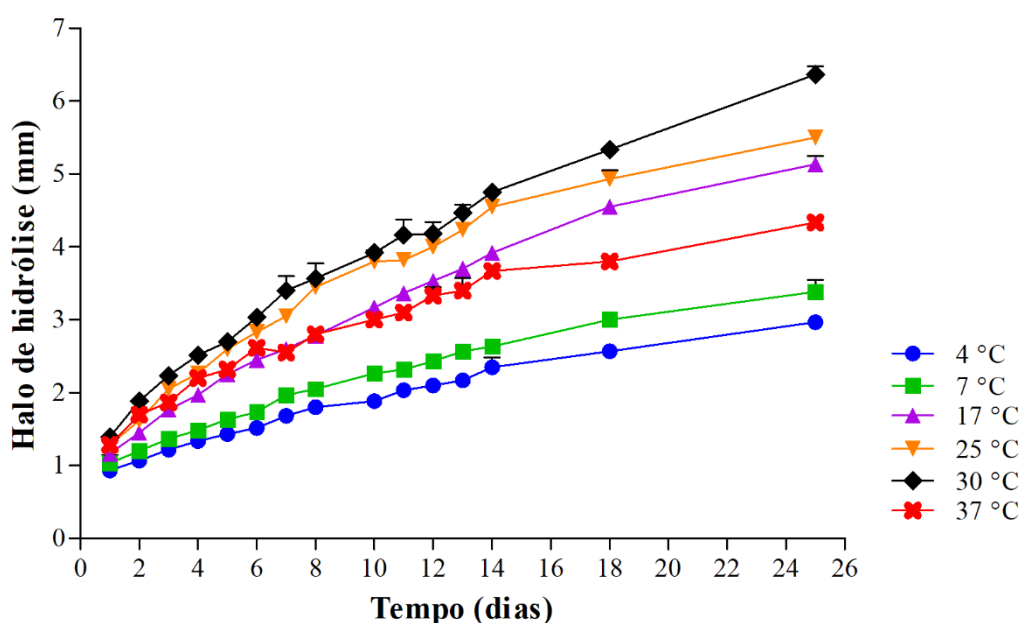


Figura 3. Valores médios dos halos de hidrólise (mm) representativos da atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L135 em diferentes temperaturas de incubação em ágar tributirina em função do tempo de cultivo.

No ágar tributirina, foi possível observar a atividade da enzima lipolítica de *S. liquefaciens* L135 em baixas temperaturas. Com dois dias de incubação, o halo de hidrólise foi de 1,06 e 1,2 mm a 4 e 7 °C, respectivamente, enquanto na temperatura ótima (30 °C), o halo foi de 1,88 mm (Figura 3). O isolado *S. liquefaciens* L135 é proveniente de leite cru refrigerado e, portanto, com potencial de ser importante agente de deterioração lipolítico do leite mantido sob refrigeração. Decimo et al. (2018) verificaram que após inocular *S. marcescens* S92 em leite UHT comercial (2,5% de gordura) e estoca-lo durante 10 dias a 10 °C, foram detectados produtos da lipólise como os ácidos etanóico, butanóico, pentanóico, hexanóico, heptanóico, octanóico e 3-metilbutanóico devido à capacidade desta estirpe em produzir lipases a temperaturas de refrigeração.

4.2 Atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L135 ao longo do crescimento

A enzima lipolítica de *S. liquefaciens* L135 foi detectada no meio BHI com 7 h de incubação, a 30 °C, com agitação e com atividade de 421 U/mL, utilizando o substrato *p*-NPP (Figura 4). A atividade aumentou com o tempo de cultivo, alcançando 1.056 U/mL com 24 h de incubação (Figura 4). O tempo de incubação para a detecção de atividade lipolítica em bactérias é variável. Abdou (2003) detectou a atividade lipolítica de *S. marcescens* após 6 h de incubação a 30 °C em ágar Spirit blue. Chakraborty e Paulraj (2009) relataram que a 37 °C, *P. fluorescens* MTCC 2421 foi capaz de produzir lipase nas primeiras 5 h de incubação e, maior atividade do extrato enzimático bruto foi obtida após 48 h de crescimento com 11,85 U/mL. Gururaj et al. (2016) verificaram que a atividade máxima de lipase de *Acinetobacter* sp. AU07, isolado de resíduo de destilaria, alcançou 331,16 U (atividade específica de 38,64 U/mg) na fase estacionária, após 16 h de cultivo a 30 °C.

4.3 Termoestabilidade da enzima lipolítica no leite

Na figura 5, observa-se o efeito dos tratamentos térmicos de 65, 72, 85 e 95 °C na atividade da enzima lipolítica de *S. liquefaciens* L135 ao longo do tempo. Os tratamentos de pasteurização usados na indústria de laticínios foram simulados para avaliar a inativação da enzima lipolítica e observou-se que, na simulação da pasteurização lenta, a 65 °C por 30 min, a enzima manteve 47% da atividade lipolítica residual (Figura 5), entretanto, na simulação da

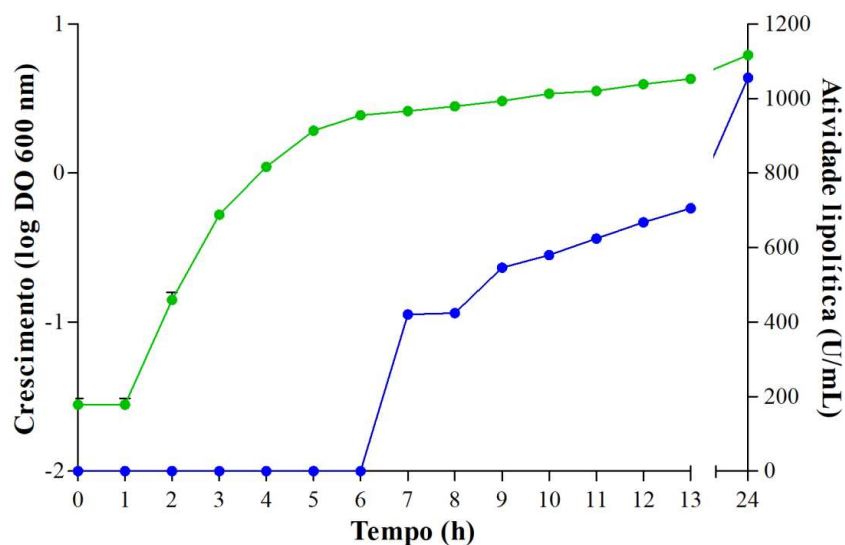


Figura 4. Curva de crescimento como log DO 600 nm (verde) e atividade lipolítica em U/mL (azul) de *S. liquefaciens* L135 em caldo BHI a 30 °C durante 24 h de incubação sob agitação de 200 RPM

pasteurização rápida, a 72 °C por 15 s, nenhum efeito sobre a atividade lipolítica foi detectado. Embora esses binômios tempo/temperatura de pasteurização sejam, reconhecidamente, eficientes em eliminar patógenos de origem alimentar e bactérias deterioradoras termossensíveis, não foram suficientes para inativar a enzima lipolítica de *S. liquefaciens* L135.

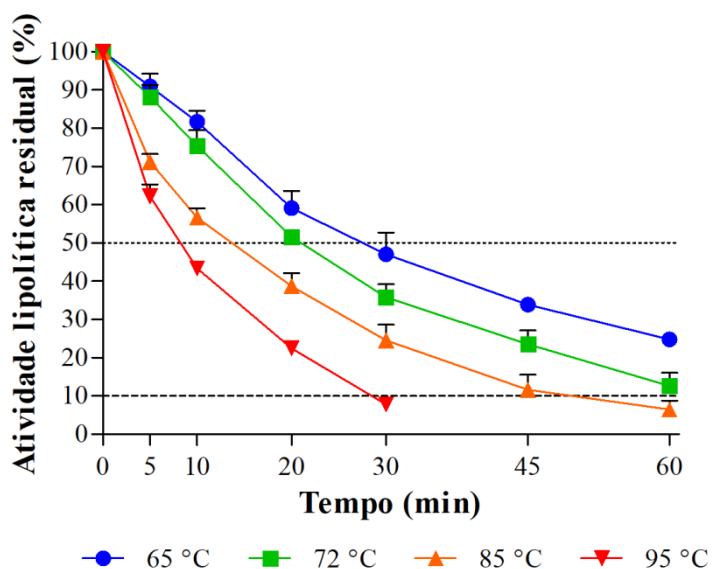


Figura 5. Curva de inativação da enzima lipolítica de *S. liquefaciens* L135 em leite desnatado reconstituído a 10%, sendo que a atividade lipolítica residual foi estimada em % em função do tempo incubação. No eixo Y, as linhas pontilhadas no ponto 50 e 10 representam a redução de 50 e 90% da atividade lipolítica, respectivamente.

Law, Sharpe e Chapman (1976) mostraram que, após tratamento térmico de 63 °C durante 30 min em leite cru, as atividades lipolíticas residuais extracelulares de várias estirpes de *Pseudomonas* isoladas do leite cru foram de 55 a 100%. No entanto, Martins et al. (2015) mostraram que a atividade residual da lipase LipM de *P. fluorescens* 041 isolado do leite cru foi de apenas 25,4% após o tratamento térmico de 72 °C por 20 s.

Durante 20 min de exposição às temperaturas 65, 72, 85 e 95 °C, a enzima lipolítica manteve 59, 51, 38 e 27% de atividade residual, respectivamente (Figura 5). Este resultado permite destacar a elevada resistência térmica de lipase de *S. liquefaciens* L135. A lipase de *S. marcescens* foi completamente inativada após o aquecimento a 90 °C durante 5 min (ABDOU, 2003) enquanto, a de *Serratia* sp. W3 foi inativada em temperaturas acima de 55 °C (EDDEHECH et al., 2019). Lipases de espécies de *Pseudomonas* também se mostraram menos resistentes que a de *S. liquefaciens* L135. Syed et al. (2010) determinaram que a lipase de *P. aeruginosa* BN-1 manteve 30% de atividade durante 1 h a 60 °C e a 70 °C foi totalmente inibida. Shirazi et al. (2013) mostraram que a lipase *P. aeruginosa* HR59 reteve, aproximadamente, 50% de sua atividade após 25 min de incubação a 50 °C, enquanto Gökbulut e Arslanoğlu (2013) relataram que a lipase de *P. fluorescens* KE38, após 45 min de incubação, reteve quase 50% de sua atividade a temperaturas de 55 °C e 65 °C e, a 75 °C, não houve atividade detectável.

A atividade residual, os valores de $t_{1/2}$ e de D da enzima lipolítica diminuiram linearmente com a temperatura do tratamento térmico e o tempo de incubação (Figura 5 e 6A e 6B e Tabela 1). Na temperatura mais alta testada neste estudo (95 °C), foi encontrado valor D de 27,95 min. Andersson, Hedlund e Jonsson (1979) relataram valor D de 23,5 min para a lipase de *P. fluorescens* após tratamento térmico de leite desnatado a 100 °C. A lipase de *S. liquefaciens* L135 apresentou valor Z aproximado de 60 °C (Tabela 1 e Figura 6C), superior aos 42 °C encontrados por Fox e Stepaniak (1983) para a lipase termoestável extracelular de *P. fluorescens* AFT36.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos (k , $t_{1/2}$, D e Z) da inativação térmica da enzima lipolítica de *S. liquefaciens* L135 em leite desnatado reconstituído a 10%

Temperatura (°C)	65	72	85	95
k (min ⁻¹) ^a	0,02382	0,03477	0,04596	0,08238
$t_{1/2}$ (min) ^b	29,10	19,94	15,08	8,41
Valor D (min) ^c	96,71	66,23	50,10	27,95
Valor Z (°C) ^d	60,02			

^a k (min⁻¹), constante da taxa de inativação; ^b $t_{1/2}$ (min), a meia vida da enzima; ^c valor D (min), representa o tempo necessário para reduzir 90% do valor original da atividade enzimática; ^d valor Z (°C), temperatura necessária para que a curva de inativação térmica atravessasse um ciclo logarítmico.

4.4 Purificação parcial da enzima lipolítica

A enzima lipolítica de *S. liquefaciens* L135 foi parcialmente purificada usando ultrafiltração e cromatografia em coluna de filtração em gel. A atividade específica da enzima lipolítica foi de 2.793 U/mg, o fator de purificação foi de cerca de 3,1 vezes com 21,5% de recuperação (Tabela 2). Considerando dados da literatura, pode-se considerar que os resultados obtidos indicam a adequação da metodologia utilizada. No procedimento de purificação de lipase de *S. marcescens* ECU1010, Zhao et al. (2008) obtiveram atividade específica de 497 U/mg com purificação de 5,5 vezes e 15,8% de recuperação. Atividade específica de 190,46 U/mg foi registrada pela lipase de *P. aeruginosa* BN-1 (SYED et al., 2010) enquanto a lipase de *B. methylotrophicus* PS3 foi purificada 2,1 vezes com rendimento final de 20,8% (SHARMA et al., 2017). Eddehech et al. (2019) encontraram atividade específica da lipase de 625 U/mg e 300 U/mg utilizando emulsão de tributirina e azeite como substrato, respectivamente, na presença de 3 mM CaCl₂.

Tabela 2. Etapas da purificação parcial da enzima lipolítica de *S. liquefaciens* L135

Etapas	Proteína total (mg)	Atividade lipolítica total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)
EB ^a	7,1	6.477	915	1	100
UF ^b	2,6	2.866	1.105	1,2	44,2
EM ^c	0,5	1.396	2.793	3,1	21,5

^a EB; sobrenadante do cultivo de 24 h, ^b UF; amostra concentrada por ultrafiltração, ^c EM; amostra submetida a cromatografia de exclusão molecular.

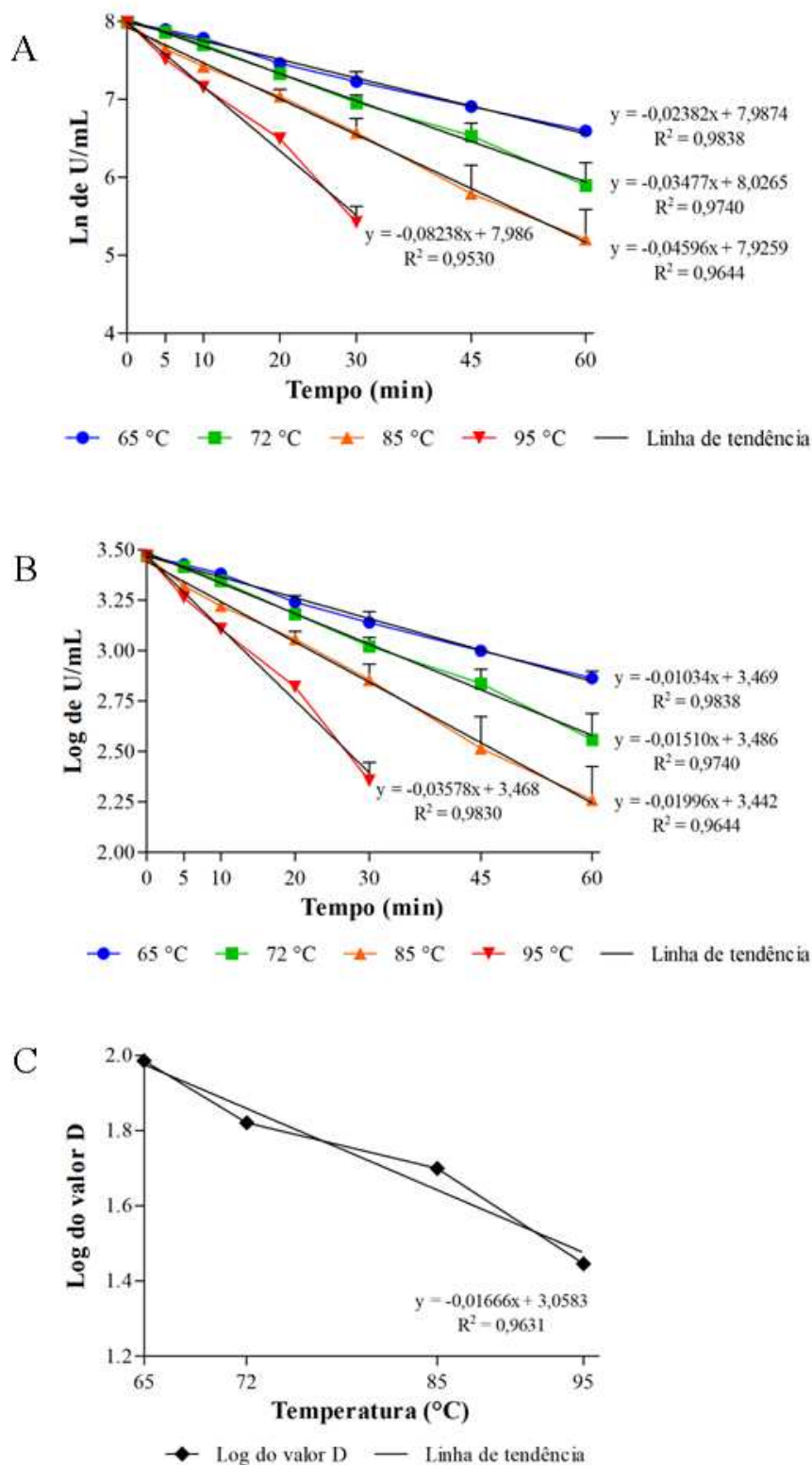


Figura 6. (A) Atividade lipolítica residual representada por Ln de U/mL em função do tempo incubação, sendo o valor $k = - (a)$; (B) Atividade lipolítica residual é representada por log (U/mL) em função do tempo de incubação, sendo o valor $D = -1/a$; (C) Log do valor D em função da temperatura, sendo o valor $Z = -1/a$.

O gel SDS-PAGE e o zimograma complementar a ele estão apresentados na figura 7. Por zimografia, foi possível estimar que a enzima lipolítica apresentou uma banda com massa molecular de, aproximadamente, 65 kDa quando comparado com o gel SDS-PAGE que continha o marcador molecular (Figura 7). Esses dados corroboram os encontrados na literatura; a lipase de *S. marcescens* Sr 41 800 apresentou massa molecular de 62 kDa (MATSUMAE; SHIBATANI, 1994). Zhao et al. (2008) encontraram massa molecular de 65 kDa para a lipase de *S. marcescens* ECU1010. Eddehech et al. (2019) mostraram, por análise SDS-PAGE, que a lipase de *Serratia* sp. W3 apresentou uma banda estimada de 67 kDa. Esses resultados sugerem que as lipases de *Serratia* spp. possuem massa molecular entre 62 e 67 kDa.

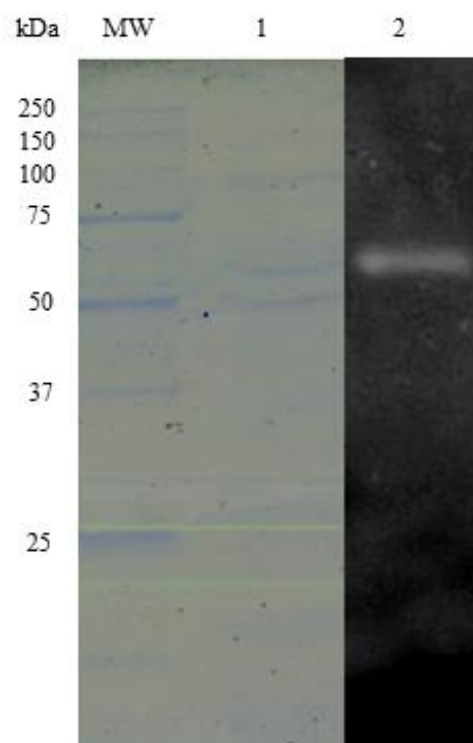


Figura 7. SDS-PAGE e zimograma da amostra da enzima lipolítica de *S. liquefaciens* L135 após etapas de purificação parcial. MW; padrão de massa molecular (Bio-Rad, broad range), 1; SDS-PAGE corado com azul de Coomassie da amostra purificada parcialmente, 2; zimograma com metilumbeliferil butirato, visualizando a presença de uma banda referente à ação da enzima lipolítica.

4.5 Identificação da enzima lipolítica

4.5.1 Dados da identificação por LC-MS/MS da enzima lipolítica

Os peptídeos trípticos obtidos na digestão enzimática foram submetidos à análise em LC-MS/MS e foi possível recuperar dois peptídeos únicos, com 5% de cobertura e 100% de identidade da sequência dos peptídeos analisados em relação à proteína poliuretanasase da espécie *S. liquefaciens* depositada no UniprotKB (Tabela 3). A poliuretanasase homóloga identificada apresentou massa molecular teórica de 64.864 kDa, confirmando a estimativa feita por zimografia e pI teórico de 4,35 (Tabela 3). Essa proteína identificada possui 615 resíduos de aminoácidos (Figura 8) e dois domínios conservados: cd00519 família lipase I.3 e o COG2931 proteína de ligação a Ca²⁺, relacionada à toxina RTX (biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários).

Tabela 3. Dados da espectrometria de massas da poliuretanasase homóloga de *S. liquefaciens* identificada por LC-MS/MS

Código de acesso da proteína no UniProtKB	A0A109Z2V1
Proteína	Poliuretanasase
Organismo	<i>S. liquefaciens</i>
MW teórica (kDa)	64,864
pI teórico	4,35
Nº peptídeos / peptídeos únicos	2/2
Sequência dos peptídeos identificados	DADGGITLANSIGTLK VINIGYENDPVFR
Cobertura (%)	5
Probabilidade proteína	100

A poliuretanasase identificada possui a sequência altamente conservada de serina hidrolase (GX₁SX₂G) e foi encontrada nos resíduos de aminoácidos 205-209 (Figura 8, grifo verde), representado por GHSLG que envolve a serina catalítica na posição 207, sendo que X₁ foi conservado com uma histidina e X₂ foi conservado com uma leucina.

```

                20                                40
MGIFNYQGLD  EAKSKALFTD  AMAISTYAYH  NIDNGFDEGY  HNTGFGLGLP
                60                                80                                100
FTLV TALIGS  SQSQGGLPGI  PWNPDSEKAA  LAAVNNAGWS  LISADQLGYQ
                120                                140
GKTDARGTYY  GETLGYTTAQ  AEVLGKYDSE  GNLTGIGIAF  RGTSGPRESL
                160                                180                                200
ITDTIGDLVN  DLLAGFGPSG  YADNYSLKAF  GTLLGDVAKF  AQSHGLSGDD
                220                                240
ITISGHSLGGLAVNSMAALS  DGNWGGFYAQ  SNYVAFASPT  QYETGDKVIN
                260                                280                                300
IGYENDPVFR  ALDGTTRTSA  TLGVHDA PQE  SATNNIVNFN  DHYASTAWNI
                320                                340
LPFSILNVPT  WLSHLPFFYQ  DGLMRVLNSE  FYSLTSKDS  T  VIVSNLSDVT
                360                                380                                400
RGNTWVEDLN  RNAEQHSGPT  FIVGSDGN DL  IKGGAGNDYL  EGRAGNDTFR
                420                                440
DDGGFNII SG  GEGHNTLDLQ  HALKNTEVAY  DGNTLYLRDA  DGGITLANSI
                460                                480                                500
GTLKSKESSL  LIFTKEVDHQ  VTDNGLLSTK  GLTAYASSAN  GTATDDVLTA
                520                                540
KDSGSWLFGL  EGNDQLFGGK  GNDV FVGGAG  NDVMHSQGG S  NTFLFSGDFG
                560                                580                                600
QDLIYGYQAR  DKLVFIGTDG  SSTGGNFRDF  ASEVNDNLVF  NFGGNTVTLV
G V G F D S L S D G  Q V V L A  615

```

Figura 8. Sequência homóloga dos aminoácidos da poliuretase de *S. liquefaciens* L135 identificada. Em vermelho, encontram-se os peptídeos identificados por LC-MS/MS e em verde a sequência conservada de serina hidrolases (GHSLG).

Stern e Howard (2000) mostraram que a poliuretase de *Pseudomonas chlororaphis* possui 617 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 65 kDa e com sequência conservada da serina hidrolase GX₁SX₂G encontrada nos resíduos de aminoácidos 204-208, representando pela mesma sequência encontrada na sequência homóloga da poliuretase de *S. liquefaciens* L135 (GHSLG). Na sequência conservada GX₁SX₂G, em lipases verdadeiras, X₁ é ocupado principalmente por histidina ou tirosina e X₂ é variável (RUIZ et al., 1999).

4.5.2 Modelagem molecular da poliuretase homóloga de *S. liquefaciens* L135 identificada

A Tabela 5 apresenta as características das proteínas cristalizadas depositadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB). Para fazer a modelagem molecular da sequência homóloga da poliuretase de *S. liquefaciens* L135, foi escolhida a proteína LipA de *S. marcescens* que apresentou maior *Global Model Quality Estimation* ($GMQE = 0,92$) e identidade (78,1%), dentre as proteínas cristalizadas depositadas no PDB (Tabela 5).

Tabela 5. Dados de proteínas cristalizadas depositadas no banco de dados PDB para selecionar a proteína molde para modelar a poliuretase homóloga de *S. liquefaciens* L135

Código PDB	Proteína	Nome da proteína	Organismo	<i>GMQE</i> *	Identidade (%)	Resolução (Å)
2QUB	LipA	Lipase	<i>S. marcescens</i>	0,92	78,10	1,8
2Z8Z	-	Lipase	<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	0,82	64,50	1,8
2ZJ6	-	Lipase	<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	0,82	64,33	2,2
2Z8X	-	Lipase	<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	0,81	64,50	1,5
2ZJ7	-	Lipase	<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	0,81	64,33	2,2
3A70	-	Lipase	<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	0,81	64,50	2,1

**GMQE* = *Global Model Quality Estimation*;

*As outras proteínas cristalizadas apresentaram *GMQE* menor ou igual a 0,04.

Na figura 9 é apresentado o alinhamento da sequência homóloga de aminoácidos da poliuretase de *S. liquefaciens* L135 identificada com a sequência da lipase extracelular (LipA) de *S. marcescens*.

Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	MGI F S Y K D L D	E N A S K A L F S D	A L A I S T Y A Y H	N I D N G F D E G Y	H Q T G F G L G L P	50
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	M G I F N Y Q G L D	E A K S K A L F T D	A M A I S T Y A Y H	N I D N G F D E G Y	H N T G F G L G L P	50
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	L T L I T A L I G S	T Q S Q G G L P G L	P W N P D S E Q A A	Q E A V N N A G W S	V I S A T Q L G Y A	100
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	F T L V T A L I G S	S Q S Q G G L P G I	P W N P D S E K A A	L A A V N N A G W S	L I S A D Q L G Y Q	100
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	G K T D A R G T Y Y	G E T A G Y T T A Q	A E V L G K Y D S E	G N L T A I G I S F	R G T S G P R E S L	150
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	G K T D A R G T Y Y	G E T L G Y T T A Q	A E V L G K Y D S E	G N L T G I G I A F	R G T S G P R E S L	150
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	I G D T I G D V I N	D L L A G F G P K G	Y A D G Y T L K A F	G N L L G D V A K F	A Q A H G L S G E D	200
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	I T D T I G D L V N	D L L A G F G P S G	Y A D N Y S L K A F	G T L L G D V A K F	A Q S H G L S G D D	200
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	V V V S G H S L G G	L A V N S M A A Q S	D A N W G G F Y A Q	S N Y V A F A S P T	Q Y E A G G K V I N	250
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	I T I S G H S L G G	L A V N S M A A L S	D G N W G G F Y A Q	S N Y V A F A S P T	Q Y E T G D K V I N	250
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	I G Y E N D P V F R	A L D G T S L T L P	S L G V H D A P H T	S A T N N I V N F N	D H Y A S D A W N I	300
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	I G Y E N D P V F R	A L D G T I R T S A	T L G V H D A P Q E	S A T N N I V N F N	D H Y A S T A W N I	300
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	L P F S I L N I P T	W L S H L P F F Y Q	D G L M R V L N S E	F Y S L T D K D S T	I I V S N L S N V T	350
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	L P F S I L N V P T	W L S H L P F F Y Q	D G L M R V L N S E	F Y S L T S K D S T	V I V S N L S D V T	350
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	R G N T W V E D L N	R N A E T H S G P T	F I I G S D G N D L	I K G G K G N D Y L	E G R D G D D I F R	400
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	R G N T W V E D L N	R N A E Q H S G P T	F I V G S D G N D L	I K G G A G N D Y L	E G R A G N D T F R	400
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	D A G G Y N L I A G	G K G H N I F D T Q	Q A L K N T E V A Y	D G N T L Y L R D A	K G G I T L A D D I	450
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	D D G G F N I I S G	G E G H N T L D L Q	H A L K N T E V A Y	D G N T L Y L R D A	D G G I T L A N S I	450
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	S T L R S K E T S W	L I F N K E V D H Q	V T A A G L K S D S	G L K A Y A A A T G	G D G D D V L Q A	499
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	G T L K S K E S S L	L I F T K E V D H Q	V T D N G L L S T K	G L T A Y A S S A N	G T A T D D V L T A	500
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	R S H D A W L F G N	A G N D T L I G H A	G G N L T F V G G S	G D D I L K G V G N	G N T F L F S G D F	549
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	K D S G S W L F G L	E G N D Q L F G G	K G N D V F V G G A	G N D V M H S Q G G	S N T F L F S G D F	549
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	G R D Q L Y G F N A	S D K L V F I G T E	G A S G G N I R D	Y A T Q Q N D D L V	L A F G H S Q V T L	597
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	G Q D L I Y G Y Q A	R D K L V F I G T D	G S S T G G N F R D	F A S E V N D N L V	F N F G G N I V T L	599
Lipase - LipA (PDB: 2QUB)	I G V S L D H I S T	D Q V V L A	613			
Poliuretanas (UniProtKB: A0A109Z2V1)	V G V G F D S L S D	G Q V V L A	615			

Figura 9. Alinhamento da sequência homóloga de aminoácidos da poliuretanas de *S. liquefaciens* L135 identificada com a da proteína molde para a modelagem molecular. Aminoácidos ou traço com fundo cinza representam aminoácidos diferentes entre as duas sequências ou *gap*, respectivamente.

A estrutura modelada da poliuretanas de *S. liquefaciens* L135 identificada neste estudo é apresentada na figura 10. Esta enzima apresentou três íons Ca^{2+} complexados à estrutura, representado por esferas de cor rosa (Figura 11). Meier et al. (2007) mostraram que o sítio ativo da lipase LipA de *S. marcescens*, usada neste estudo para modelar a poliuretanas é composta pela tríade catalítica Ser²⁰⁷, Asp²⁵⁶ e His³¹⁴. Esses resíduos de aminoácidos são conservados na sequência identificada da poliuretanas e pode-se observar que Ser²⁰⁷ está dentro do *nucleophilic elbow*, logo pode-se inferir que Asp²⁵⁶ e His³¹⁴ também fazem parte da tríade catalítica da poliuretanas homóloga de *S. liquefaciens* L135.

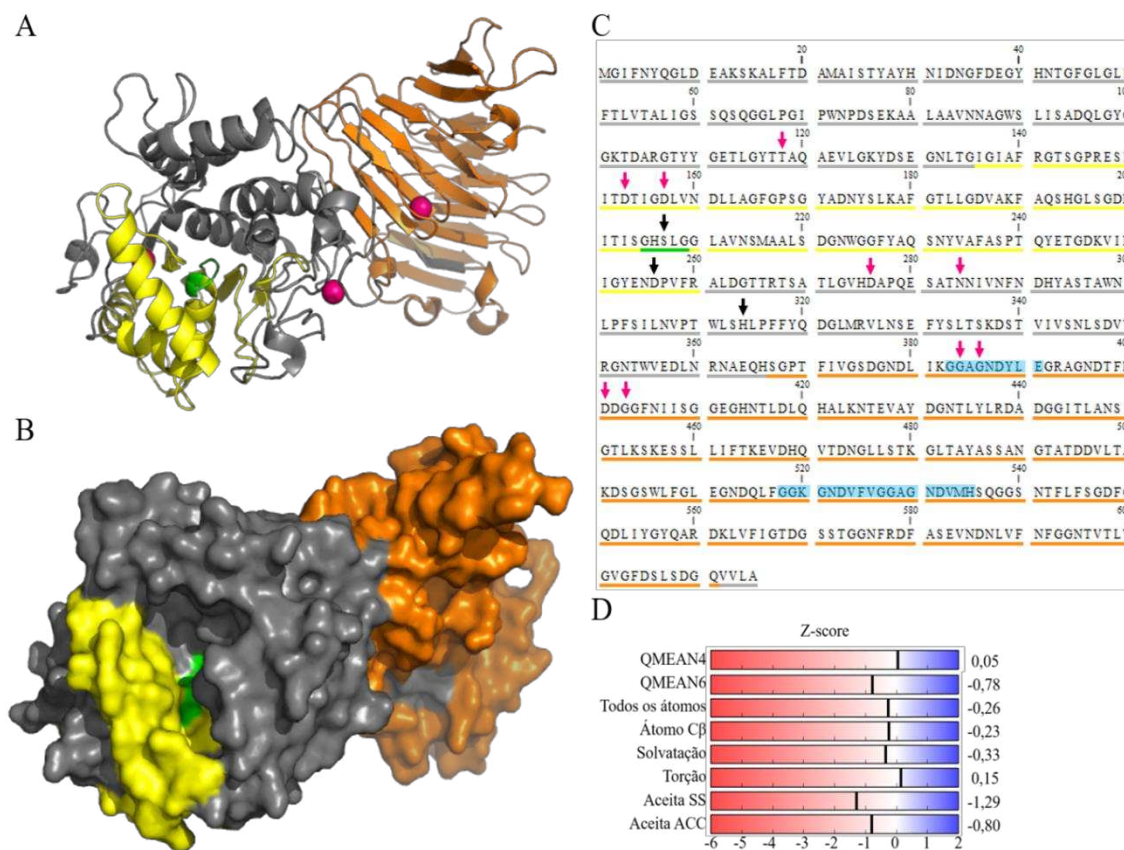


Figura 10. Estrutura modelada da poliuretanasase de *S. liquefaciens* identificada com os domínios e os resultados da validação. Estrutura modelada da poliuretanasase apresentada na forma de modelo de fitas (A), superfície (B) e sequência de aminoácidos (C), bem como os resultados de validação da modelagem (D). Laranja = domínio de complexação com cálcio; amarelo = domínio catalítico; verde = *nucleophilic elbow*; cinza = partes sem definição de domínio; fundo azul = repetições ricas em glicina como GGXGXDXXX que complexam com íons de cálcio e sistema secretor ABC; rosa = cálcio; seta rosa = aminoácidos complexados ao cálcio; seta preta = tríade catalítica. *Z-score*: branco = valores próximos a zero e indicam propriedades semelhantes entre a estrutura modelada e as experimentais de mesmo tamanho; azul = valores positivos e indicam que as propriedades da estrutura modelada são superiores às estruturas experimentais de mesmo tamanho; vermelho = valores negativos e indicam que as propriedades da estrutura modelada são inferiores às estruturas experimentais de mesmo tamanho.

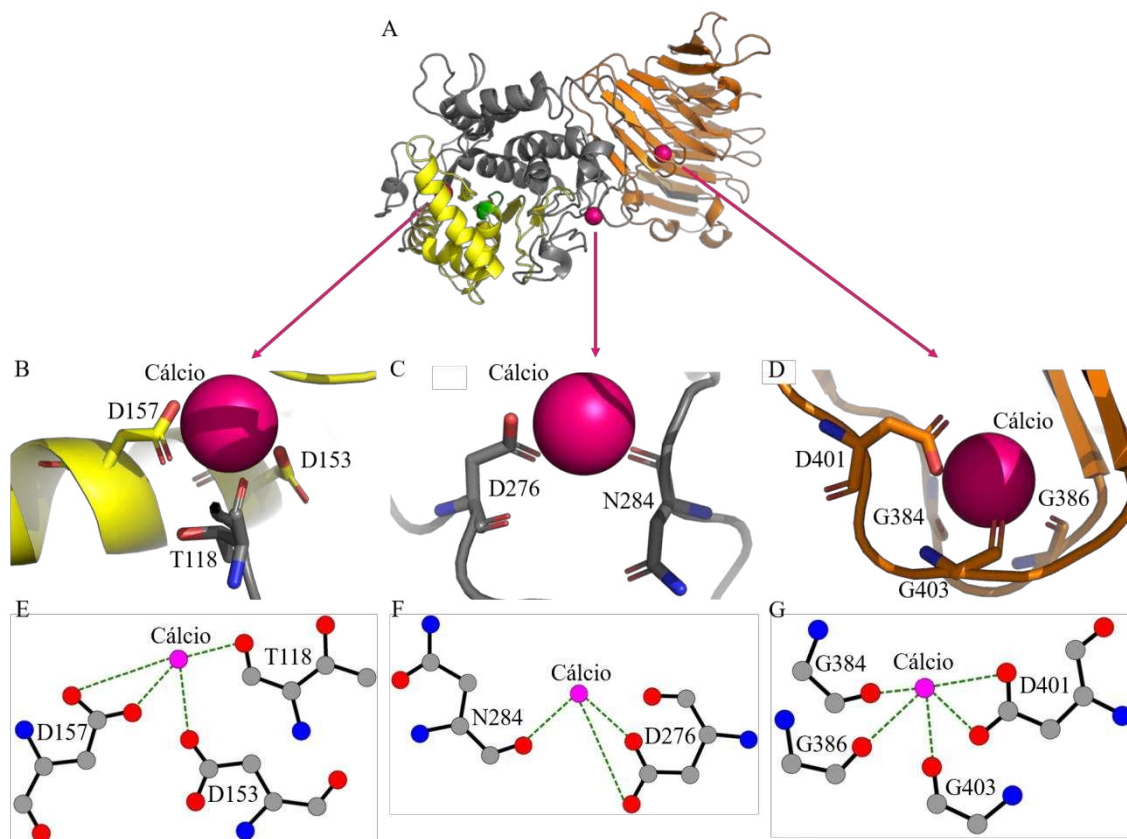


Figura 11. Complexação da poliuretânase modelada com íons de cálcio. Estrutura modelada da poliuretânase apresentada na forma de *cartoon* (A), aminoácidos complexados com o cálcio em 3D (B, C, D) e 2D (E, F, G). Laranja = domínio de complexação com cálcio; amarelo = domínio catalítico; verde = *nucleophilic elbow*; cinza = partes sem definição de domínio; rosa = cálcio, vermelho = oxigênio; cinza = carbono; azul = nitrogênio; linha contínua preta = ligação covalente entre os átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio; linha tracejada verde = complexo entre o oxigênio do aminoácido e o cálcio.

4.5.3 Predição do peptídeo sinal da poliuretânase homóloga de *S. liquefaciens* L135

A predição do peptídeo sinal utilizando o programa *SignalP* 4.1 mostrou que a poliuretânase não requer peptídeo sinal para sua translocação transmembrana. Uma das estratégias utilizadas pelas bactérias gram-negativas para secretar proteínas através das duas membranas que delimitam as células é relacionada às proteínas que não possuem um peptídeo sinal N-terminal, conhecido como sistema de secreção do tipo I (BINET et al., 1997).

As proteínas secretadas pelo sistema de secreção do tipo I possuem repetições ricas em glicina como GGXGXDXXX que complexam com íons de cálcio COG2931 (DELEPELAIRE, 2004). A sequência da poliuretânase de *S. liquefaciens* identificada apresenta três repetições similares: GGAGNDYLE entre os aminoácidos 383 e 391, GGKGNDVFFV entre os aminoácidos 518 e 526 e GGAGNDVMH entre aminoácidos 527 e

535 (Figura 10C). Entretanto, somente a repetição GGAGNDYLE entre os aminoácidos 383 e 391 apresenta aminoácidos complexados ao cálcio (Figura 11). Com a identificação destas sequências conservadas na poliuretânase, pode-se inferir que ela é secretada pelo sistema de secreção tipo I.

Akatsuka et al. (1997) mostraram que o operon LipB de *S. marcescens* consiste de três genes, *lipBCD* e codifica uma ATPase de membrana interna (a proteína ABC), uma proteína de fusão de membrana e uma proteína de membrana externa, respectivamente. Meier et al. (2007) verificaram que a lipase LipA de *S. marcescens*, usada neste estudo para modelar a poliuretânase, é uma enzima de 613 aminoácidos pertencente à família I.3 e que também apresenta o sistema de secreção tipo I. Machado et al. (2016) identificaram que a protease resistente ao calor de *S. liquefaciens* também possui um motivo consenso GGXGXD que liga-se ao íon cálcio e um motivo exportador ABC (DXXX).

4.6 Docking molecular da poliuretânase homóloga de *S. liquefaciens* identificada com ácidos graxos saturados e poliuretano

A poliuretânase homóloga de *S. liquefaciens* L135 modelada foi testada quanto à capacidade de complexar, *in silico*, a diferentes substratos de cadeia curta, média e longa e ao substrato de poliuretânase (*p*-nitrofenil uretano). Foi possível observar no *docking* molecular que a poliuretânase complexou-se aos substratos através da serina catalítica (S²⁰⁷) e os melhores *scores* foram com substratos de lipases, de cadeia longa na seguinte ordem crescente (C₁₆, C₁₈, C₁₂, C₁₄), confirmando a atividade de lipase (Tabela 6). Nas figuras 12A e 12C, tem-se a complexação da poliuretânase com o substrato *p*-nitrofenil palmitato que foi usado neste estudo. A poliuretânase complexou-se com os substratos de cadeia curta (C₈, C₆, C₄), que são substratos específicos de esterase, mas que lipases também conseguem hidrolisar. Além disso, a poliuretânase complexou-se ao *p*-nitrofenil uretano, indicando que esta, com domínio de lipase, consegue hidrolisar o substrato uretano (Tabela 6 e Figuras 11 B e 11 D).

Tabela 6. Resultados do *docking* molecular da enzima poliuretanasase homóloga de *S. liquefaciens* L135, utilizando o programa *CLC Drug Discovery Workbench* com os compostos obtidos no banco de dados ChemSpider

Composto	Número de carbonos da cadeia de ácido graxo	ChemSpider ID	Sítio de ligação	Score	Score da ligação de hidrogênio	Score da interação estérica
<i>p</i> -nitrofenil palmitato	C16	66524	S207	-70,29	-6,00	-70,48
<i>p</i> -nitrofenil estearato	C18	3587771	S207	-69,76	-6,00	-71,65
<i>p</i> -nitrofenil laurato	C12	67349	S207	-63,91	-5,80	-64,43
<i>p</i> -nitrofenil miristato	C14	76277	S207	-62,38	-6,00	-62,21
<i>p</i> -nitrofenil decanoato	C10	3627799	S207	-57,50	-6,00	-56,29
<i>p</i> -nitrofenil octanoato	C8	87927	S207	-53,23	-6,00	-52,07
<i>p</i> -nitrofenil hexanoato	C6	493064	S207	-49,42	-5,74	-47,03
<i>p</i> -nitrofenil butirato	C4	68343	S207	-44,56	-6,00	-40,57
<i>p</i> -nitrofenil uretano	-	200420	S207	-40,59	-6,00	-37,14
<i>p</i> -nitrofenil acetato	C2	12687	-	-	-	-

Lipases bacterianas podem apresentar especificidade variada por substratos. Uttatree, Winayanuwattikun e Charoenpanich (2010) testaram substratos de cadeia curta, média e longa e verificaram que a lipase de *Acinetobacter baylyi* apresentou atividade ótima em substratos de cadeia média, como ácido cáprico (C₁₀), ácido caprílico (C₈), ácido láurico (C₁₂). A lipase de *P. aeruginosa* CS-2 hidrolisou, preferencialmente, substratos de cadeia longa, como *p*-nitrofenil palmitato (C₁₆) e *p*-nitrofenil miristato (C₁₄) (PENG; LIN; WEI, 2010). Esse resultado foi confirmado por Syed et al. (2010), que verificaram que a lipase purificada de *P. aeruginosa* BN-1 hidrolisa ésteres *p*-nitrofenílicos de várias cadeias acílicas com preferência por ácidos graxos de cadeia longa. Durante o processo de purificação utilizando emulsão de tributirina e azeite, Eddehech et al. (2019) detectaram maior atividade da lipase de *Serratia* sp. W3 com tributirina, indicando a preferência dessa enzima por substratos de cadeia curta.

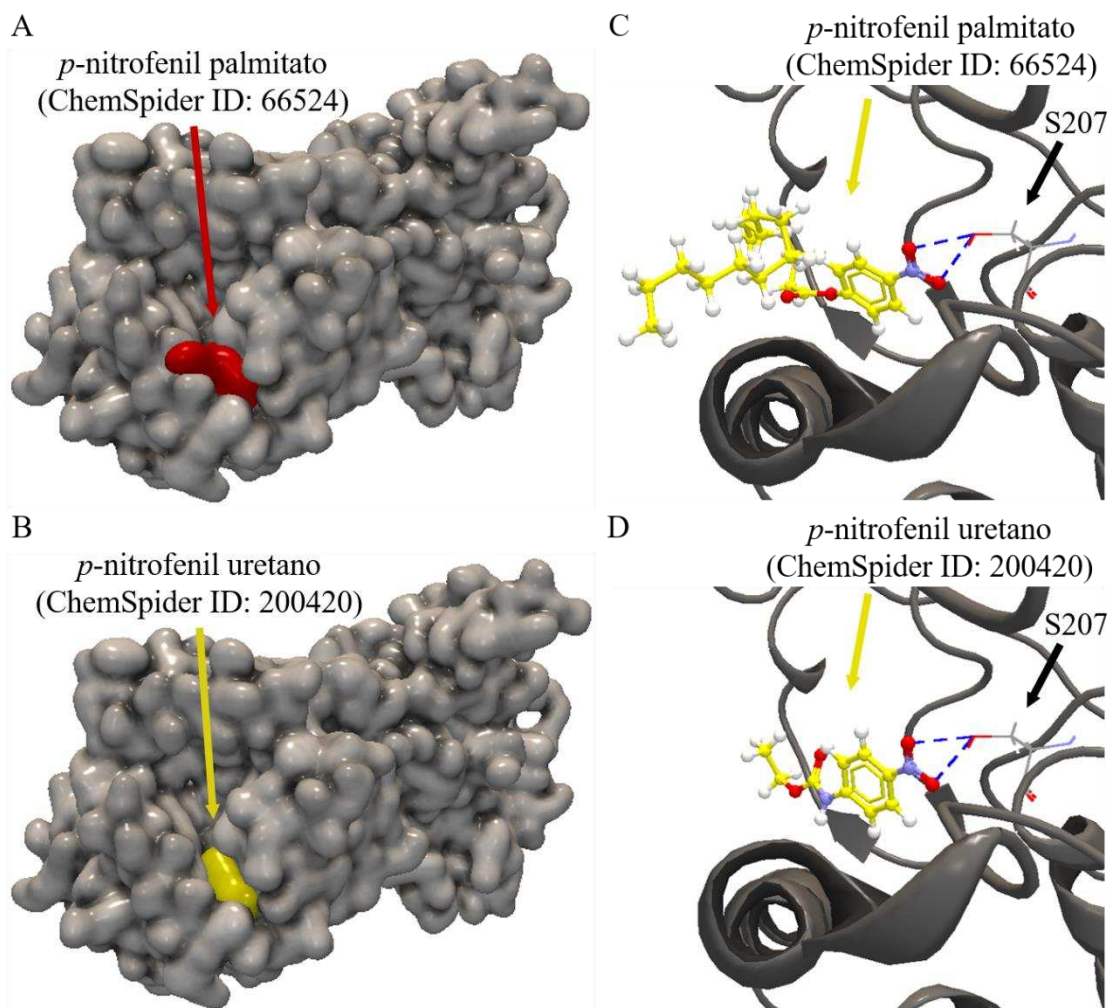


Figura 12. *Docking* molecular entre a estrutura modelada da poliuretase *p*-nitrofenil palmitato (C16; ChemSpider ID: 66524) e *p*-nitrofenil uretano (ChemSpider ID: 200420). Estrutura modelada da poliuretase apresentada na forma de superfície (A, B) e *cartoon* (C, D) ligada aos compostos avaliados por *docking* molecular. Cinza = estrutura da proteína, vermelho = poliuretase *p*-nitrofenilpalmitato; amarelo = *p*-nitrofeniluretano.

4.7 Caracterização bioquímica e físico-química da poliuretase de *S. liquefaciens* L135

4.7.1 Determinação do pH ótimo

O efeito do pH na atividade da poliuretase de *S. liquefaciens* L135 é mostrado na figura 13. Em pH 8,0, a poliuretase exibiu atividade máxima e, sendo assim, o valor de absorbância nesse pH foi considerado como 100% (Figura 13). A atividade residual em valores de pH baixos foi em torno de 10% da atividade máxima (Figura 13) e provavelmente, isto se deve ao fato de que, segundo Kademi et al. (2000), os ésteres de *p*-nitrofenílicos não são absorvidos nestes valores de pH.

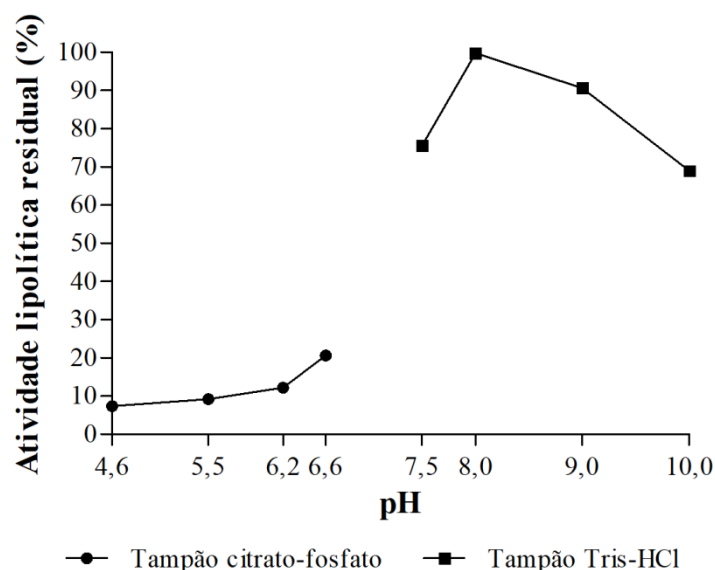


Figura 13. Efeito do pH sobre a atividade da poliuretase de *S. liquefaciens* L135.

Os dados da poliuretase de *S. liquefaciens* L135 encontrados corroboram os resultados da literatura, reforçando o potencial de atividade dessa enzima em pH alcalino. Abdou (2003) verificou que o pH ótimo de uma lipase de *S. marcescens*, também psicotrófica isolada do leite cru, estava entre 8,0 e 9,0. O valor de pH 8,0 também foi registrado como ótimo para a lipase de *P. aeruginosa* (PENG; LIN; WEI, 2010; SYED et al., 2010), de *S. marcescens* (MATSUMAE; SHIBATANI, 1994; ZAKI; SAEED, 2012) e de *Acinetobacter* sp. AU07 (GURURAJ et al., 2016). Eddehech et al. (2019) mostraram que a lipase de *Serratia* sp. W3 exibiu atividade em uma ampla faixa de pH com ótimo em 9 e, em pH 10,5, a enzima manteve mais de 60% de sua atividade máxima. *Serratia* sp. E13, que produz a lipase de alta similaridade com a poliuretase homóloga sequenciada neste estudo, e foi isolada de solo, apresentou alta estabilidade a pH 8,0 (ŠIEKŠTELĚ et al., 2015). García-Silvera et al. (2018) relataram que uma lipase de *S. marcescens* foi mais ativa em pH 8 e, em pH 9 e 10 manteve cerca de, 72 e 69% da atividade, respectivamente.

A carga e energia livre de dobramento da poliuretase em diferentes valores de pH obtidos *in silico* são mostrados na Tabela 7. O pI da estrutura modelada da poliuretase de *S. liquefaciens* não dobrada é igual a 4,2 enquanto que, da estrutura dobrada é igual a 4,39 (Tabela 7). O pH de menor energia livre de dobramento da estrutura modelada da poliuretase de *S. liquefaciens* é igual a 3,8 (Tabela 7). Dependendo do número relativo de

resíduos carregados negativa ou positivamente, as proteínas assumem uma carga líquida negativa ou uma carga líquida positiva. O pH no qual a carga líquida é zero é chamado de ponto isoelétrico (pI), que é estimado a partir da composição dos aminoácidos e dos valores de pK_a de grupos ionizáveis, usando a equação de Henderson-Hasselbach (DAMODARAN, KIRK PARKIN e FENNEMA 2010).

Tabela 7. Carga e energia livre de dobramento da poliuretase homóloga de *S. liquefaciens* L135 modelada *in silico*, em diferentes valores de pH, utilizando o programa PDB2PQR Server versão 2.1.1 com a extensão PROPKA versão 3.0

pH	Carga da proteína não dobrada	Carga da proteína dobrada	Energia livre de dobramento (kcal/mol) a 25 °C
0,0	43,99	43,95	57,53
1,0	43,91	43,53	57,32
2,0	43,08	40,64	55,73
3,0	36,02	30,23	49,83
3,8*	-	-	45,50
4,0	7,02	9,29	45,72
4,2**	0,00	-	-
4,39***	-	0,00	-
5,0	-20,52	-13,37	54,10
6,0	-29,96	-27,58	60,50
7,0	-37,14	-35,28	63,00
8,0	-40,42	-39,06	65,30
9,0	-43,61	-42,08	66,93
10,0	-57,35	-48,22	72,97
11,0	-76,89	-59,53	92,27
12,0	-85,33	-69,72	115,19
13,0	-92,80	-80,99	134,14
14,0	-95,59	-89,07	146,42

*O pH de menor energia livre de dobramento da estrutura modelada da poliuretase de *S. liquefaciens*;

**O pI da estrutura modelada da poliuretase de *S. liquefaciens* não dobrada é igual a 4,2,

***O pI da estrutura modelada da poliuretase de *S. liquefaciens* dobrada é igual a 4,39.

Os potenciais eletrostáticos determinados *in silico* na superfície molecular da poliuretase, em função do pH, são mostrados na figura 14.

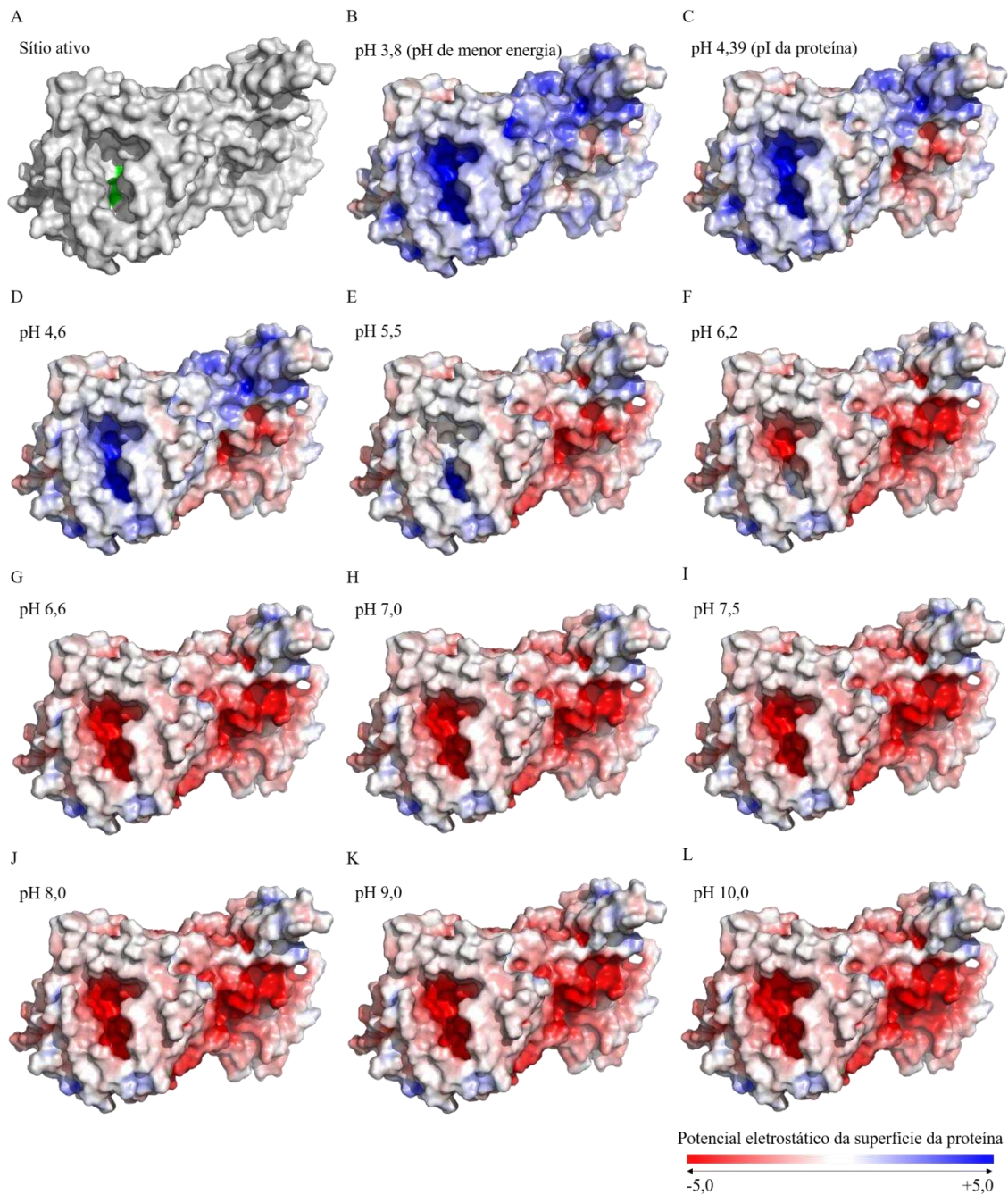


Figura 14. Potencial eletrostático de superfície da poliuretânase modelada em diferentes valores de pH *in silico*, utilizando o programa PDB2PQR *Server* versão 2.1.1 e, em seguida, o programa PyMOL com a extensão APBS *Electrostatics*. (A) Estrutura modelada da poliuretânase apresentada na forma de superfície com destaque para o sítio ativo (B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) variações do potencial eletrostático de superfície da poliuretânase modelada em valores de pH de 3,8 a 10,0. Verde = *nucleophilic elbow*, vermelho = regiões da proteína com potencial eletrostático de superfície negativo (-5,0); azul = regiões da proteína com potencial eletrostático de superfície positivo (+5,0); branco = regiões da proteína com potencial eletrostático de superfície neutro (0,0).

Nas faixas de pH onde a atividade mais alta da poliuretase foi determinada (Figura 12), a região do *nucleophilic elbow* exibe potencial eletrostático muito negativo para suportar a atividade. Assim, a superfície da proteína e o sítio catalítico estão em ótimo estado para suportar a ligação do substrato, estabilizando o estado de transição, assim como aumentando a taxa de liberação do produto. Quando pH do meio é alterado para condições mais ácidas, observa-se um potencial cada vez mais positivo e, ao mudar o para condições mais básicas, o potencial do *nucleophilic elbow* torna-se cada vez mais negativo. Pode-se observar na figura 14 que no pH 6,6 (pH do leite) a região do *nucleophilic elbow* exibe potencial eletrostático muito negativo, sugerindo que a poliuretase tem capacidade de hidrolisar os triacilgliceróis presente no leite, aumentando a concentração de ácidos graxos no meio e consequentemente, podendo resultar em sabores e odores desagradáveis no leite e derivados.

4.7.2 Determinação da temperatura ótima

Os efeitos de diferentes temperaturas na atividade da poliuretase de *S. liquefaciens* L135 são mostrados na Figura 15. A poliuretase exibiu atividade máxima em 30 °C e, nas temperaturas de 4, 7, 17, 25, 37, 45 e 55 °C manteve cerca de, 21, 43, 68, 87, 97, 70 e 14% da atividade (Figura 15). Em temperatura de refrigeração de 7 °C, a poliuretase manteve 43% de atividade residual e este resultado reforça o potencial lipolítico de *S. liquefaciens* L135 em baixas temperaturas. Sob refrigeração, essa enzima consegue exercer a função catalítica, hidrolisando ésteres e liberando ácidos graxos nos produtos lácteos que pode resultar em prejuízos na qualidade do leite durante o armazenamento a frio.

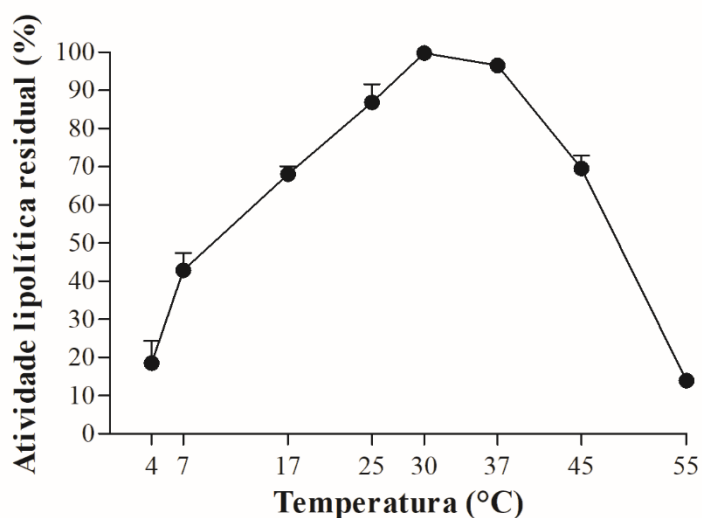


Figura 15. Efeito de diferentes temperaturas sobre a atividade da poliuretase de *S. liquefaciens* L135

4.7.3 Efeito de íons metálicos

O efeito de diferentes íons (Ba^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} e Ca^{2+}) foi testado na atividade da poliuretânase de *S. liquefaciens* L135 e são mostrados na Tabela 8. Na concentração de 1 mM, os íons avaliados exerceram pouca ou nenhuma influência sobre a atividade da poliuretânase, sendo mantida mais de 80% da atividade determinada na ausência destes íons. Exceção é feita para os íons Fe^{2+} e Zn^{2+} pois, na presença desses, a atividade da poliuretânase foi de 50 e 48% quando comparada ao controle, respectivamente. Zhao et al. (2008) obtiveram resultado semelhante com a poliuretânase de *S. marcescens* ECU1010 com grau de inibição de 69 e 56%, respectivamente, na presença dos íons Fe^{2+} e Zn^{2+} na concentração de 1 mM. Quando em concentração de 10 mM, os íons metálicos Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} e Mn^{2+} resultaram numa atividade residual de 3, 23, 49, 52, 52 e 63%, respectivamente e podem ser considerados inibidores. Os dados de inibição severa pelos íons Zn^{2+} e Cu^{2+} estão de acordo com os apresentados por Zaki e Saeed (2012) e Eddehech et al. (2019) para as lipases de *Serratia* spp.

Os resultados também indicaram que, na presença de 10 mM de Ca^{2+} e Ba^{2+} , a atividade da poliuretânase de *S. liquefaciens* L135 foi aumentada quando comparada ao controle. Algumas enzimas requerem cofatores para manter as estruturas estáveis e ativas; logo, esses íons podem exercer essa função. Uttatree, Winayanuwattikun e Charoenpanich (2010) relataram que a atividade lipolítica é aumentada com aumento no raio iônico do cátion e isso pôde ser confirmado pelos íons Ca^{2+} e Ba^{2+} , que apresentam, respectivamente, raio iônico de 0,99 e 1,34 Å e estimularam a atividade da poliuretânase de *S. liquefaciens* L135. Peng, Lin e Wei (2010), Zaki e Saeed (2012), Eddehech et al. (2019) e Priyanka et al. (2019) mostraram que o íon Ca^{2+} é estimulador da atividade de lipases. Em contrapartida, o íon Zn^{2+} , na concentração de 10 mM e que apresenta um raio iônico menor (0,74 Å), inibiu a atividade da poliuretânase de *S. liquefaciens* L135. Entretanto, o íon Mg^{2+} , que também possui raio iônico menor (0,72 Å), não inibiu a atividade da poliuretânase, e este fato pode ser em razão deste íon atuar fazendo uma ponte salina que conserva a histidina no sítio ativo, estabilizando e mantendo a conformação rígida da enzima. Syed et al. (2010) verificaram que os íons Ca^{2+} e Ba^{2+} estimularam a atividade de lipase de *P. aeruginosa* BN-1, enquanto os outros íons testados diminuíram ou não tiveram influência na atividade lipolítica. Parwata, Asyari e Hertadi (2014) também mostraram que a adição de Ba^{2+} aumentou a atividade da lipase de *Pseudomonas stutzeri* em cerca de 10%.

Tabela 8. Efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade da poliuretânase de *S. liquefaciens* L135

Íon	Concentração final (mM)	Atividade residual (%)*
Ca ²⁺	1	93 ± 4,51
	10	107 ± 1,52
Mg ²⁺	1	90 ± 4,04
	10	97 ± 1,53
Ba ²⁺	1	92 ± 5,19
	10	104 ± 3,51
Mn ²⁺	1	80 ± 3,78
	10	63 ± 6,08
Cu ²⁺	1	82 ± 2,64
	10	23 ± 4,51
Co ²⁺	1	84 ± 5,13
	10	52 ± 3,60
Ni ²⁺	1	94 ± 2,08
	10	52 ± 5,03
Fe ²⁺	1	50 ± 3,05
	10	49 ± 5,13
Zn ²⁺	1	52 ± 4,04
	10	3 ± 2,08

* A atividade residual é dada em porcentagem (%) e comparada com o controle sem íons (100 ± 1). Os valores de atividade residual são expressos como média de triplicata ± SD

4.7.4 Efeito de reagentes e modificadores

A incubação da poliuretânase com os agentes redutores DTT e β-mercaptoetanol, na concentração de 1 e 5 mM não interferiu na atividade da poliuretânase de *S. liquefaciens* L135 (Tabela 9). Estes resultados confirmam que a poliuretânase faz parte da subfamília I.3, ou seja, a proteína não possui resíduos de cisteína na sua estrutura. Matsumae e Shibatani (1994) mostraram que DTT não influenciou na atividade de lipase de *S. marcescens*. Syed et al. (2010) também verificaram que DTT e β-mercaptoetanol não tiveram nenhum efeito na atividade da lipase de *P. aeruginosa* BN-1, o que pode ser explicado pelo fato das lipases não conterem grupos tiol.

Tabela 9. Efeito de diferentes inibidores na atividade da poliuretânase de *S. liquefaciens* L135

Inibidor	Concentração final (mM)	Atividade residual (%)*
β-mercaptoetanol	1	93 ± 4,16
	5	95 ± 7,51
DTT	1	99 ± 2,31
	5	98 ± 0,58
EDTA	1	46 ± 6,35
	5	29 ± 1,73
Triton X-100	1	62 ± 7,81
	5	15 ± 2,00
Tween 80	1	15 ± 2,51
	5	7 ± 2,08
SDS	1	116 ± 4,00
	5	111 ± 7,63
PMSF	0,01	95 ± 1,73
	0,1	83 ± 4,16
	1	39 ± 3,79
	5	15 ± 2,08
	10	1 ± 0,58
DEPC	0,01	98 ± 3,60
	0,1	91 ± 0,57
	1	46 ± 3,60
	5	19 ± 3,05
	10	3 ± 0,57

* A atividade residual é dada em porcentagem (%) e comparada com o controle sem inibidores (100 ± 1); DTT (ditiotreitól), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), SDS (dodecil sulfato de sódio), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e DEPC (dietil pirocarbonato). Os valores de atividade residual são expressos como média de triplicata ± SD

A incubação na presença do agente quelante EDTA na concentração de 1 e 5 mM resultou na redução da atividade em 54 e 71%, respectivamente, sugerindo que a poliuretanase pode ser uma metaloenzima, ou seja, necessita de íon metálico bivalente em seu sítio ativo para estabilizar a estrutura e manter a atividade. Lipases de *S. marcescens* (ZHAO et al., 2008), *Acinetobacter baylyi* (UTTATREE; WINAYANUWATTIKUN; CHAROENPANICH, 2010), *Pseudomonas reinekei* (PRIYANKA et al., 2019) e *P. aeruginosa* CS-2 (PENG; LIN; WEI, 2010) foram reconhecidas como metaloenzimas.

Foi observado que na concentração de 1 e 5 mM de SDS, a atividade da poliuretanase de *S. liquefaciens* L135 foi aumentada (Tabela 9). Esse fato pode ser explicado pela concentração de SDS utilizada, uma vez que, abaixo da concentração micelar crítica do SDS (8,2 mM), ele liga-se à tampa da lipase e ativa-a por mudanças conformacionais e, portanto requer menos ativação interfacial contudo, facilita a acessibilidade do sítio ativo pelo substrato (PRIYANKA et al., 2019). No entanto, os surfactantes não iônicos Triton X-100 e Tween-80, inibiram a atividade da poliuretanase quando aumentados de 1 para 5 mM (Tabela 9). Mogensen, Sehgal e Otzen (2005) descreveram que com o aumento da concentração de surfactante, o grau de inibição da lipase de *Thermomyces lanuginosus* é aumentado e isso acontece devido ao caráter anfipático dos detergentes, com caudas hidrofóbicas que se assemelham aos substratos naturais e se ligam à lipase formando um complexo enzima-detergente. A inibição ocorre quando concentrações elevadas de detergente se ligam ao sítio ativo, bloqueando o acesso do substrato (MOGENSEN; SEHGAL; OTZEN, 2005). Zhao et al. (2008) relataram que a lipase de *S. marcescens* ECU1010 também foi inibida severamente por Triton X-100.

Uma vez que os resíduos de serina e histidina fazem parte da tríade catalítica, foi feita a confirmação da função destes resíduos na atividade da enzima com concentrações de PMSF e DEPC variando entre 0,01 e 10 mM. Foi possível observar que, com o aumento na concentração desses inibidores, a atividade da poliuretanase de *S. liquefaciens* L135 diminuiu. A atividade da poliuretanase reduziu 61 e 54% quando incubada com 1 mM de PMSF e DEPC, respectivamente (Tabela 9). Esses dados confirmam que os resíduos serina e histidina são essenciais para a função da enzima. Gururaj et al. (2016) também verificaram que PMSF na concentração de 10 mM inibiu a lipase de *Acinetobacter* sp. AU07. A inibição por EDTA, Zn^{2+} , PMSF e TritonX-100 e o aumento na atividade lipolítica na presença de Ca^{2+} , corrobora os dados encontrados para *Serratia* sp. (Šiekštelė et al. 2015).

5 CONCLUSÃO

S. liquefaciens L135 apresentou capacidade de produzir enzima lipolítica em baixas temperaturas e não foi inativada durante os tratamentos térmicos simulados usados pela indústria laticinista. Estes resultados sugerem que *S. liquefaciens* L135 apresenta alto potencial deteriorador lipolítico do leite e seus derivados tratados termicamente. Por LC-MS/MS a enzima lipolítica foi identificada como poliuretanase, apresentando o domínio conservado de lipase e massa molecular de 65 kDa. A poliuretanase apresentou termoestabilidade significativa quando comparada a outros trabalhos e, além disso, apresentou melhor atividade residual em pH alcalino. A poliuretanase foi caracterizada bioquímica e físico-quimicamente afim de entender melhor a sua estrutura, possibilitando que estudos futuros elucidem mecanismos de inibição desta enzima na indústria laticinista e permitam direcionar esta enzima para possíveis aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ABDOU, A. M. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 127-132.
- ABOL FOTOUH, D. M., BAYOUMI, R. A., & HASSAN, M. A. (2016). Production of thermoalkaliphilic lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and application in leather industry. *Enzyme Research*, 2016, 1-9.
- ADAMS, D. M. & BRAWLEY, T. G. (1981). Factors influencing the activity of a heat-resistant lipase of *Pseudomonas*. *Journal of Food Science*, 46 (3), 677–680.
- AKANBI, T. O., KAMARUZAMAN, A. L., ABU BAKAR, F., SHEIKH, A., RADU, S., & ABDUL, M. (2010). Highly thermostable extracellular lipase-producing *Bacillus* strain isolated from a Malaysian hot spring and identified using 16S rRNA gene sequencing. *International Food Research Journal*, 17(1), 45-53.
- AKATSUKA, H., KAWAI, E., OMORI, K., & SHIBATANI, T. (1995). The three genes lipB, lipC, and lipD involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide. *Journal of Bacteriology*, 177(22), 6381-6389.
- AKATSUKA, H., BINET, R., KAWAI, E., WANDERSMAN, C., & OMORI, K. (1997). Lipase secretion by bacterial hybrid ATP-binding cassette exporters: molecular recognition of the LipBCD, PrtDEF, and HasDEF exporters. *Journal of Bacteriology*, 179(15), 4754-4760.
- ALLEN, A. B., HILLIARD, N. P., & HOWARD, G. T. (1999). Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43(1-2), 37-41.
- ALMEIDA, F. A., PINTO, U. M., & VANETTI, M. C. D. (2016). Novel insights from molecular docking of SdiA from *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* with quorum sensing and quorum quenching molecules. *Microbial Pathogenesis*, 99, 178-190.
- ANDERSSON, R. E., HEDLUND, C. B., & JONSSON, U. (1979). Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 62(3), 361-367.
- ANOBOM, C. D., PINHEIRO, A. S., DE-ANDRADE, R. A., AGUIEIRAS, E. C., ANDRADE, G. C., MOURA, M. V., & FREIRE, D. M. (2014). From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*, 2014, 1-11.
- ANTHONSEN, H. W., BAPTISTA, A., DRABLØS, F., MARTEL, P., PETERSEN, S. B., SEBASTIÃO, M., & VAZ, L. (1995). Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. *Biotechnology Annual Review*. Elsevier, 1, 315-371.
- ARCURI, E. F., DA SILVA, P. D. L., BRITO, M. A. V. P., BRITO, J. R. F., LANGE, C. C., & MAGALHÃES, M. M. D. A. (2008). Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, 38(8), 2250-2255.

- ARGOV-ARGAMAN, N., MIDA, K., COHEN, B. C., VISKER, M., & HETTINGA, K. (2013). Milk fat content and DGAT1 genotype determine lipid composition of the milk fat globule membrane. *PLoS One*, 8(7), 1-8.
- ARPIGNY, J. L., & JAEGER, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, 343(1), 177-183.
- BAGLINIÈRE, F., TANGUY, G., SALGADO, R. L., JARDIN, J., ROUSSEAU, F., ROBERT, B., & GAUCHERON, F. (2017a). Ser2 from *Serratia liquefaciens* L53: A new heat stable protease able to destabilize UHT milk during its storage. *Food Chemistry*, 229, 104-110.
- BAGLINIÈRE, F., SALGADO, R. L., SALGADO, C. A., & VANETTI, M. C. D. (2017b). Biochemical characterization of an extracellular heat-stable protease from *Serratia liquefaciens* isolated from raw milk. *Journal of Food Science*, 82(4), 952-959.
- BIUNDO, A., HROMIC, A., PAVKOV-KELLER, T., GRUBER, K., QUARTINELLO, F., HAERNVALL, K., & GUEBITZ, G. M. (2016). Characterization of a poly (butylene adipate-co-terephthalate)-hydrolyzing lipase from *Pelosinus fermentans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1753-1764.
- BINET, R., LÉTOFFÉ, S., GHIGO, J. M., DELEPELAIRE, P., & WANDERSMAN, C. (1997). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters—a review. *Gene*, 192(1), 7-11.
- BORAN, R., & UGUR, A. (2010). Partial purification and characterization of the organic solvent-tolerant lipase produced by *Pseudomonas fluorescens* RB02-3 isolated from milk. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 40(4), 229-241.
- BORRELLI, G., & TRONO, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20774-20840.
- CASTILLA, A., PANIZZA, P., RODRÍGUEZ, D., BONINO, L., DÍAZ, P., IRAZOQUI, G., & GIORDANO, S. R. (2017). A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII). *Enzyme and Microbial Technology*, 98, 86-95.
- CHAKRABORTY, K., & PAULRAJ, R. (2009). Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MTCC 2421. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3859-3866.
- CHEN, L. D. R. M., DANIEL, R. M., & COOLBEAR, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13(4), 255-275.
- CHRISTENSEN, A. B., RIEDEL, K., EBERL, L., FLODGAARD, L. R., MOLIN, S., GRAM, L., & GIVSKOV, M. (2003). Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. *Microbiology*, 149(2), 471-483.

- COSTA, C. Z., ALBUQUERQUE, M. C. C., BRUM, M. C., & CASTRO, A. M. (2015). Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. *Química Nova*, 38(2), 259-267.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K. L., & FENNEMA, O. R. (2008). *FENNEMA Química de los Alimentos*. 265-270
- DECIMO, M., MORANDI, S., SILVETTI, T., & BRASCA, M. (2014). Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science*, 79(10), M2081-M2090.
- DECIMO, M., CABEZA, M. C., ORDÓÑEZ, J. A., DE NONI, I., & BRASCA, M. (2018). Volatile organic compounds associated with milk spoilage by psychrotrophic bacteria. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 593-600.
- DEETH, H. C. (2006). Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, 16(6), 555-562.
- DEETH, H. C. (2011). Lipolysis and Hydrolytic Rancidity. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd Ed, Oxford: Academic Press.721-726.
- DELEPELAIRE, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694(1-3), 149-161.
- DUMONT, J. P., DELESPAUL, G., MIGUOT, B., & ADDA, J. (1977). Influence des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâte molle. *Le Lait*, 57(569-570), 619-630.
- EDDEHECH, A., ZIED, Z., ALOUI, F., SMICHI, N., NOIRIEL, A., ABOUSALHAM, A., & GARGOURI, Y. (2019). Production, purification and biochemical characterization of a thermoactive, alkaline lipase from a newly isolated *Serratia* sp. W3 Tunisian strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 792-800.
- FOX, P. F., & STEPANIAK, L. (1983). Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36. *Journal of Dairy Research*, 50(1), 77-89.
- FURTADO, M. M. (2005). Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. Fonte comunicações e editora. 176 páginas.
- GARCÍA-SILVERA, E. E., MARTÍNEZ-MORALES, F., BERTRAND, B., MORALES-GUZMÁN, D., ROSAS-GALVÁN, N. S., LEÓN-RODRÍGUEZ, R., & TREJO-HERNÁNDEZ, M. R. (2018). Production and application of a thermostable lipase from *Serratia marcescens* in detergent formulation and biodiesel production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(2), 156-172.
- GÖKBULUT, A. A., & ARSLANOĞLU, A. (2013). Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase from psychrotolerant *Pseudomonas fluorescens* KE38. *Turkish Journal of Biology*, 37(5), 538-546.

- GRESTI, J., BUGAUT, M., MANIONGUI, C., & BEZARD, J. (1993). Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat. *Journal of Dairy Science*, 76(7), 1850-1869.
- GUPTA, C., PRAKASH, D., & GUPTA, S. (2015). Biotechnological approach to microbial based perfumes and flavours. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 3(1), 1-8.
- GUPTA, R., GUPTA, N., & RATHI, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763-781.
- GURURAJ, P., RAMALINGAM, S., DEVI, G. N., & GAUTAM, P. (2016). Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 647-657.
- HANTSIS-ZACHAROV, E., & HALPERN, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7162-7168.
- HASAN, F., SHAH, A. A., & HAMEED, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251.
- HASAN, F., SHAH, A. A., & HAMEED, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 27(6), 782-798.
- HOWARD, G. T., NORTON, W. N., & BURKS, T. (2012). Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation*, 23(4), 561-573.
- JAEGER, K. E., DIJKSTRA, B. W., & REETZ, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 315-351.
- JAEGER, K. E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M., & MISSET, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(1), 29-63.
- JAVED, S., AZEEM, F., HUSSAIN, S., RASUL, I., SIDDIQUE, M. H., RIAZ, M., & NADEEM, H. (2018). Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132, 23-34.
- KADEMI, A., AÏT-ABDELKADER, N., FAKHREDDINE, L., & BARATTI, J. C. (2000). Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(4), 395-401.
- KANWAR, S. S., GHAZI, I. A., CHIMNI, S. S., JOSHI, G. K., RAO, G. V., KAUSHAL, R. K., & PUNJ, V. (2006). Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metalloproteinase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. *Protein Expression and Purification*, 46(2), 421-428.

- KAPOOR, M., & GUPTA, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569.
- KIM, H. K., PARK, S. Y., LEE, J. K., & OH, T. K. (1998). Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(1), 66-71.
- KOKA, R., & WEIMER, B. C. (2001). Influence of growth conditions on heat-stable phospholipase activity in *Pseudomonas*. *Journal of Dairy Research*, 68(1), 109-116.
- KUMURA, H., MIKAWA, K., & SAITO, Z. (1993). Influence of milk proteins on the thermostability of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* 33. *Journal of Dairy Science*, 76(8), 2164-2167.
- KUNCOVA, G., SZILVA, J., HETFLEJS, J., & SABATA, S. (2003). Catalysis in organic solvents with lipase immobilized by sol-gel technique. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 26(1-3), 1183-1187.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.
- LAW, B. A., SHARPE, M. E., & CHAPMAN, H. R. (1976). The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 43(3), 459-468.
- LIU, Y., CHEN, D., YAN, Y., PENG, C., & XU, L. (2011). Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. *Bioresource Technology*, 102(22), 10414-10418.
- LOPEZ, C., BRIARD-BION, V., MÉNARD, O., BEAUCHER, E., ROUSSEAU, F., FAUQUANT, J., & ROBERT, B. (2011). Fat globules selected from whole milk according to their size: different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry*, 125(2), 355-368.
- LOPEZ, C., CAUTY, C., & GUYOMARC'H, F. (2015). Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy Science & Technology*, 95(6), 863-893.
- MA, B., ZHANG, K., HENDRIE, C., LIANG, C., LI, M., DOHERTY-KIRBY, A., & LAJOIE, G. (2003). PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(20), 2337-2342.
- MACHADO, S. G., DA SILVA, F. L., BAZZOLLI, D. M., HEYNDRIKX, M., COSTA, P. M. D. A., & VANETTI, M. C. D. (2015). *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. *Journal of Food Science*, 80(8), M1842-M1849.
- MACHADO, S. G., HEYNDRIKX, M., DE BLOCK, J., DEVREESE, B., VANDENBERGHE, I., VANETTI, M. C. D., & VAN COILLIE, E. (2016). Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 65-71.

- MARTINS, M. L., PINTO, U. M., RIEDEL, K., & VANETTI, M. C. (2015). Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 207-217.
- MASOMIAN, M., RAHMAN, R. N. Z. R. A., SALLEH, A. B., & BASRI, M. (2013). A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ. *Process Biochemistry*, 48(1), 169-175.
- MATSUMAE, H., & SHIBATANI, T. (1994). Purification and characterization of the lipase from *Serratia marcescens* Sr41 8000 responsible for asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid esters. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77(2), 152-158.
- MEIER, R., DREPPER, T., SVENSSON, V., JAEGER, K. E., & BAUMANN, U. (2007). A calcium-gated lid and a large β -roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31477-31483.
- MESSIAS, J. M., COSTA, B. Z. D., NASCIMENTO, V. M. G. D., GIESE, E. C., DEKKER, R. F., & BARBOSA, A. D. M. (2011). Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina. Ciências Exatas e Tecnológicas*, 213-234.
- MICHALSKI, M. C., OLLIVON, M., BRIARD, V., LECONTE, N., & LOPEZ, C. (2004). Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior. *Chemistry and Physics of Lipids*, 132(2), 247-261.
- MOGENSEN, J. E., SEHGAL, P., & OTZEN, D. E. (2005). Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. *Biochemistry*, 44(5), 1719-1730.
- NAGARAJAN, S. (2012). New tools for exploring “old friends—microbial lipases”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(5), 1163-1196.
- NEVES PETERSEN, M. T., FOJAN, P., & PETERSEN, S. B. (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology*, 85(2), 115-147.
- NIELSEN H. (2017) Predicting secretory proteins with SignalP. In: Kihara D. (eds) *Protein Function Prediction*. Methods in Molecular Biology, 1611 59-73.
- NÖRNBERG, M. F., FRIEDRICH, R. S., WEISS, R. D., TONDO, E. C., & BRANDELLI, A. (2010). Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 41-46.
- PARWATA, I. P., ASYARI, M., & HERTADI, R. (2014). Organic solvent-stable lipase from moderate halophilic bacteria *Pseudomonas stutzeri* isolated from the mud crater of Bleduk Kuwu, Central Java, Indonesia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(1), 31-40.
- PENG, R., LIN, J., & WEI, D. (2010). Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* CS-2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(3), 733-743.

- PETERSEN, T. N., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G., & NIELSEN, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785.
- PRIYANKA, P., KINSELLA, G., HENEHAN, G. T., & RYAN, B. J. (2019). Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. *Protein Expression and Purification*, 153, 121-130.
- RAMAKRISHNAN, V., BALAKRISHNAN, B., RAI, A. K., NARAYAN, B., & HALAMI, P. M. (2012). Concomitant production of lipase, protease and enterocin by *Enterococcus faecium* NCIM5363 and *Enterococcus durans* NCIM5427 isolated from fish processing waste. *International Aquatic Research*, 4(1), 14.
- RAMANI, K., CHOCKALINGAM, E., & SEKARAN, G. (2010). Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(5), 531-535.
- RHEE, J. K., AHN, D. G., KIM, Y. G., & OH, J. W. (2005). New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 817-825.
- RIBEIRO, B. D., CASTRO, A. M. D., COELHO, M. A. Z., & FREIRE, D. M. G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, 2011, 1-16.
- RIOS, N. S., PINHEIRO, B. B., PINHEIRO, M. P., BEZERRA, R. M., DOS SANTOS, J. C. S., & GONÇALVES, L. R. B. (2018). Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: sources, properties and applications. *Process Biochemistry*, 75, 99-120.
- ROSENAU, F., & JAEGER, K. E. (2000). Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie*, 82(11), 1023-1032.
- ROWE, L., & HOWARD, G. T. (2002). Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(1), 33-40.
- RUIZ, C., MAIN, T., HILLIARD, N. P., & HOWARD, G. T. (1999). Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43(1-2), 43-47.
- SANGEETHA, R., ARULPANDI, I., & GEETHA, A. (2011). Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. *Research Journal of Microbiology*, 6(1), 1-24.
- SARANYA, P., KUMARI, H. S., JOTHIESWARI, M., RAO, B. P., & SEKARAN, G. (2014). Novel extremely acidic lipases produced from *Bacillus* species using oil substrates. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(1), 9-15.
- SAXENA, R. K., SHEORAN, A., GIRI, B., & DAVIDSON, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 1-18.

- SHAH, Z., KRUMHOLZ, L., AKTAS, D. F., HASAN, F., KHATTAK, M., & SHAH, A. A. (2013). Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75. *Biodegradation*, 24(6), 865-877.
- SHARMA, P., SHARMA, N., PATHANIA, S., & HANDA, S. (2017). Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 369-377.
- SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLI, J., OLSEN, J. V., & MANN, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6), 2856.
- SHIRAZI, N. H., RANJBAR, B., KHAJEH, K., & MOGHADAM, T. T. (2013). Structure–function analysis of a new bacterial lipase: effect of local structure reorganization on lipase activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 180-185.
- ŠIEKŠTELĖ, R., VETEIKYTĖ, A., TVASKA, B., & MATIJOŠYTĖ, I. (2015). Yeast *Kluyveromyces lactis* as host for expression of the bacterial lipase: cloning and adaptation of the new lipase gene from *Serratia* sp. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(10), 1309-1317.
- SOLIMAN, N. A., KNOLL, M., ABDEL-FATTAH, Y. R., SCHMID, R. D., & LANGE, S. (2007). Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. *Process Biochemistry*, 42(7), 1090-1100.
- SON, M., MOON, Y., OH, M. J., HAN, S. B., PARK, K. H., KIM, J. G., & AHN, J. H. (2012). Lipase and protease double deletion mutant of *Pseudomonas fluorescens* suitable for extracellular protein production. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8454-8462.
- SØRHAUG, T., & STEPANIAK, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 8(2), 35-41.
- STERN, R. V., & HOWARD, G. T. (2000). The polyester polyurethanase gene (pueA) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase. *FEMS Microbiology Letters*, 185(2), 163-168.
- SYED, M. N., IQBAL, S., BANO, S., KHAN, A. B., ALI-UL-QADER, S., & AZHAR, A. (2010). Purification and characterization of 60 kD lipase linked with chaperonin from *Pseudomonas aeruginosa* BN-1. *African Journal of Biotechnology*, 9(45), 7724-7732.
- RIOS, N. S., PINHEIRO, B. B., PINHEIRO, M. P., BEZERRA, R. M., DOS SANTOS, J. C. S., & GONÇALVES, L. R. B. (2018). Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: sources, properties and applications. *Process biochemistry*, 75, 99-120.
- TAVANO, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.

- UTTATREE, S., WINAYANUWATTIKUN, P., & CHAROENPANICH, J. (2010). Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(5), 1362-1376.
- VITHANAGE, N. R., DISSANAYAKE, M., BOLGE, G., PALOMBO, E. A., YEAGER, T. R., & DATTA, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, 57, 80-90.
- YANG, W., HE, Y., XU, L., ZHANG, H., & YAN, Y. (2016). A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 126, 76-89.
- YELE, V. U., & DESAI, K. (2015). A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri*; optimization of media and production conditions using statistical methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(2), 855-869.
- ZAKI, N. H., & SAEED, S. E. (2012). Production, purification and characterization of extra cellular lipase from *Serratia marcescens* and its potential activity for hydrolysis of edible oils. *Journal of Al-Nahrain University-Science*, 15(1), 94-102.
- ZHANG, A., GAO, R., DIAO, N., XIE, G., GAO, G., & CAO, S. (2009). Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(2-3), 78-84.
- ZHAO, L. L., XU, J. H., ZHAO, J., PAN, J., & WANG, Z. L. (2008). Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. *Process Biochemistry*, 43(6), 626-633.