

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

EQB738 – ENGENHARIA ENZIMÁTICA

A 3D orange stick figure is shown balancing on a thin, curved wire. The figure is in a dynamic pose, with one arm extended forward and the other back, maintaining balance. The background is white with a faint, curved line suggesting the wire's path.

Estabilidade e Estabilização Enzimática

Prof Bernardo Dias

Introdução

Atividade Enzimática → Medida da velocidade inicial da reação sob condições determinadas

Estabilidade Enzimática → Capacidade das enzimas de ter sua atividade catalítica sob diferentes condições de reação ao longo do tempo → associada a sua estrutura 3D

Minimização favorável da área hidrofóbica +
Redução desfavorável dos estados conformacionais sobre o enovelamento = **Estabilidade**.

Introdução

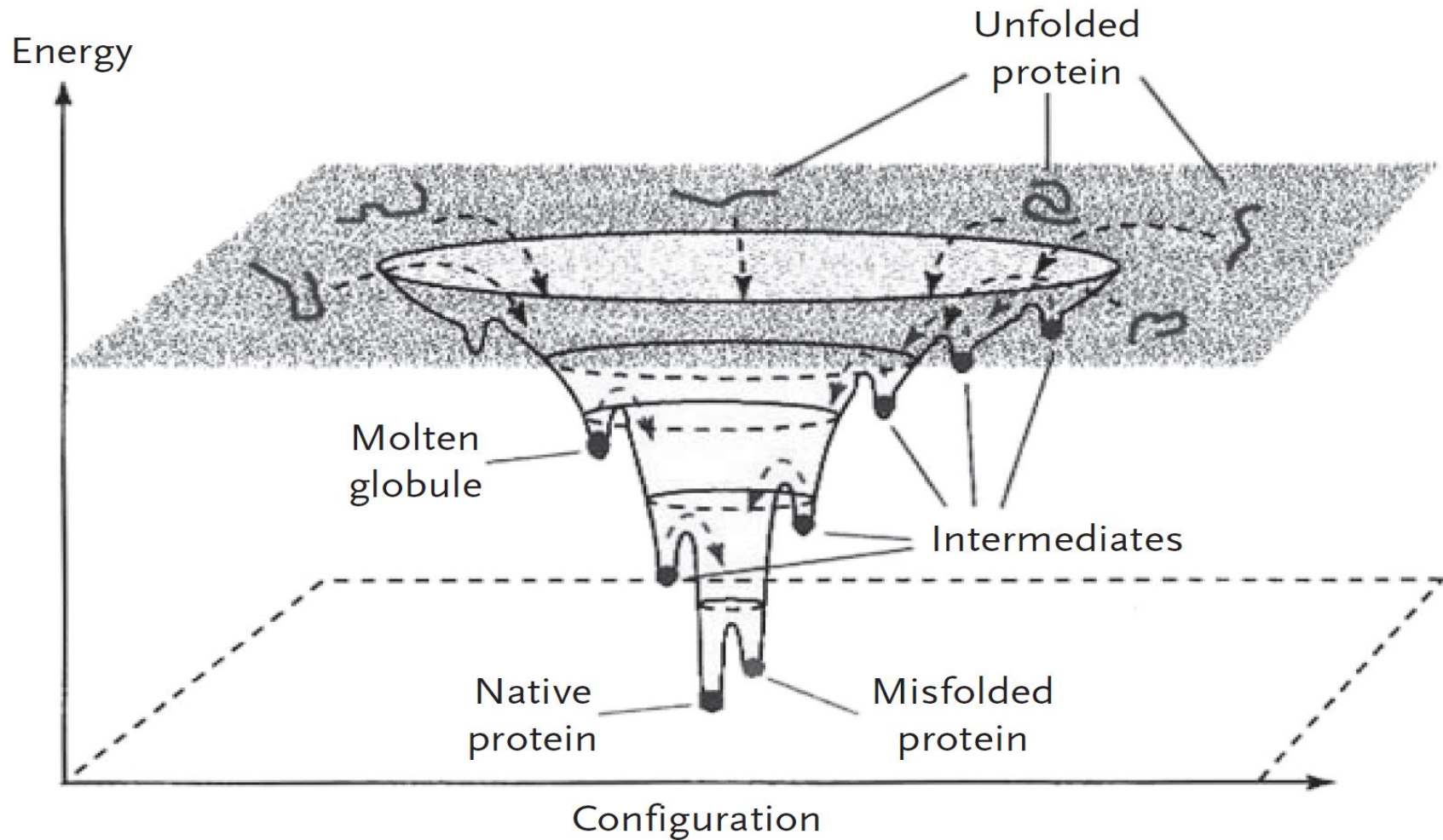
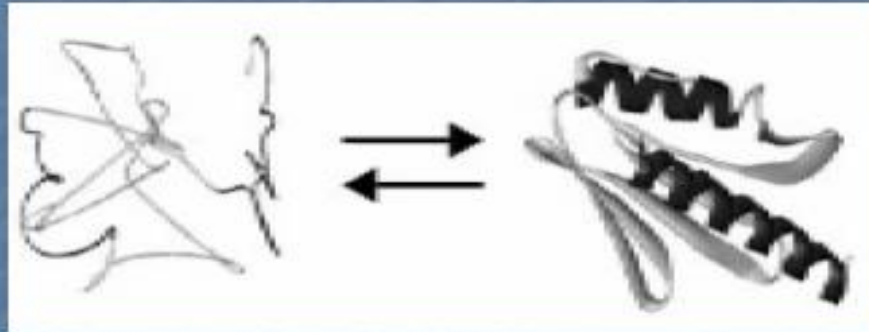


Figure 17.1 Schematic diagram of a folding energy landscape (Radford, 2000; from Schultz, 2000).

Aspectos Termodinâmicos

Estabilidade das Enzimas



Desnaturado



Nativo

**Estado termodinamicamente mais
estável em condições fisiológicas**

Os estados de equilíbrio da desnaturação das proteínas consistem na alteração das propriedades físico químicas da solução de modo a deslocar o equilíbrio – valor da constante de equilíbrio.

Aspectos Termodinâmicos

$$C_p(U) - C_p(N) = \Delta C_p > 0 \longrightarrow \text{Positiva e constante}$$

$$\Delta H = \Delta H_0 + \Delta C_p (T - T_0)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S = G_u - G_f$$

$$\Delta S = \Delta S_0 + \Delta C_p \ln (T/T_0)$$

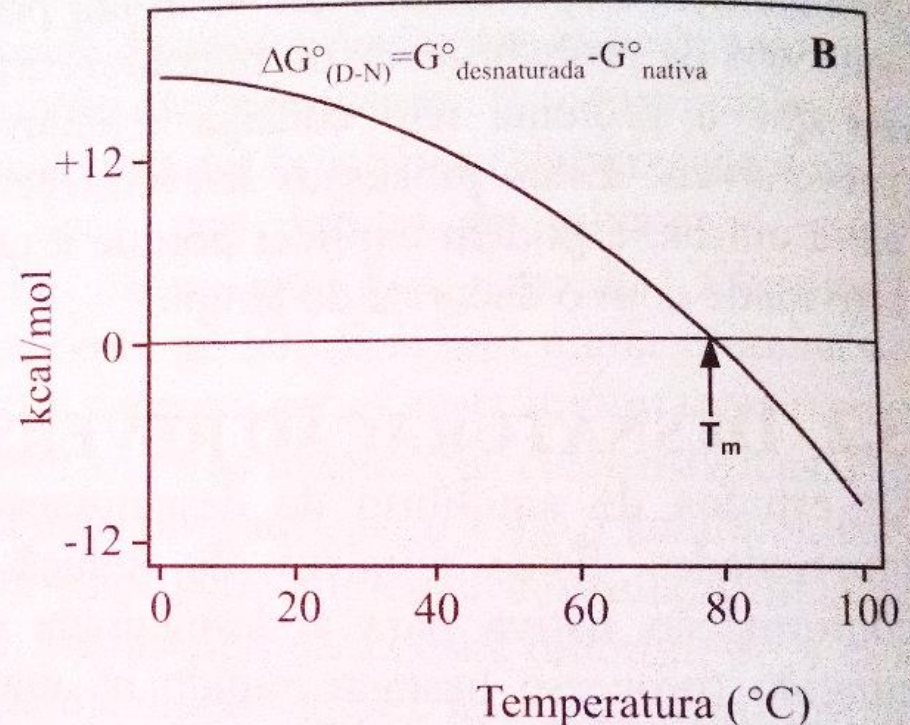
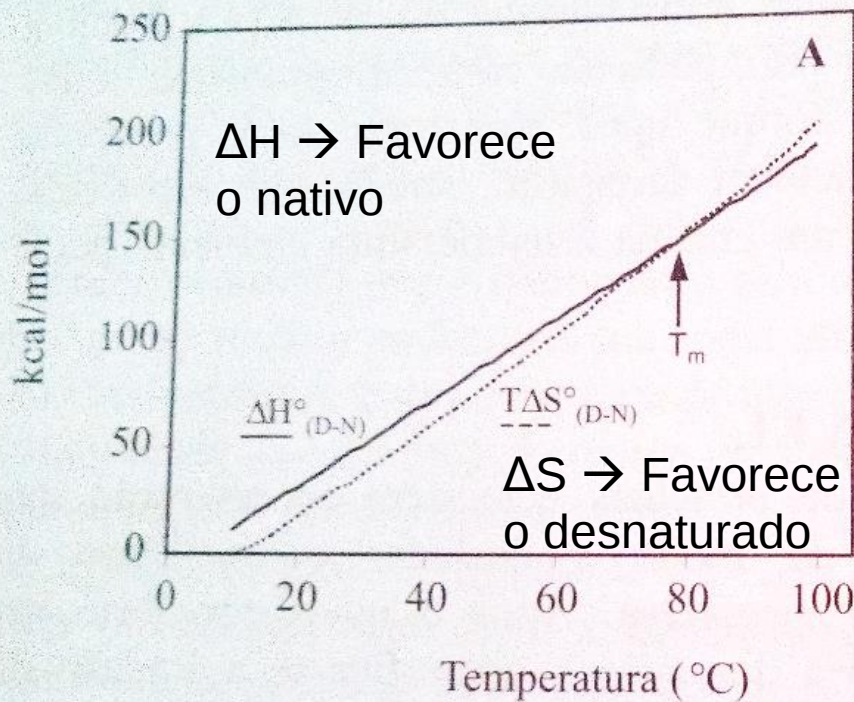
$$\Delta G = \Delta H_0 - T \cdot \Delta S_0 + \Delta C_p \cdot [(T - T_0) - T \cdot \ln (T/T_0)]$$

$$\Delta G = 0 \longrightarrow \text{Limite da Estabilidade}$$

$$T_m = \frac{\Delta H_m}{\Delta S_m} \longrightarrow \text{Temperatura em que 50\% das enzimas est\~ao desnaturadas}$$

T_m is the melting temperature of the protein.

Aspectos Termodinâmicos



$\Delta G > 0 \rightarrow$ Processo não espontâneo
 $\rightarrow$ Desnaturação não ocorre

Figura 3-1 – Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação de uma proteína. **A)** Contribuição entálpica ($\Delta H^\circ_{(D-N)}$ linha a cheio) e entrópica ($T\Delta S^\circ_{(D-N)}$ linha tracejada) e **B)** variação da energia livre ($\Delta G^\circ_{(D-N)}$) em função da temperatura. T_m é a temperatura no ponto médio, quando 50% da proteína está desnaturada (figura adaptada de Pfeil and Privalov, 1976, *Biophys. Chem.* 4, 41).

Aspectos Termodinâmicos

$$C_p(U) - C_p(N) = \Delta C_p > 0 \longrightarrow \text{Positiva e constante}$$

$$\Delta H = \Delta H_0 + \Delta C_p (T - T_0)$$

$$\Delta S = \Delta S_0 + \Delta C_p \ln (T/T_0)$$

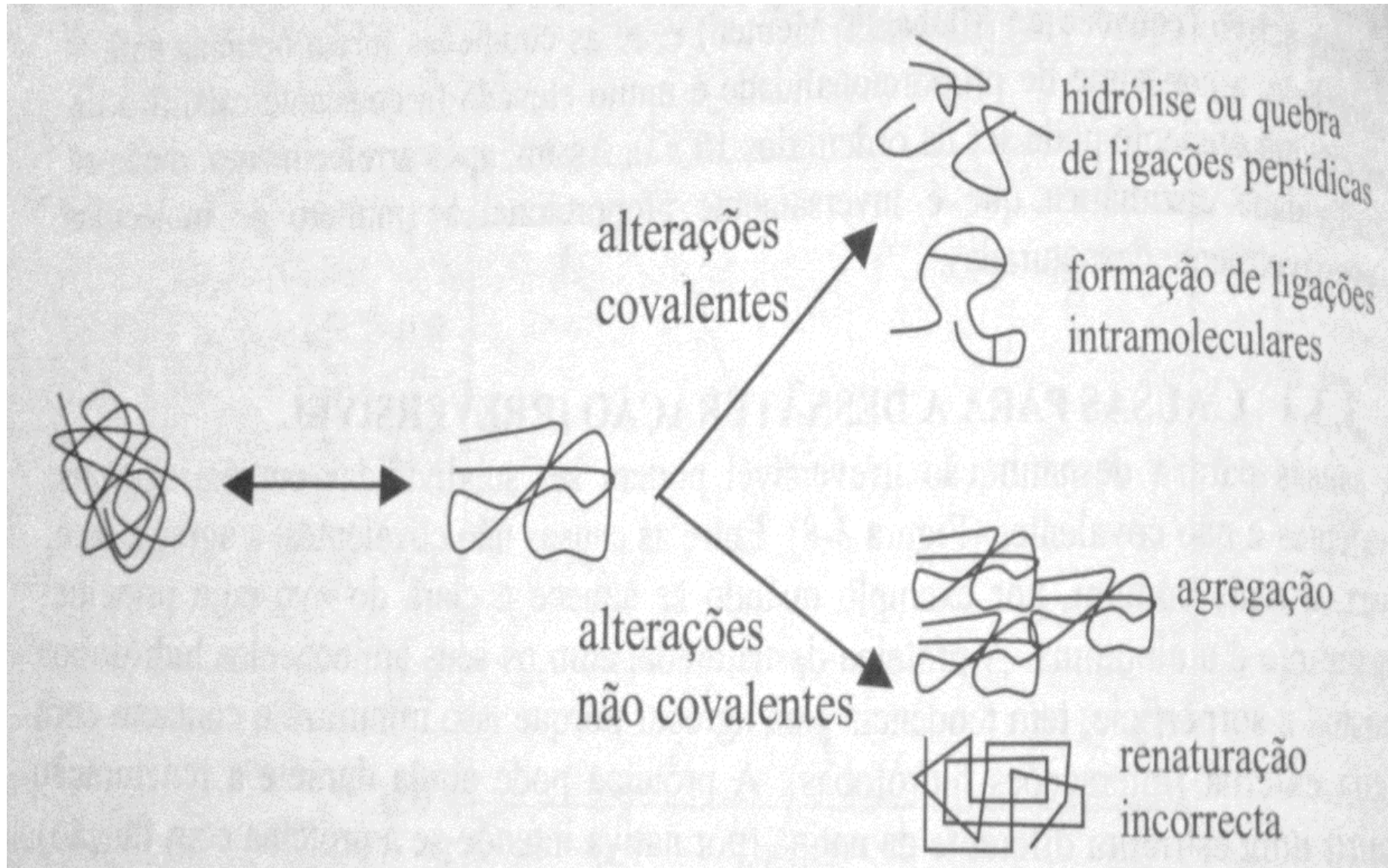
$$\Delta G = \Delta H_0 - T \cdot \Delta S_0 + \Delta C_p \cdot [(T - T_0) - T \cdot \ln (T/T_0)]$$

$$\Delta G(T) = \Delta H_m (1 - T/T_m) - \Delta C_p [(T_m - T) + T \cdot \ln (T/T_m)]$$

$$[\partial G / \partial T]_{T = T_s} = 0 = \Delta H_m / T_m + \Delta C_p \cdot \ln (T_s / T_m)$$

$$T_s = T_m \exp [-\Delta H_m / (T_m \cdot \Delta C_p)] \longrightarrow \text{T de máxima estabilidade}$$

Desnaturação Irreversível



Desnaturação Irreversível

Alterações Covalentes

- Quebra das ligações peptídicas: contaminação c/ proteases, pH ácido ou alcalino
- Desamidação dos resíduos de asparagina e glutamina (introduz cargas negativas no interior da molécula conduzindo a perda da atividade)

Alterações Não Covalentes

- Agregação (interações hidrófobas minimiza contato com a água externa -pelos aas hidrófobos expostos na superfície, que se agregam)

Desnaturação Irreversível

- Inativação pode seguir cinética de 1a ordem, exceto enzimas imobilizadas.



$$- \frac{dE}{dt} = k_d E$$

Integrando

$$\frac{E}{E_0} = e^{-k_d t}$$

Taxa de perda de atividade

E= atividade enzima , t= tempo,

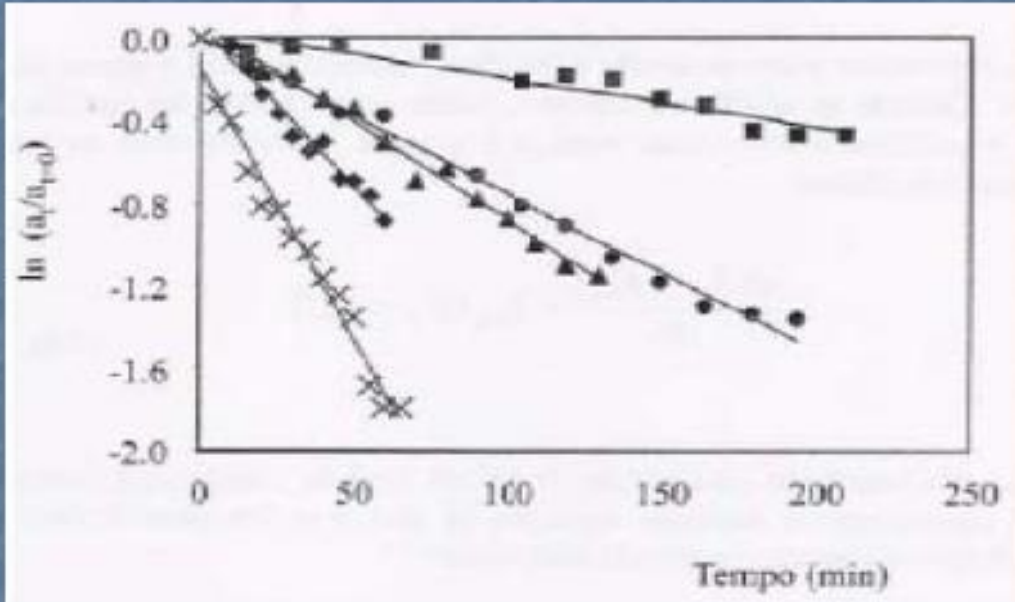
Kd = constante de desativação

E₀= atividade no tempo zero

E= atividade no tempo t

k= constante de desativação

Desnaturação Irreversível



Ex. Decaimento da cutinase a pH 9,2 em diferentes Temperaturas – pode-se calcular K_d para cada Temperatura
 K_d maior com aumento de T

Meia-vida

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0,5}{-K_d}$$

$$E/E_0 = 0,5$$

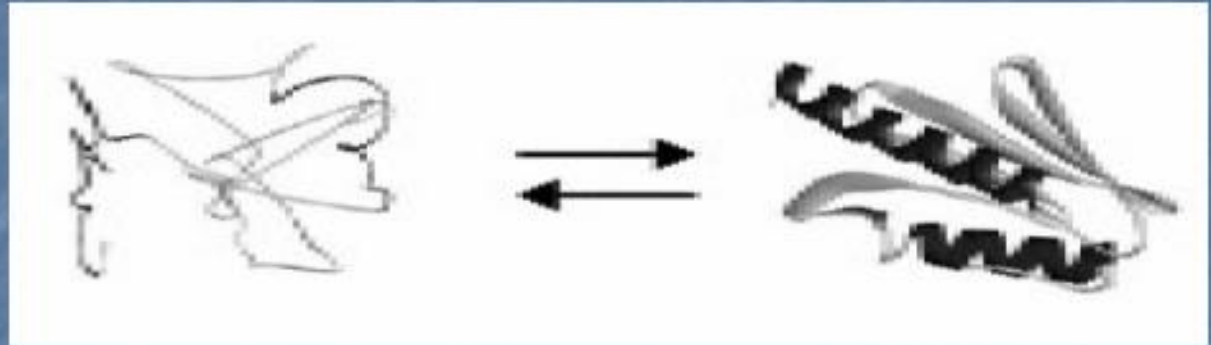
Tempo de meia vida – tempo ao fim do qual a enzima perde 50% da atividade

Fatores na Estabilidade

- **Temperatura**
- **pH**
- **Força iônica**
- **Presença de agentes desnaturantes**
- **Atividade da água**
- **Pressão**

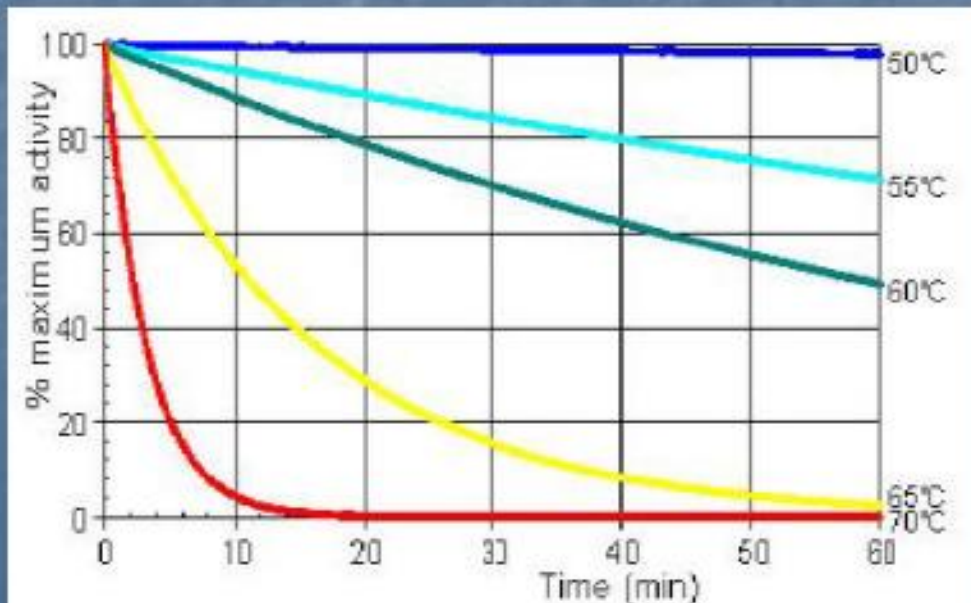
Efeito da Temperatura

Desnaturação por desdobramento da Molécula- liberdade conformacional aumenta a elevadas temperaturas – reversível na zona de transição



Desnaturado

Nativo



$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2.3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right)$$

Efeito da Temperatura

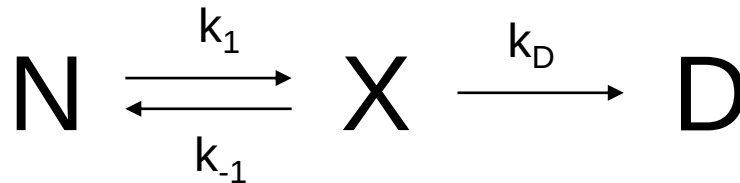
IMOBILIZAÇÃO:

- Tende a aumentar a estabilidade das enzimas.

Enzimas Termoestáveis

- Resistentes a desnaturação térmica
- Demanda industrial (mercado ~US\$ 250 milhões)
- Processos mais drásticos
- Organismos termofílicos

Modelo de 3 Estados: Lumry-Eyring



$k_{D, \text{obs}}$ Observed deactivation rate constant

k_D intrinsic deactivation rate constant

$$[E]_0 = [N] + [U],$$

$$v = k_{d, \text{obs}} \cdot [E]_0 = k_{d, \text{obs}} \cdot ([N] + [U])$$

$$K = \frac{[U]}{[N]}$$

$$v = k_d \cdot [U]$$

folding equilibrium constant

$$v = k_d \cdot K \cdot N = k_{d, \text{obs}} \cdot [N] \cdot (1 + K) \quad \text{High } T, \text{ or } T > T_m: \quad \text{then } [U] \gg [N], \text{ thus } K \ll 1, \text{ and } k_{d, \text{obs}} \approx k_d \cdot K$$

or

$$\text{Moderate } T, \text{ or } T < T_m: \quad \text{then } [U] < [N], \text{ thus } K > 1, \text{ and } k_{d, \text{obs}} \approx k_d \cdot K / (1 + K)$$

$$k_{d, \text{obs}} = k_d \cdot (K / (1 + K))$$

$$\text{Low } T, \text{ or } T \ll T_m: \quad \text{then } [U] \ll [N], \text{ thus } K \gg 1, \text{ and } k_{d, \text{obs}} \approx k_d$$

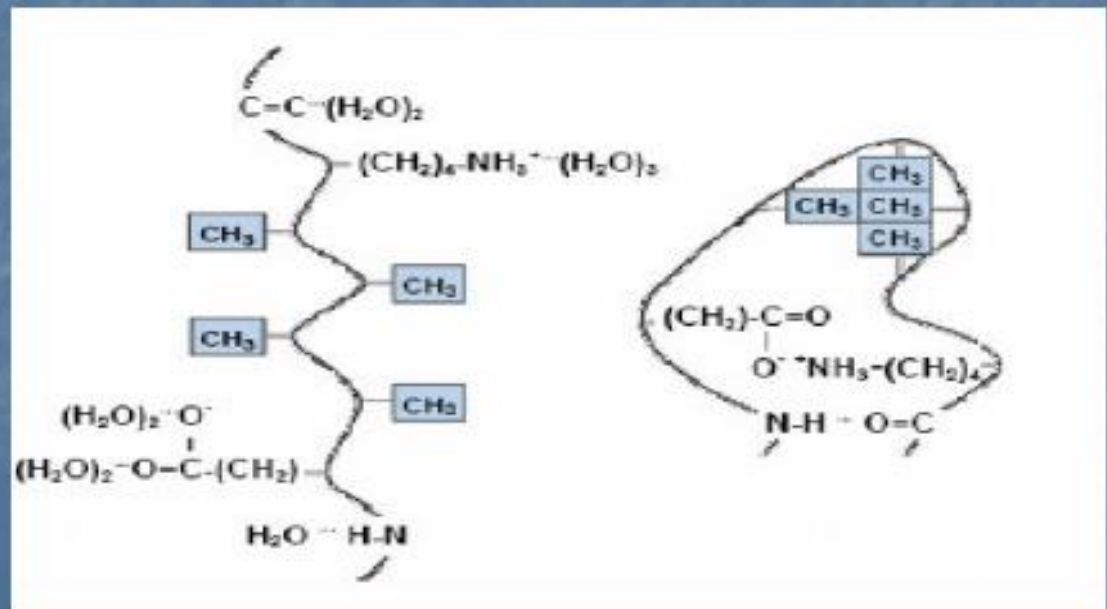
Efeito do pH

- Normalmente valores extremos de pH induzem a desnaturação (muito $\uparrow$ ou muito $\downarrow$).
- Alteração da carga dos aminoácidos da molécula (anula interações eletrostáticas- promove repulsões)- 7 dos 20 aas das proteínas alteram sua carga com variação do pH
- Afeta a estrutura da molécula.

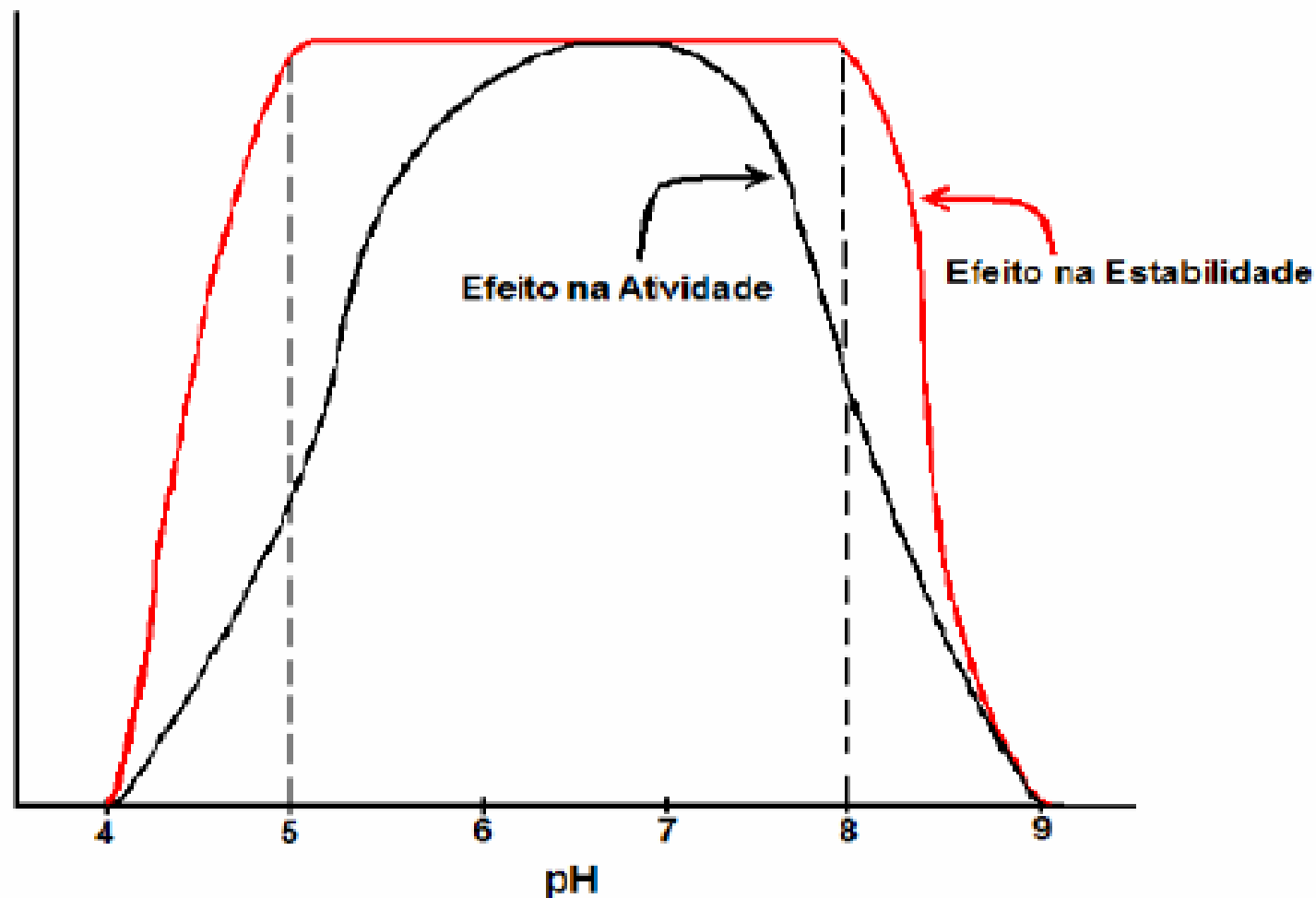
Efeito do pH

- Desnaturação ácida ($\text{pH} \downarrow$) desaparecimento das cargas negativas (grupos COOH das Asp e Glu).
- Desnaturação alcalina ($\text{pH} \uparrow$): desaparecimento das carga positivas- acúmulo negativas grupos COOH e nas tirosinas e cisteínas.

Estrutura interna de uma proteína- irreversível aumenta reatividade



Efeito do pH



Efeito da Pressão

- O efeito da pressão em um processo físico-químico em equilíbrio é governado por uma mudança de volume no processo (ΔV).
- A aplicação de pressão faz com que o equilíbrio se desloque em favor do lado da reação com menor volume.

$$\left(\frac{d \ln K}{dP} \right)_T = - \left(\frac{\Delta V}{RT} \right)$$

Efeito da Pressão

Interações Intramoleculares

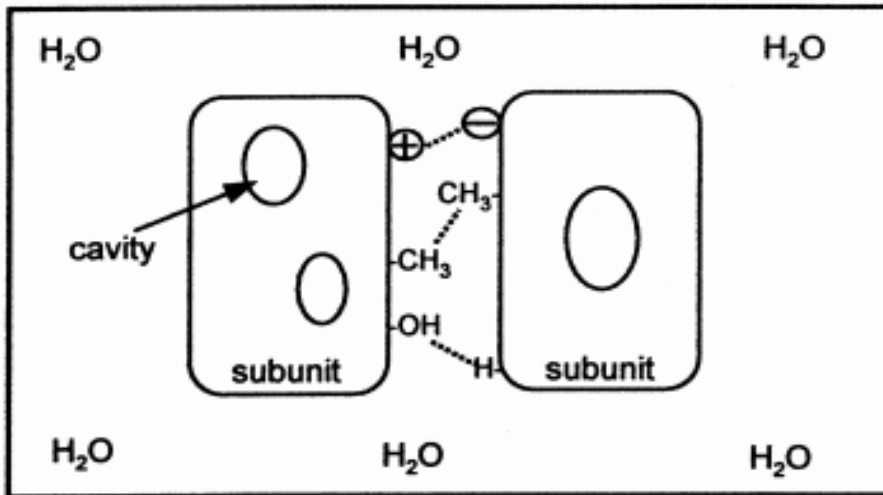
- **Interações iônicas:** Proteínas formam pares iônicos que estabilizam sua estrutura terciária e quaternária. A pressão leva ao seu rompimento.
- **Hidratação:** Deformação da proteína pela entrada de água dentro da molécula.
- **Ligações de hidrogênio:** Promove as ligações de H, acarretando em conformações flutuantes. Diminui o tamanho das ligações comprimindo a molécula.

Efeito da Pressão

- Interações Intermoleculares
 - **Proteína-Proteína:** Dissociação de proteínas oligoméricas, fragmentação da molécula.
 - **Enzima-Substrato:** A ocorrência de eletrostrição pode romper o par iônico entre substrato e enzima.

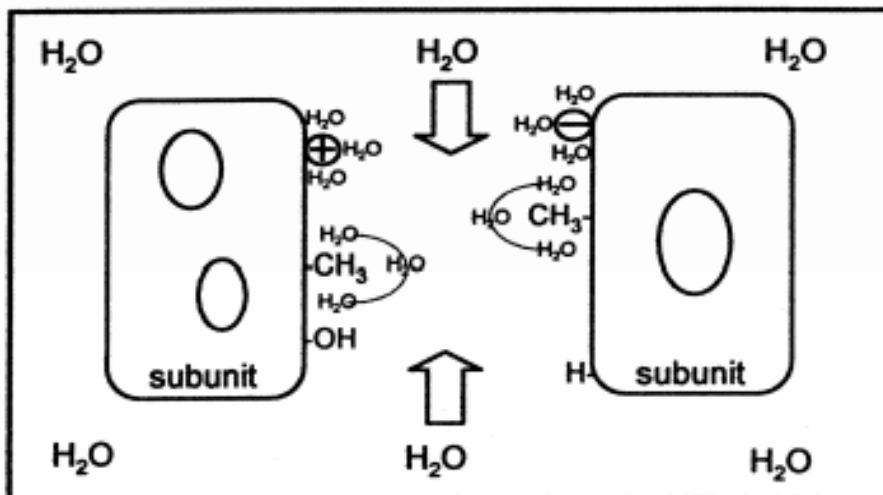
Efeito da Pressão

(1 bar)



- presence of cavities within protein

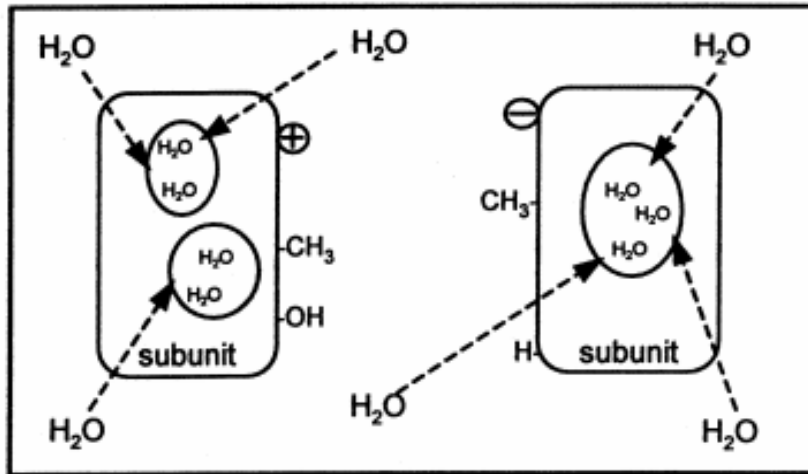
(0.5 ~ 2 kbar)



- dissociation of oligomer
- electrostriction
- clathrate formation around hydrophobic residues

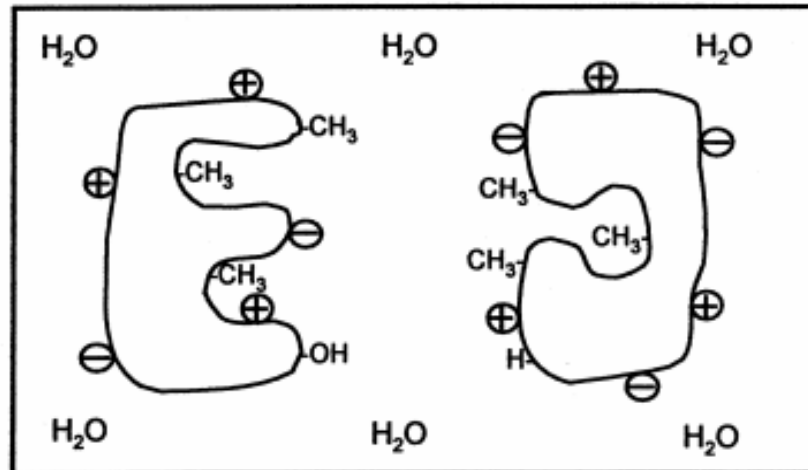
Efeito da Pressão

(~ 5 kbar)



- conformational fluctuations provide pathways for water to penetrate into cavities
- shortening of hydrogen bonds (not in figure)
- swelling of hydrophobic core due to water

(5 ~ 10 kbar)



- formation of molten globule state
- disruption of tertiary structure
- loss of void spaces within protein

Efeito da Pressão

Termoestabilização Induzida por Pressão

- Pressão e Temperatura são forças opostas em termos de entropia.

Aumentando a temperatura leva a desordem enquanto que aumentando a pressão leva a ordem.

Porém, isso não é verdadeiro para todas as proteínas.

Efeito da Força Iônica

$\mu \rightarrow$ força iônica

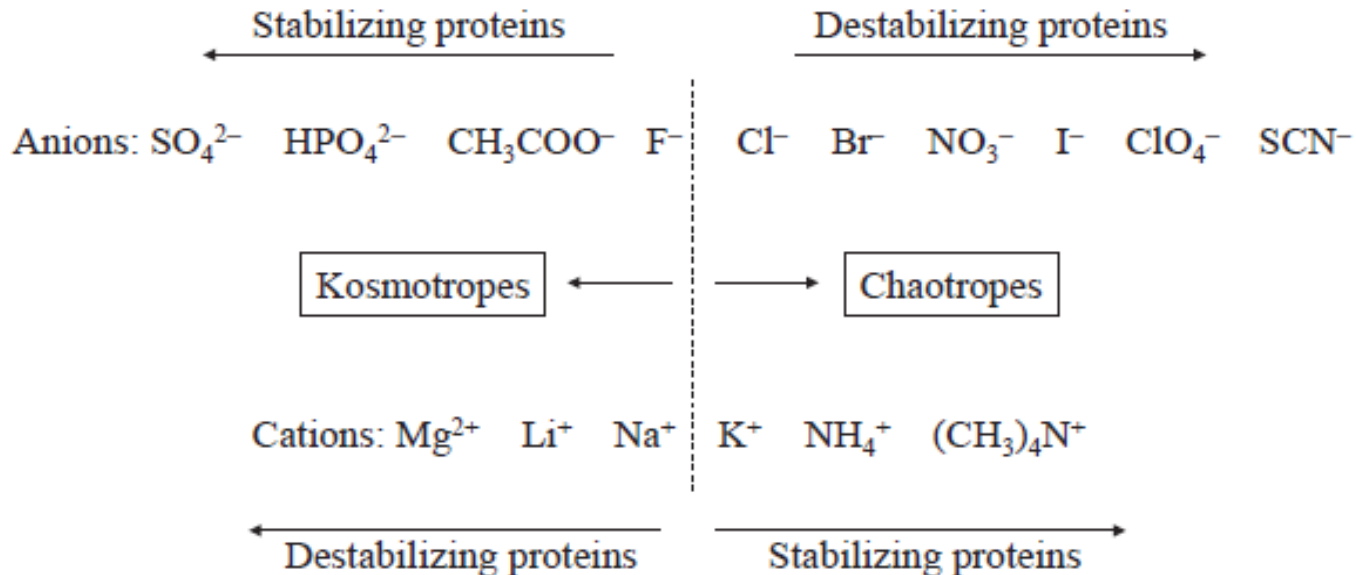
$c_i \rightarrow$ concentração de íon

$z_i \rightarrow$ carga iônica

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

$$\ln K = \ln K^0 - z_S \cdot z_E \frac{\sqrt{\mu}}{1 + \sqrt{\mu}}$$

Série de Hofmeister ou Liotrópica



Outros

Agentes Desnaturantes

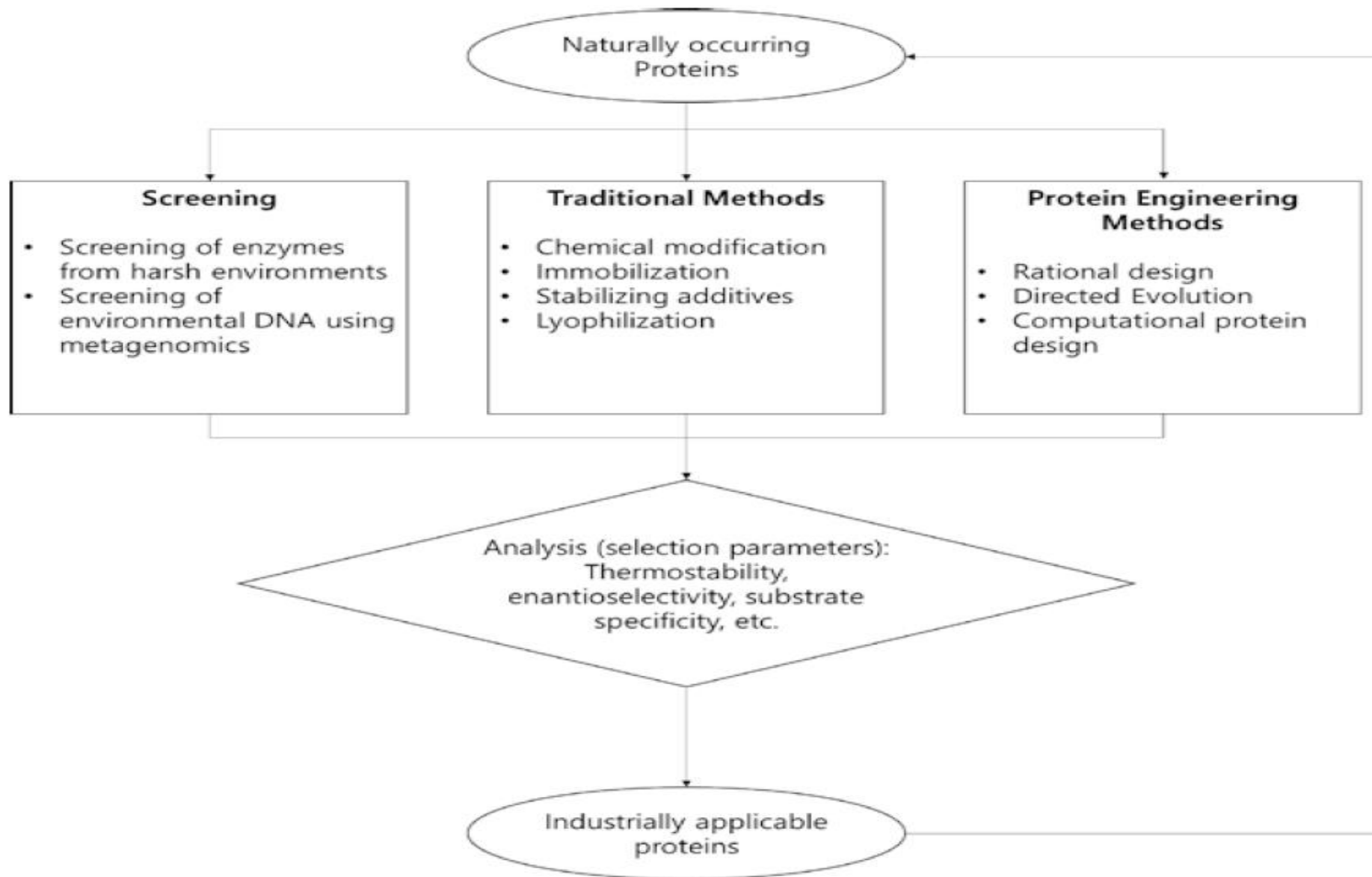
- Substâncias que causam a desnaturação das enzimas- aumentam solubilidade cadeias laterais da proteína (hidrófobas e polipeptídica)
- Na maioria das vezes é reversível (100%).
- Utilizados p/ caracterização termodinâmica da desnaturação.

Ex: cloreto de guanidina e uréia

Atividade da Água

- O nível e distribuição de água residual afeta a eficiência catalítica.
- Falta de água torna a molécula mais rígida e excesso de água diminuí estabilidade enzimática ($a_w < 1$ - causa rigidez)

Estabilização



Estabilização

Metagenômica

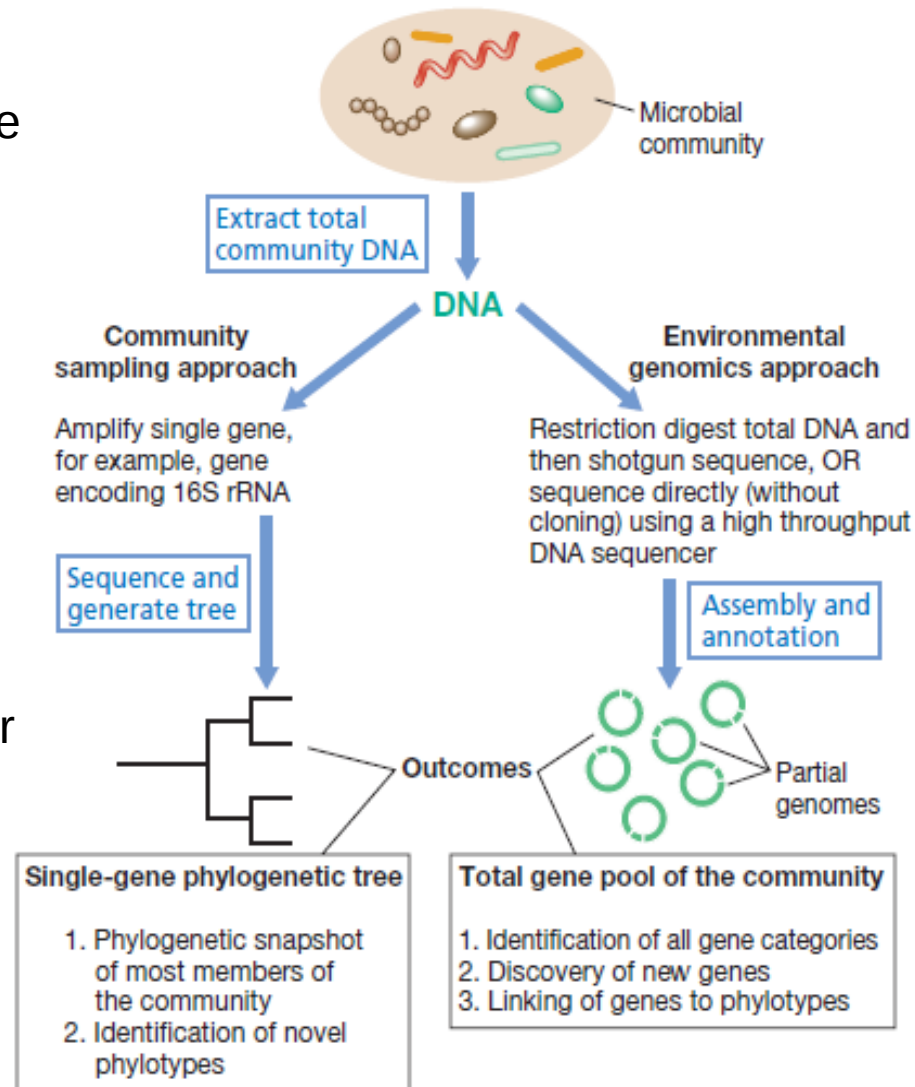
Detectar o máximo de genes possíveis que codifiquem proteínas reconhecíveis, e se possível, determinar a que grupo filogenético pertencem

Método de Sequenciamento shotgun aleatório do DNA total clonado de uma comunidade microbiana

→ DNA é fragmentado mecanicamente através de um nebulizador

→ Clones são sequenciados sem qualquer conhecimento acerca da orientação dos fragmentos de DNA

→ Sequências são analisadas por computador em busca de sobreposição para organização dos fragmentos sequenciados na ordem correta



Estabilização

**Engenharia
de Proteínas**



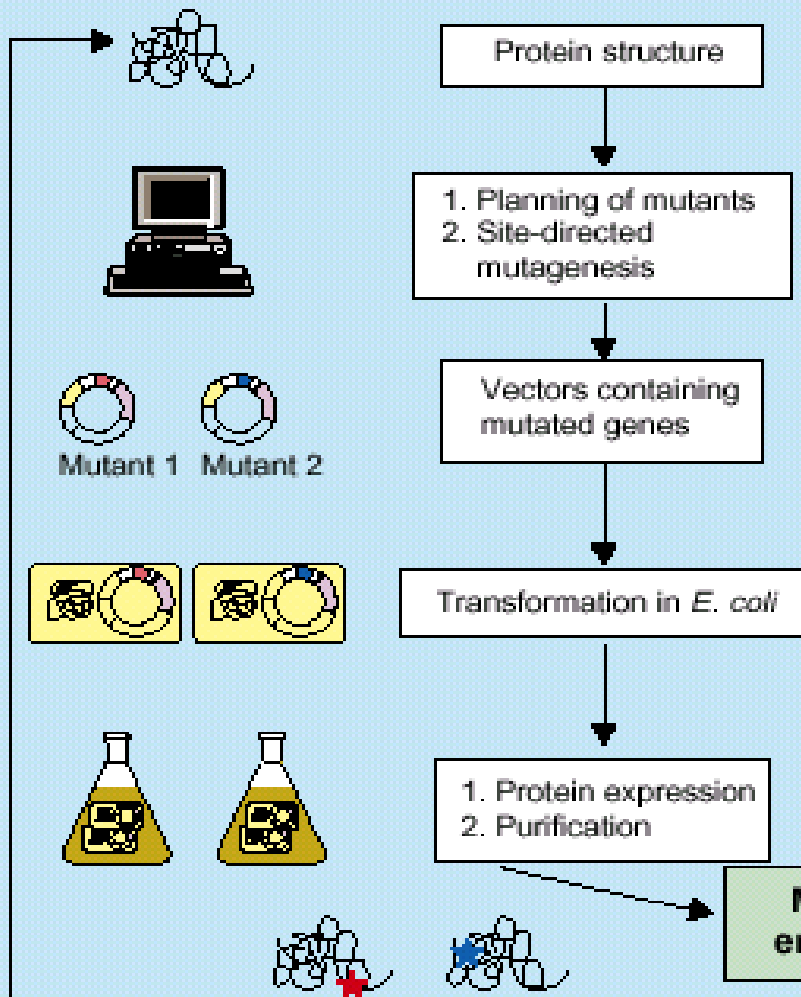
**Otimização da sequência de
aminoácidos**

Como melhorar a enzima?

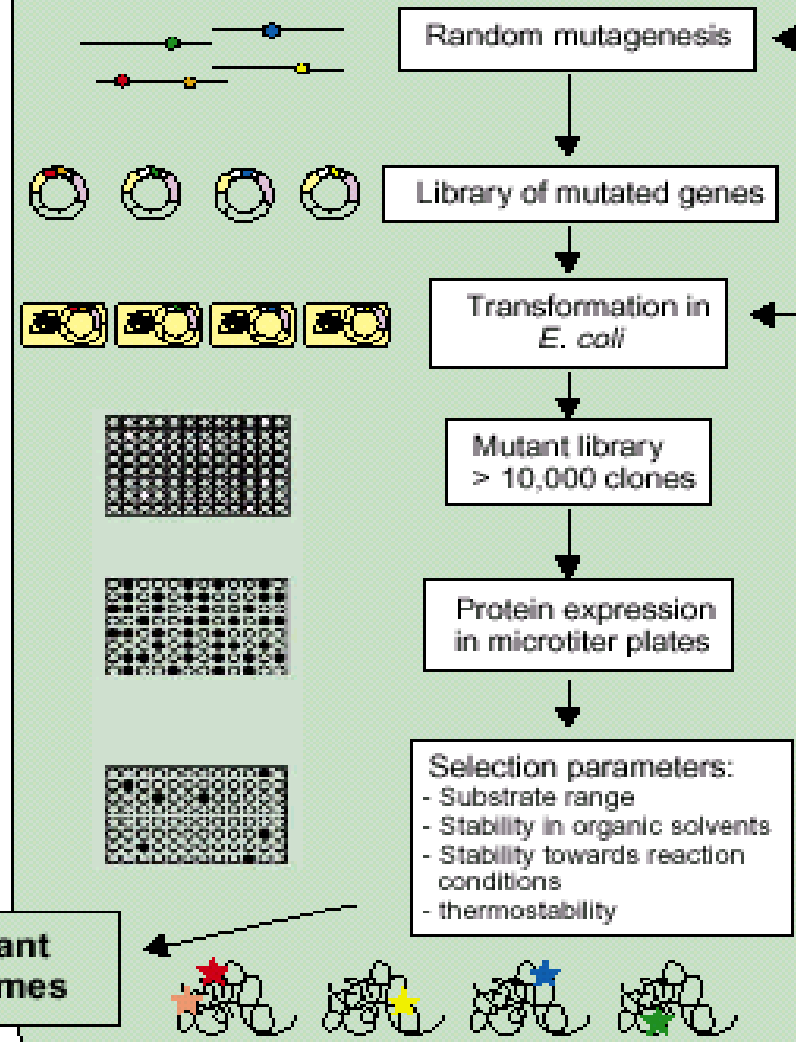
- Aumentar ou inverter a seletividade
- Alargar ou estreitar a especificidade ao substrato
- Alterar o perfil de pH ou temperatura
- Aumentar a estabilidade a temperatura, ao solvente ...
- Suprimir a inibição por substrato ou por produto
- Aumentar a eficiência catalítica

Métodos

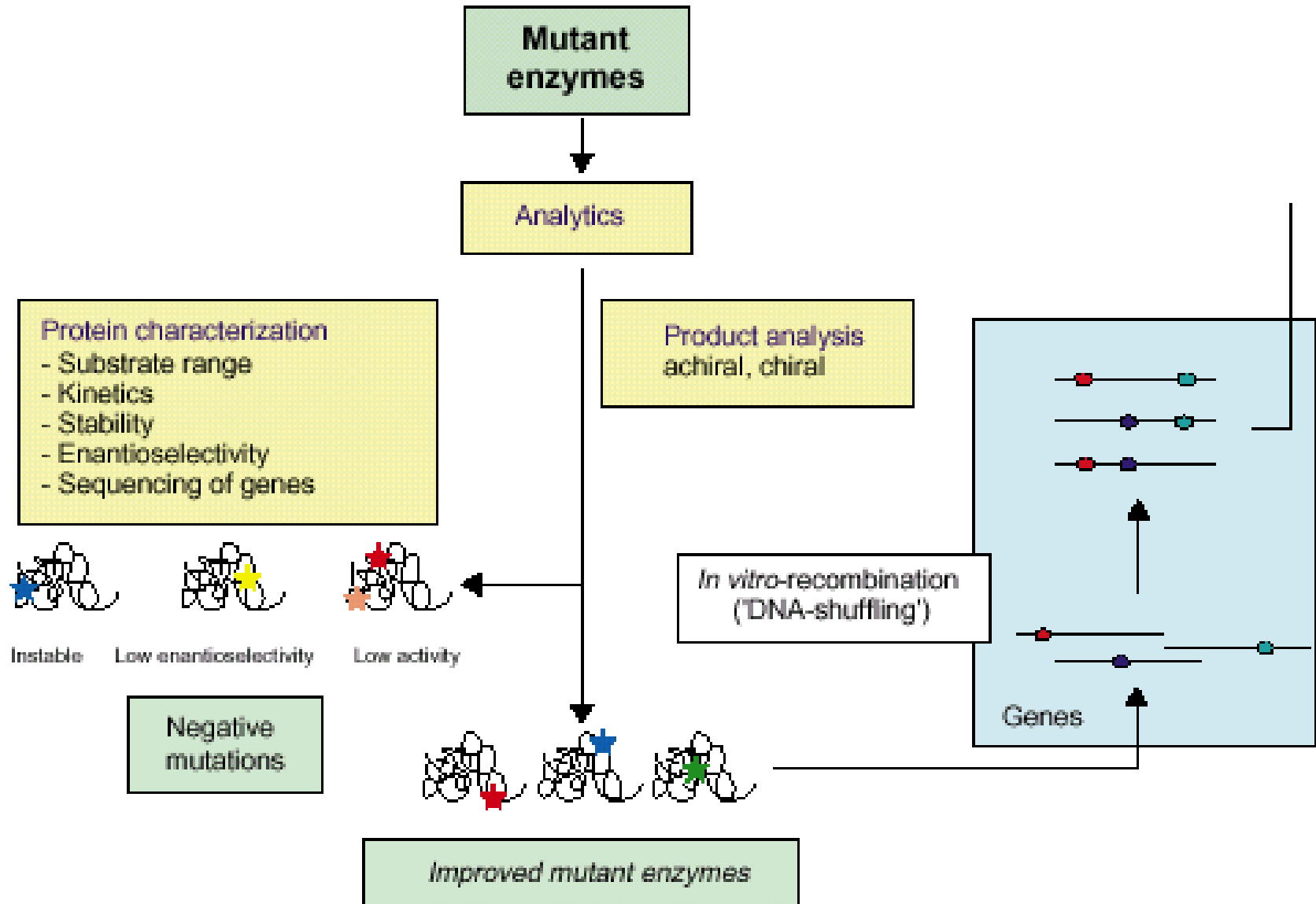
Rational Protein Design



Directed Evolution



Métodos

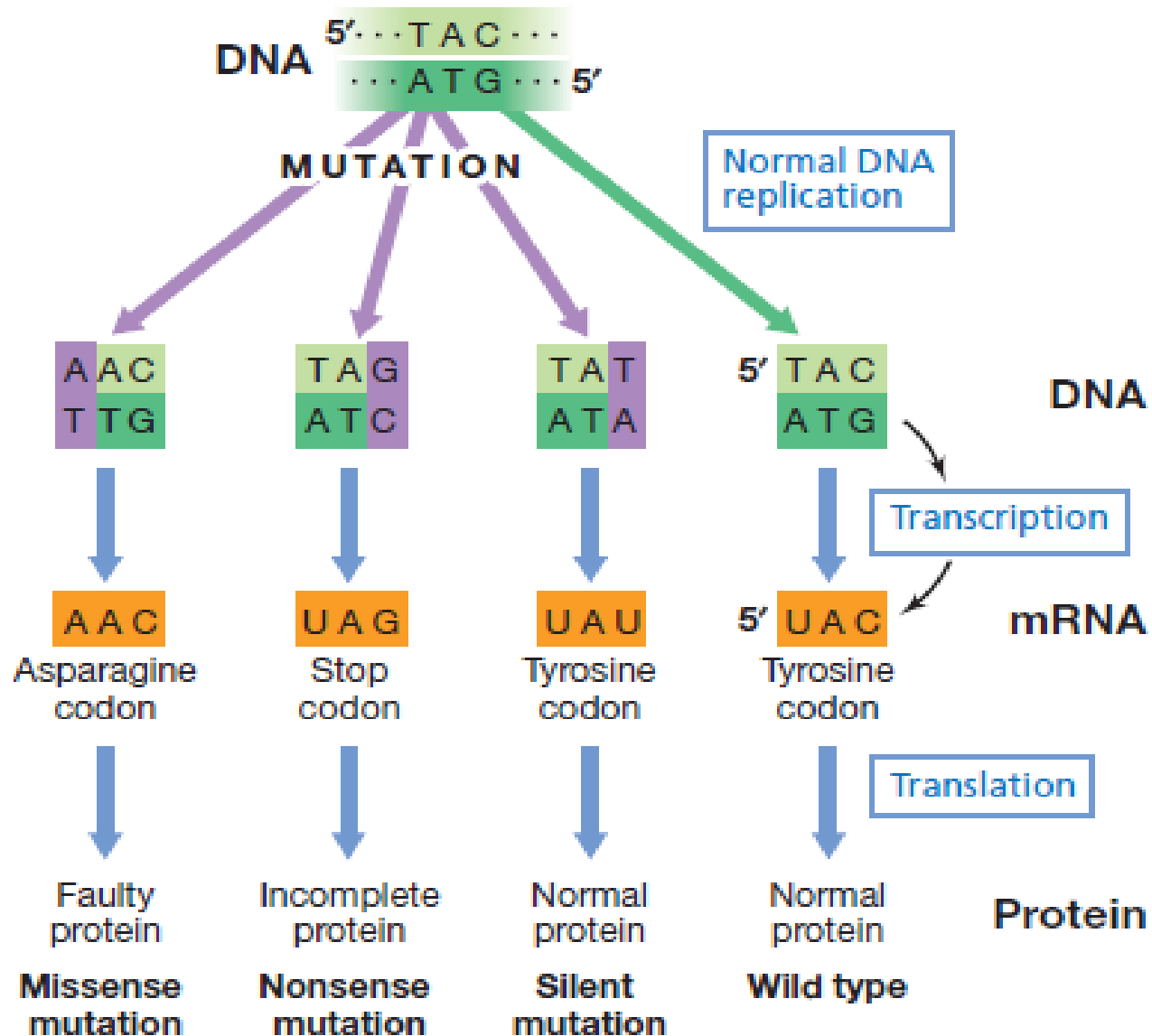


Métodos

Table 10.1 *Kinds of mutants*

<i>Phenotype</i>	<i>Nature of change</i>	<i>Detection of mutant</i>
Auxotroph	Loss of enzyme in biosynthetic pathway	Inability to grow on medium lacking the nutrient
Temperature-sensitive	Alteration of an essential protein so it is more heat-sensitive	Inability to grow at a high temperature (for example, 40°C) that normally supports growth
Cold-sensitive	Alteration of an essential protein so it is inactivated at low temperature	Inability to grow at a low temperature (for example, 20°C) that normally supports growth
Drug-resistant	Detoxification of drug or alteration of drug target or permeability to drug	Growth on medium containing a normally inhibitory concentration of the drug
Rough colony	Loss or change in lipopolysaccharide layer	Granular, irregular colonies instead of smooth, glistening colonies
Nonencapsulated	Loss or modification of surface capsule	Small, rough colonies instead of larger, smooth colonies
Nonmotile	Loss of flagella or nonfunctional flagella	Compact instead of flat, spreading colonies
Pigmentless	Loss of enzyme in biosynthetic pathway leading to loss of one or more pigments	Presence of different color or lack of color
Sugar fermentation	Loss of enzyme in degradative pathway	Lack of color change on agar containing sugar and a pH indicator
Virus-resistant	Loss of virus receptor	Growth in presence of large amounts of virus

Mutagenèse

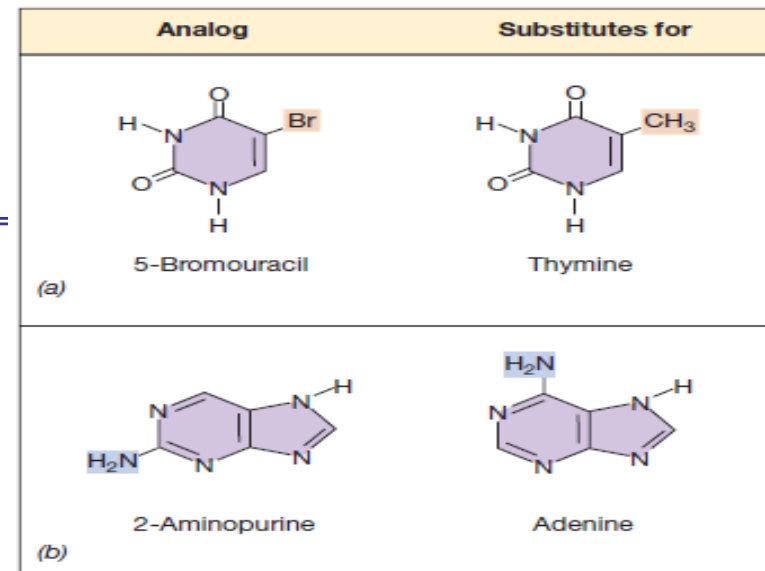


Mutagênese

Reversão da Mutação

Sistemas de Reparo de DNA

Menor viabilidade celular



Agent	Action	Result
Base analogs		
5-Bromouracil	Incorporated like T; occasional faulty pairing with G	AT → GC and occasionally GC → AT
2-Aminopurine	Incorporated like A; faulty pairing with C	AT → GC and occasionally GC → AT
Chemicals reacting with DNA		
Nitrous acid (HNO ₂)	Deaminates A and C	AT → GC and GC → AT
Hydroxylamine (NH ₂ OH)	Reacts with C	GC → AT
Alkylating agents		
Monofunctional (for example, ethyl methanesulfonate)	Puts methyl on G; faulty pairing with T	GC → AT
Bifunctional (for example, mitomycin, nitrogen mustards, nitrosoguanidine)	Cross-links DNA strands; faulty region excised by DNase	Both point mutations and deletions
Intercalating dyes		
Acridines, ethidium bromide	Inserts between two base pairs	Microinsertions and microdeletions
Radiation		
Ultraviolet	Pyrimidine dimer formation	Repair may lead to error or deletion
Ionizing radiation (for example, X-rays)	Free-radical attack on DNA, breaking chain	Repair may lead to error or deletion

Desenho Racional

**Estrutura 3D de
Proteínas**



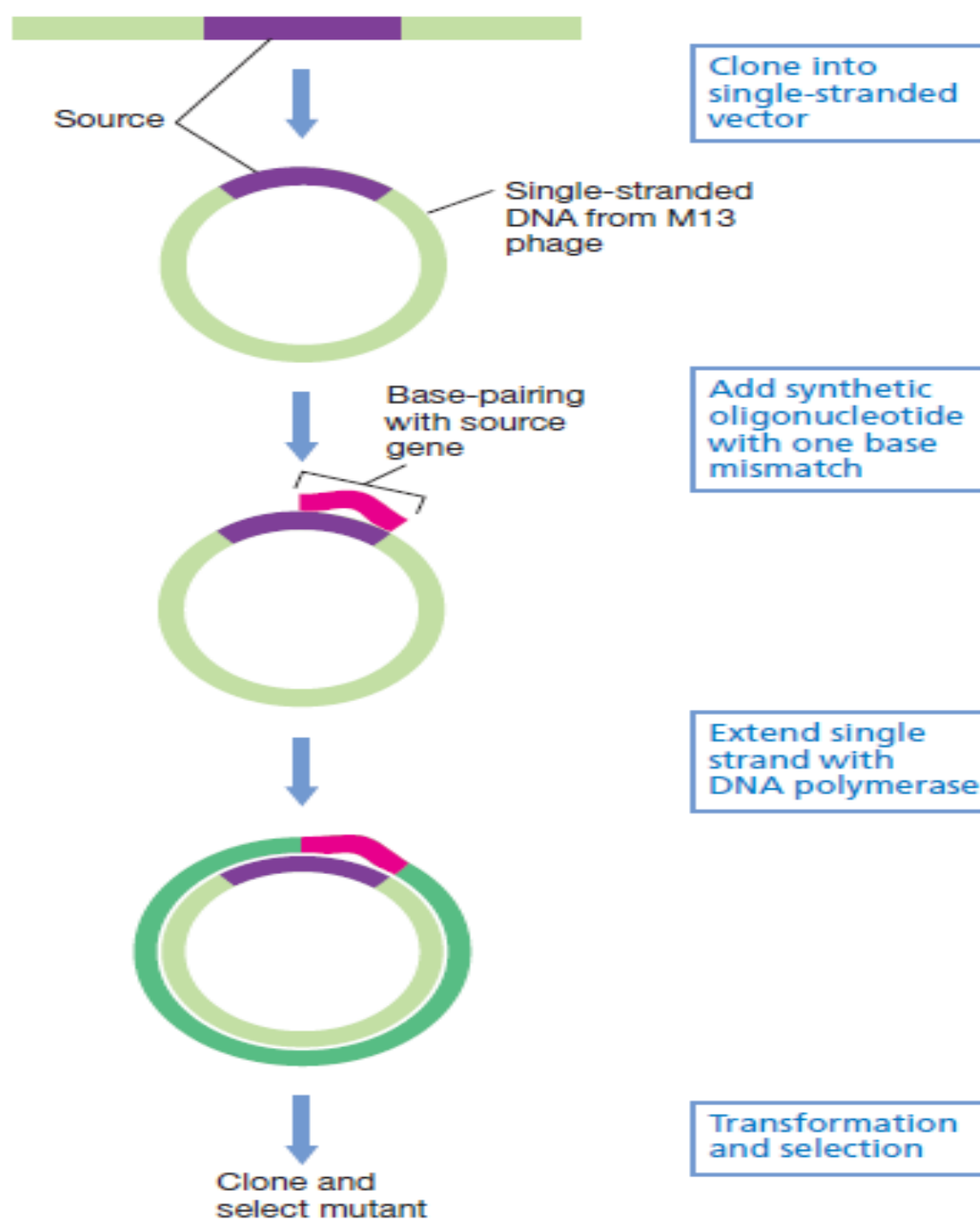
Cristalografia por Raios X

Ressonância Magnética Nuclear

Modelagem Molecular

**Mutagenese
Sítio-Dirigida**

- 1) Clonagem do gene de interesse em um vetor de DNA de fita simples (bacteriófago M13)
- 2) Síntese de um pequeno iniciador (primer) oligonucleotídico de DNA contendo a alteração de base desejada (mutação)
- 3) Depois este é pareado com uma fita simples de DNA contendo o gene-alvo, sendo este pareamento completo, exceto na região de pareamento incorreto
- 4) Em seguida, o oligonucleotideo sintético é estendido pela DNA polimerase, copiando o restante do gene
- 5) A molécula de fita dupla resultante é inserida em uma célula hospedeira por Transformação
- 6) Mutantes são selecionados por algum marcador, como resistência a antibiótico



Exemplo

Artigo: “Estabilização da Lipase B de *Candida antarctica* em Solventes Orgânicos Hidrofílicos por Desenho Racional de Ligações Hidrogênio”, Park, H.J.; Joo, J.C.; Park, K.; Yoo, Y.J; Biotechnol Bioproc Eng 14: 722-728 (2012)

**Solventes Orgânicos
Hidrofílicos:**

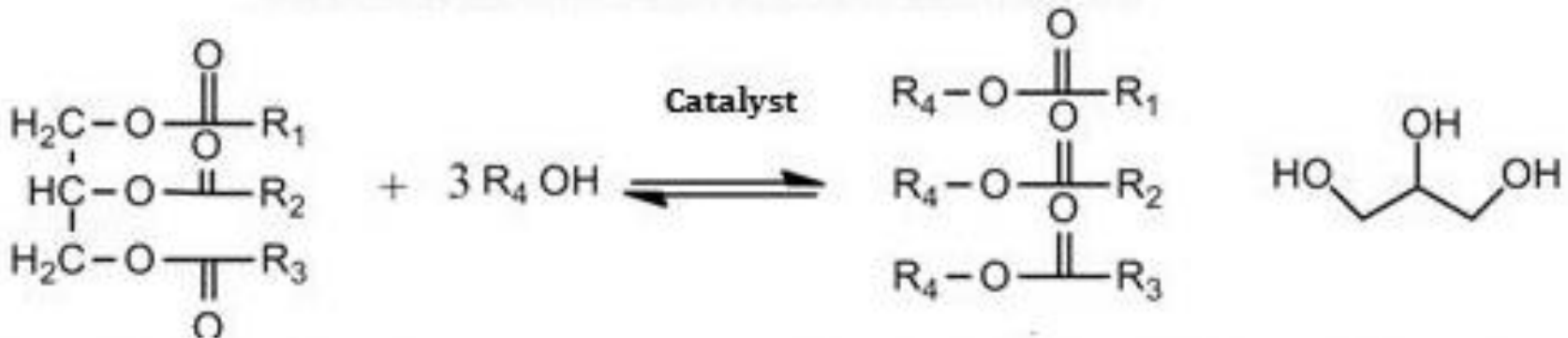
EtOH, MeOH, Acetona



Desnaturação

Alteração da cinética reacional

Aplicação: Produção de Biodiesel



Exemplo

Artigo: “Estabilização da Lipase B de *Candida antarctica* em Solventes Orgânicos Hidrofílicos por Desenho Racional de Ligações Hidrogênio”

O que influencia a estabilidade da enzima nesses solventes?

Table 2. Mutational information derived from previous directed evolution studies

Enzyme	Mutation	Type of solvent	Organic solvent stability*	Location	Stabilizing factors discussed	References
<i>Vibrio</i> metalloproteinase (Vimelysin)	N123D	50% Ethanol	Two times higher	Surface coil	Hydrogen bond Ion pair	Takahashi <i>et al.</i> [19]
<i>Myceliophthora thermophila</i> laccase	S280N	50% Ethanol	Five times higher	Surface loop	Additional hydrogen bond interaction	Zumarraga <i>et al.</i> [20]
<i>Bacillus subtilis</i> Subtilisin E	N218S	40% DMF	Twice stable	Surface coil	Increase internal hydrogen bond	Chen <i>et al.</i> [17]
Phospholipase A1	L263Q	50% DMSO	Four fold increase	-	Formation of hydrogen bond	Song <i>et al.</i> [18]

*Organic solvent stability is compared with that of the wild-type enzyme.

↑ Interações por ligações hidrogênio → As moléculas de água se ligariam mais fortemente a superfície da enzima → ↓ quantidade de água seria desorvida → ↑ **estabilidade enzimática**

Exemplo

Artigo: “Estabilização da Lipase B de *Candida antarctica* em Solventes Orgânicos Hidrofílicos por Desenho Racional de Ligações Hidrogênio”

O que influencia a estabilidade da enzima nesses solventes?

- Introdução de aminoácidos polares ou carregados (Asp/Gln/Ser/Asn)
- Os resíduos alvo devem se localizar na superfície enzimática
- Os resíduos alvo não devem estar envolvidos na formação de estruturas secundárias (alfa-hélices ou folha-betas).

Assim, alterações dos aminoácidos Asp e Asn para Glu e Gln, respectivamente, nas estruturas volta reversa e alça da superfície enzimática alteraria a rede ligações hidrogênio, sem afetar a atividade catalítica das enzimas, já que a diferença dos aminoácidos é só de um grupo metila

Exemplo

Artigo: “Estabilização da Lipase B de *Candida antarctica* em Solventes Orgânicos Hidrofílicos por Desenho Racional de Ligações Hidrogênio”

Modelagem Molecular → Simulação das Mutações

Table 3. Target residue selection using a rational approach

Residue number	SASA*	Secondary structure	Target residue	Residue number	SASA*	Secondary structure	Target residue
6	26.5	Loop		51	0	Helix	
17	45.3	Helix		74	42.8	Loop	
49	57.1	Helix		79	0.4	Helix	
75	16.9	Loop		85	2.4	Helix	
126	32.8	Sheet		96	68.4	Loop	O
134	1.8	Turn (loop)		97	69.6	Loop	O
145	8.2	Helix		169	41.7	Helix	
187	0	Catalytic residue		181	0	Sheet	
200	0.6	Turn (loop)		196	46.6	Loop	
223	54.2	Loop	O	206	70.7	Turn	O
252	26.6	Helix		209	8.5	Sheet	
257	26.2	Helix		259	29.7	Loop	
265	50	Turn (loop)	O	264	58.3	Turn	O
296	38.6	Loop		292	71.7	Loop	O

*SASA: solvent accessible surface area. Exposure ratio (%).

SASA > 50% → Aa na superfície

Exemplo

Artigo: “Estabilização da Lipase B de *Candida antarctica* em Solventes Orgânicos Hidrofílicos por Desenho Racional de Ligações Hidrogênio”

Modelagem Molecular → Simulação das Mutações

Table 4. Information of hydrogen bond interactions between amino acid side-chain and water molecules

Wild type residue	Number of hydrogen bonds	Average distance (Å)	Average angle (°)	Mutant residue	Number of hydrogen bonds	Average distance (Å)	Average angle (°)
D223	5	1.824	164	D223E	4	1.810	156
D265	7	1.956	159	D265E	8	1.896	161
N96	3	1.840	172	N96Q	3	1.870	168
N97	2	2.120	141	N97Q	4	2.225	149
N206	2	2.105	166	N206Q	1	2.270	168
N264	3	1.983	151	N64Q	3	1.957	154
N292	1	1.770	171	N292Q	1	1.810	166

Exemplo

Artigo: “Estabilização da Lipase B de *Candida antarctica* em Solventes Orgânicos Hidrofílicos por Desenho Racional de Ligações Hidrogênio”

Modelagem Molecular → Simulação das Mutações

Table 4. Information of hydrogen bond interactions between amino acid side-chain and water molecules

Wild type residue	Number of hydrogen bonds	Average distance (Å)	Average angle (°)	Mutant residue	Number of hydrogen bonds	Average distance (Å)	Average angle (°)
D223	5	1.824	164	D223E	4	1.810	156
D265	7	1.956	159	D265E	8	1.896	161
N96	3	1.840	172	N96Q	3	1.870	168
N97	2	2.120	141	N97Q	4	2.225	149
N206	2	2.105	166	N206Q	1	2.270	168
N264	3	1.983	151	N64Q	3	1.957	154
N292	1	1.770	171	N292Q	1	1.810	166

Exemplo

Artigo: “Estabilização da Lipase B de *Candida antarctica* em Solventes Orgânicos Hidrofílicos por Desenho Racional de Ligações Hidrogênio”

Modelagem Molecular → Simulação das Mutações

Table 4. Information of hydrogen bond interactions between amino acid side-chain and water molecules

Wild type residue	Number of hydrogen bonds	Average distance (Å)	Average angle (°)	Mutant residue	Number of hydrogen bonds	Average distance (Å)	Average angle (°)
D223	5	1.824	164	D223E	4	1.810	156
D265	7	1.956	159	D265E	8	1.896	161
N96	3	1.840	172	N96Q	3	1.870	168
N97	2	2.120	141	N97Q	4	2.225	149
N206	2	2.105	166	N206Q	1	2.270	168
N264	3	1.983	151	N64Q	3	1.957	154
N292	1	1.770	171	N292Q	1	1.810	166

Exemplo

Artigo: “Estabilização da Lipase B de *Candida antarctica* em Solventes Orgânicos Hidrofílicos por Desenho Racional de Ligações Hidrogênio”

Modelagem Molecular → Simulação das Mutações

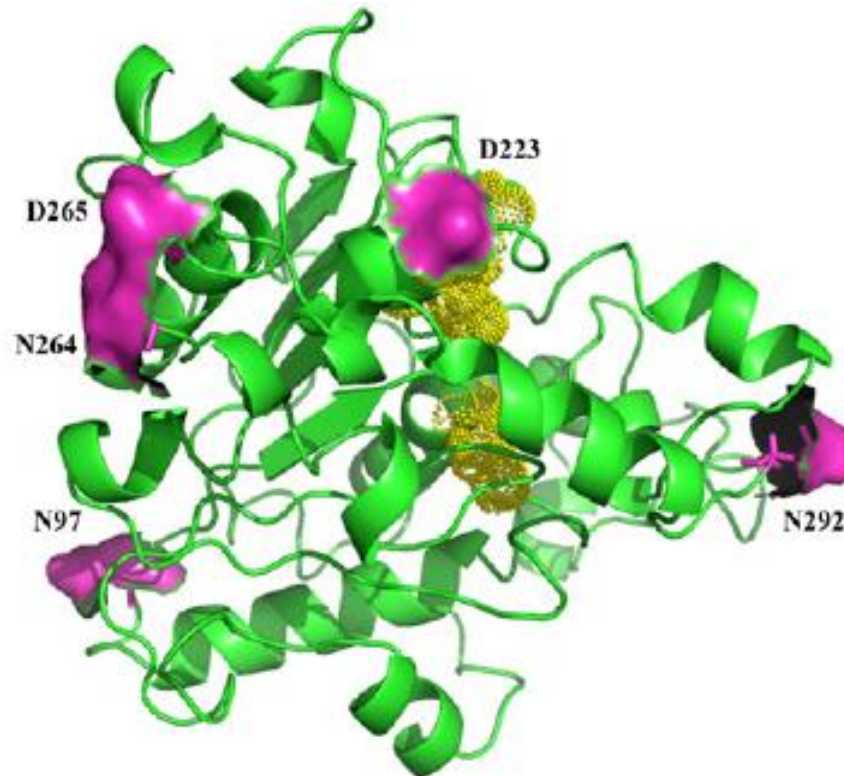


Fig. 2. Location of mutation sites. Catalytic residues (yellow) and mutation sites (magenta) are shown as dots and surfaces, respectively.

Exemplo

Artigo: “Estabilização da Lipase B de *Candida antarctica* em Solventes Orgânicos Hidrofílicos por Desenho Racional de Ligações Hidrogênio”

Geração de Mutantes e Obtenção da Enzima

- O gene CalB foi subclonado no plasmídeo *pPICZalphaA* usando as enzimas de restrição *XhoI* e *XbaI*, e os primers utilizados foram sintetizados
- Mutagênese sítio-dirigida → protocolo QuickChange → PCR
- Transformação foi feita em *Pichia pastoris* X-33 utilizando o método de choque térmico com LiCl
- Mutantes foram cultivados em meio com glicerol, peptona e ext levedura para crescimento, e depois com o mesmo meio substituindo glicerol por metanol para induzir a expressão das lipases
- A lipase foi separada por centrifugação, concentrada por ultrafiltração (30 kDa), e purificada por um sistema cromatográfico de troca iônica (FPLC)

Exemplo

Artigo: “Estabilização da Lipase B de *Candida antarctica* em Solventes Orgânicos Hidrofílicos por Desenho Racional de Ligações Hidrogênio”

Estabilidade na Presença de Metanol

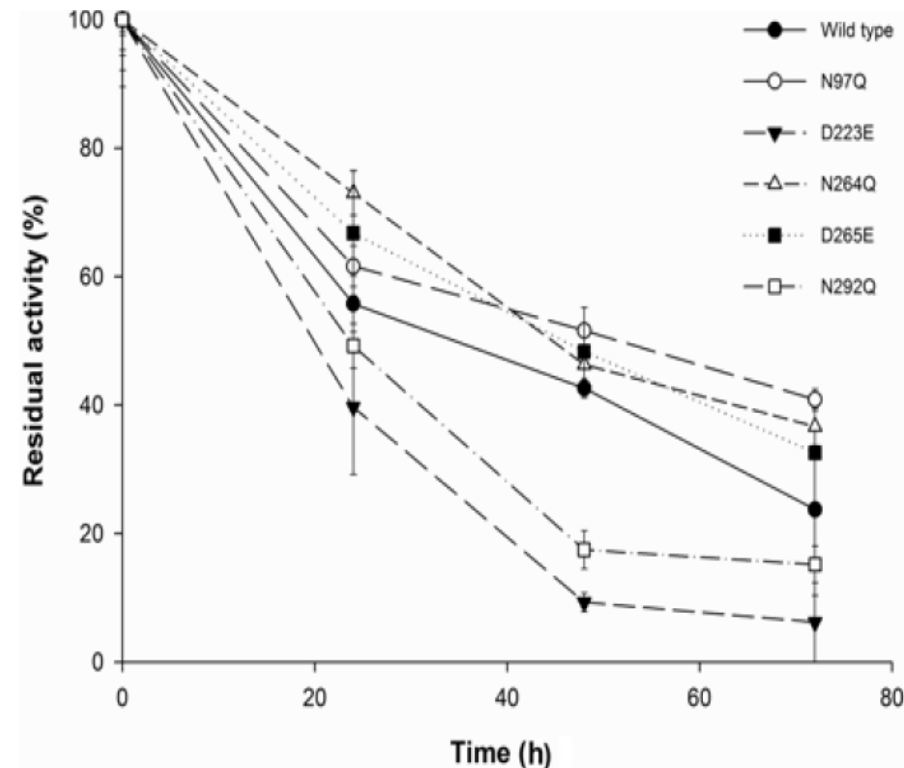


Fig. 3. Organic solvent stability of the wild type and mutants. The residual activities were measured in presence of 80% methanol.

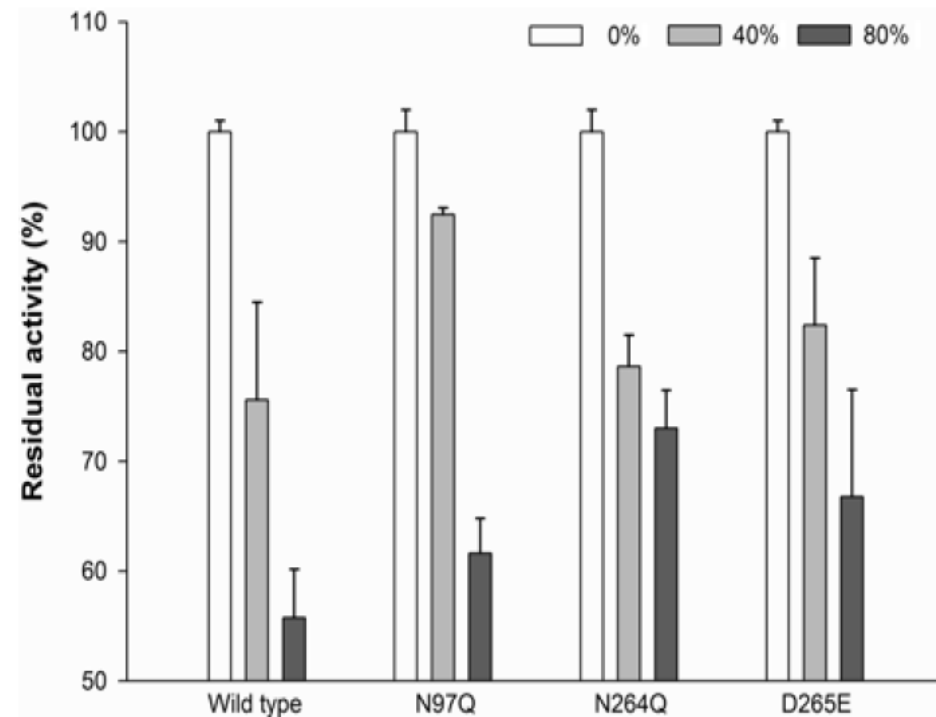


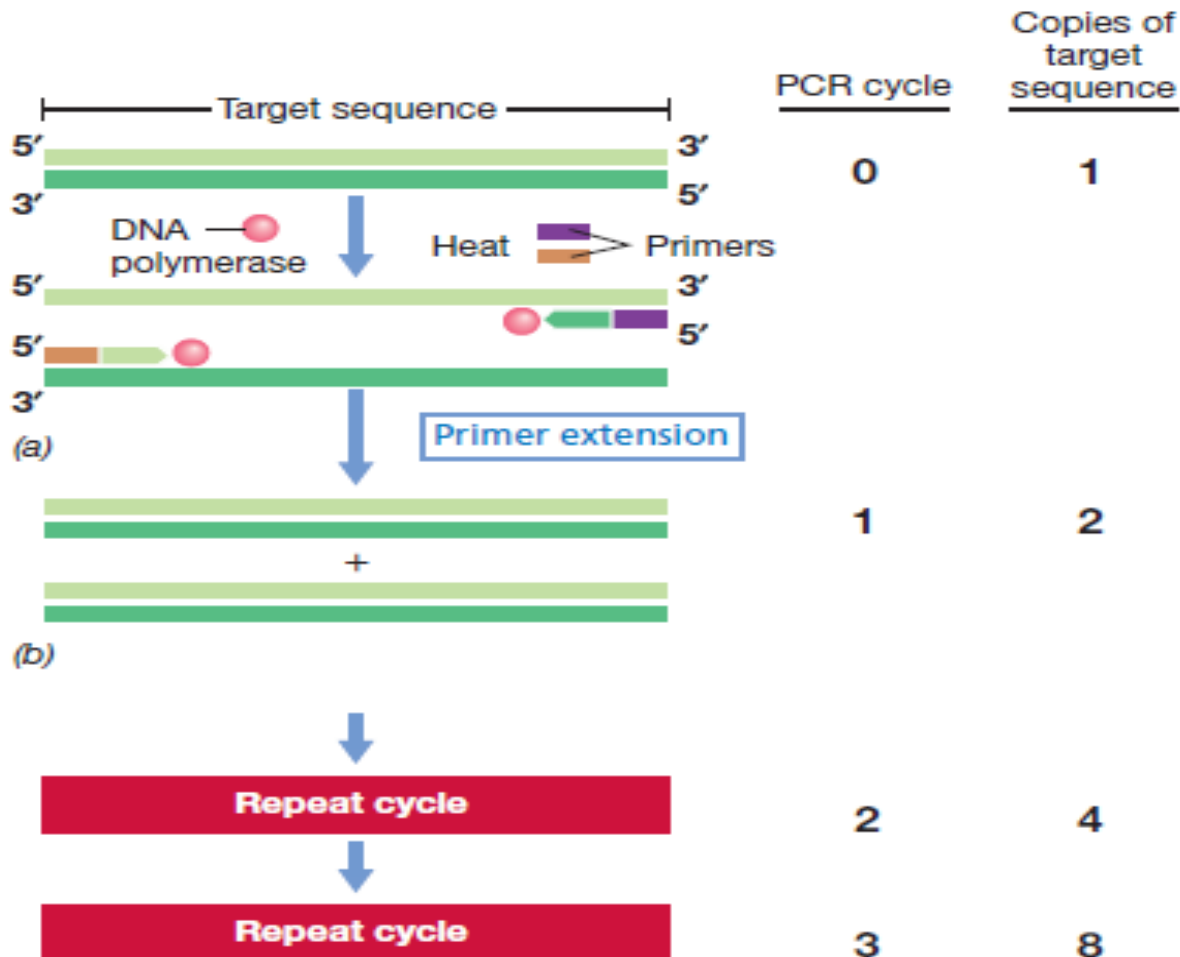
Fig. 4. Activity profile of the wild type and stable mutants. The residual activities were measured after 24 h incubation in various concentration of methanol (0, 40, and 80%).

Evolução Dirigida

Mutagênese
Aleatória



Error-Prone PCR



Evolução Dirigida

**Mutagênese
Aleatória**



Error-Prone PCR

Método baseado no aumento substancial na frequência de introdução de erros da *Taq DNA* polimerase. Isso é induzido por:

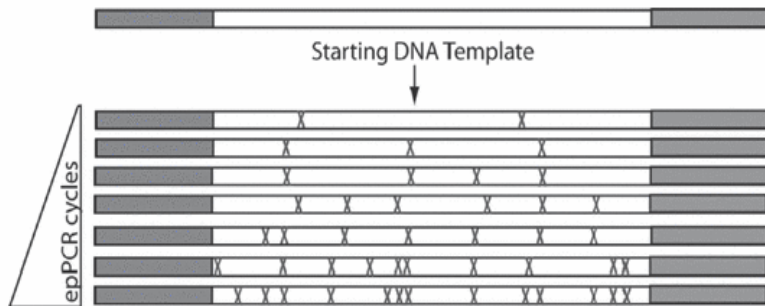


Fig. 1. Random mutagenesis by error-prone PCR. Mutations are randomly inserted into the DNA sequence under conditions that reduce the fidelity of *Taq* DNA polymerase. The number of mutations increase with the number of gene duplication events. PCR primer binding sites are denoted at the 5' and 3' of the DNA sequence and random point mutations are given as "X".

- Adição de Mn^{2+} para reduzir a especificidade do pareamento das bases
- Estequiometria desbalanceada dos desoxirribonucleotídeos trifosfatados para se obter uma incorporação errada
- Aumento da concentração de Mg^{2+} para estabilizar os pares de bases não complementares
- Aumento da concentração da enzima para aumentar a probabilidade de alongação do terminal com iniciador errado.

Evolução Dirigida

**Mutagênese
Aleatória**



Error-Prone PCR

Bioinformática



**Biblioteca de
Genes Mutantes**

<http://www.expasy.org/>

PDB; <http://www.rcsb.org/>

Seleção



*High-Throughput
Screening (HTS)*



DNA Shuffling

- Este método é empregado junto com os ensaios de seleção de mutantes
- A molécula de DNA é fragmentada fisicamente (sonicação ou por DNase I) → 50-100 bp
- Os fragmentos são purificados por eletroforese em gel, e sujeitos a 40-60 rodadas de PCR, mas sem os *primers* flanqueadores, assim se autoiniciando, e cadeia de DNA crescendo
- Os fragmentos estendidos se dissociam durante o próximo ciclo de PCR, e se autoiniciam em um diferente ponto no próximo ciclo
- Depois os produtos completos podem ser recuperados conduzindo ciclos de PCR com *primers* com purificação por eletroforese em gel da variante amplificada, e a clonagem no vetor alvo.

DNA Shuffling

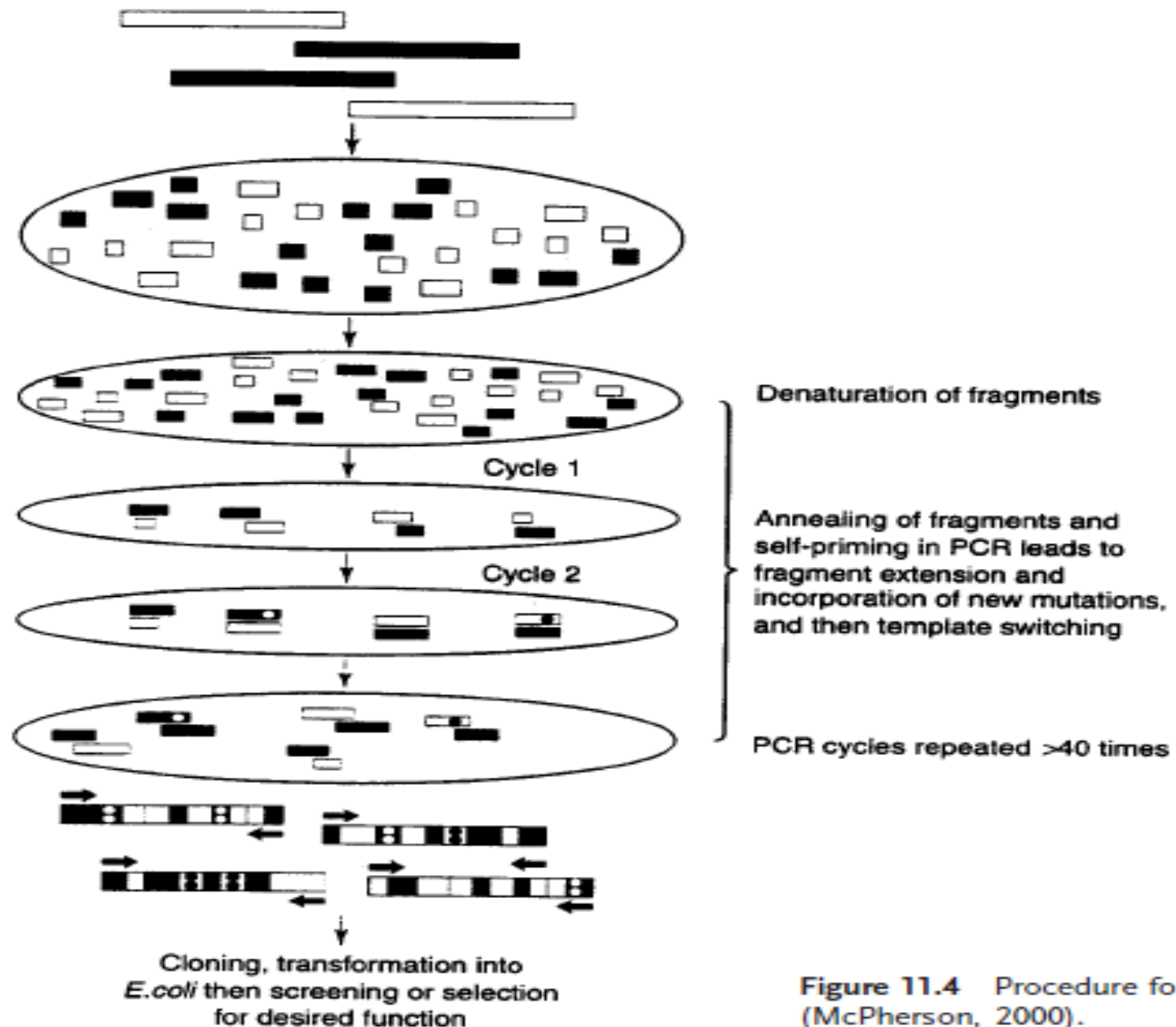


Figure 11.4 Procedure for (McPherson, 2000).

Exemplo

Artigo: “Evolução Dirigida de Alfa-amilase Maltogênica de *Bacillus* sp. TS-25”, Jones, A.; Lamsa, M.; Frandsen, T.P.; Spendler, T.; Harris, P.; Sloma, A.; Xua, F.; Nielsen, J.B.; Cherry, J.R.; J Biotechnol 134: 325-333 (2008)

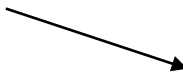
**Alfa-Amilase
Maltogênica**

Panificação



**Retarda o envelhecimento e
endurecimento dos pães**

Gelatinização da
Amilopectina



Desnaturação
da Enzima



Temperaturas: 52°C → 88°C

pH 5.5 → Ação enzimática por 3.5 min → Pão Branco

**pH 4.3 → Ação enzimática por 2.2 min → Pão de Centeio, e
Pão de Massa Azeda**

Aumentar o tempo de ação em pH mais ácido

Exemplo

Artigo: “Evolução Dirigida de Alfa-amilase Maltogênica de *Bacillus* sp. TS-25”

Mutagênese Aleatória: error-Prone PCR

Mutações foram randomicamente introduzidas no promotor de amilase bacteriana (BAN) de *B. amyloquefaciens* e na seqüência codificadora da alfa-amilase maltogenica utilizando o error-prone PCR, controlado pela alteração da concentração de $MnCl_2$ e com a mistura desbalanceada de nucleotídeos.

Biblioteca de genes

Estes fragmentos foram subclonados no plasmídeo pHP13amp da *E. coli* para criar bibliotecas de mutantes, e depois os plasmídeos de DNA resultantes são utilizados para transformação da *B. subtilis* através de *High-throughput screening*. Isso foi feito porque a eficiência de transformação da *B. subtilis* é mt inferior ao da *E. coli*.

Exemplo

Artigo: “Evolução Dirigida de Alfa-amilase Maltogênica de *Bacillus* sp. TS-25”

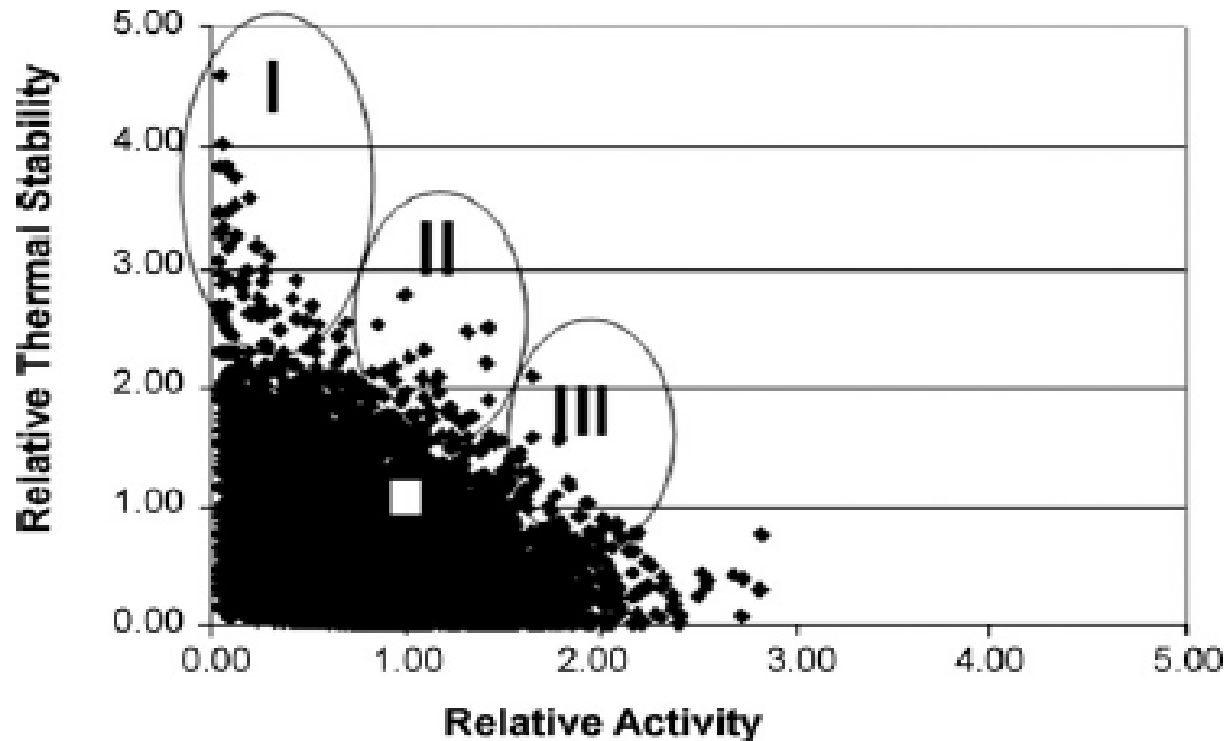


Fig. 3. Activity and thermal stability of Novamyl variants derived from error-prone PCR libraries (♦), relative to wild-type Novamyl (□). The circles encompass three classes from which variants were selected for shuffling. To simplify ranking, variants were normalized to wild-type Novamyl which was arbitrarily set at one for activity and thermal stability.

Exemplo

Artigo: “Evolução Dirigida de Alfa-amilase Maltogênica de *Bacillus* sp. TS-25”

Recombinação Aleatória: DNA shuffling

Fragmentação parcial randomica (600 bp) dos genes mutantes que apresentaram atividade amilolitica em pH mais ácido e temperaturas mais altas utilizando DNase I. Depois para recombinação foi realizado o PCR sem primers.

Produtos corretamente reunidos (promotor BAN e sequencia codificadora da amilase completos) foram re-amplificados pelo PCR utilizando primers flanqueadores, clonados no plasmideo pHP13amp para criar bibliotecas de *E. coli* recombinadas, que depois eram utilizadas na transformação de *B. subtilis*

Exemplo

Artigo: “Evolução Dirigida de Alfa-amilase Maltogênica de *Bacillus* sp. TS-25”

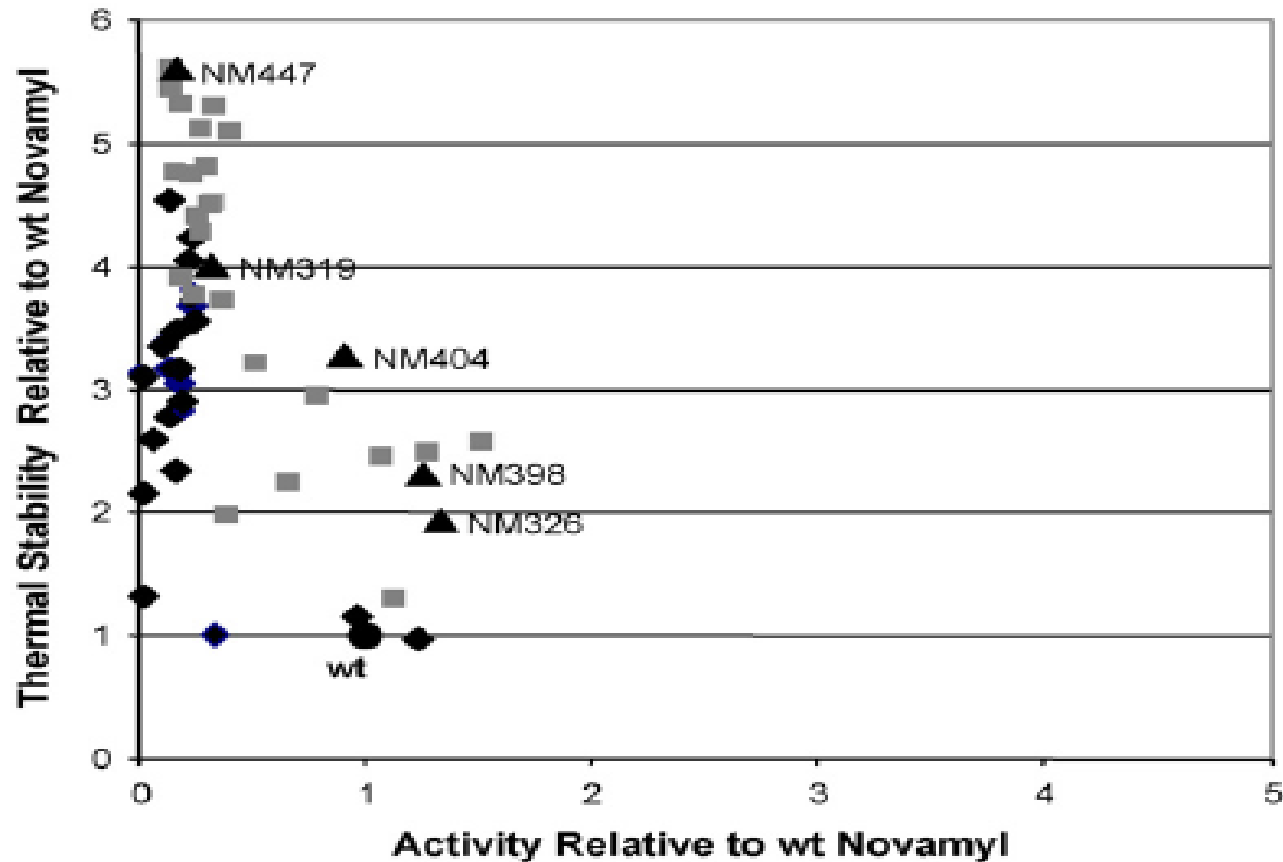


Fig. 4. Activity and thermal stability of selected Novamyl error-prone variants (◆), shuffled variants (■), and final selected variants (▲), relative to wild-type Novamyl (●). To simplify ranking, variants were normalized to wild-type Novamyl which was arbitrarily set at one for activity and thermal stability.

Exemplo

Artigo: “Evolução Dirigida de Alfa-amilase Maltogênica de *Bacillus* sp. TS-25”

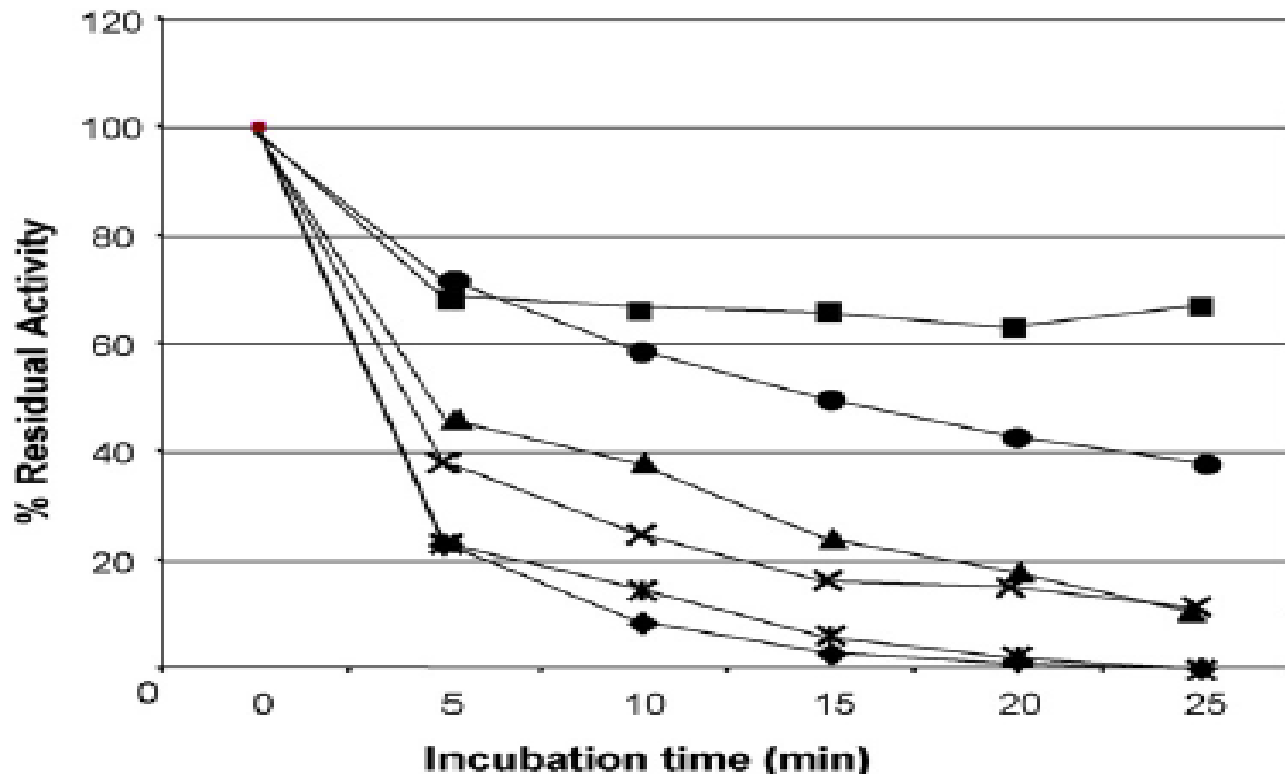


Fig. 6. Thermal stability of wild-type Novamyl (♦) and selected variants: NM447 (■), NM319 (●), NM404 (▲), NM398 (×) and NM326 (✱). Purified samples were incubated for 0, 5, 10, 15, 20 and 25 min at 80 °C in the presence of maltotriose. Time points for variants are given as a percent of the initial activity at time = 0.

Exemplo

Artigo: “Evolução Dirigida de Alfa-amilase Maltogênica de *Bacillus* sp. TS-25”



Table 1

Melting temperatures for wt Novamyl and variant NM447 at pH 4.0 and 5.0

	T_m at pH 4.0 (°C)	T_m at pH 5.0 (°C)
Novamyl wt	64	83
NM447	75	95

~ 0 5 10 15 20 25
Incubation time (min)

Fig. 6. Thermal stability of wild-type Novamyl (◆) and selected variants: NM447 (■), NM319 (●), NM404 (▲), NM398 (×) and NM326 (✕). Purified samples were incubated for 0, 5, 10, 15, 20 and 25 min at 80 °C in the presence of maltotriose. Time points for variants are given as a percent of the initial activity at time = 0.

Exemplo

Artigo: “Evolução Dirigida de Alfa-amilase Maltogênica de *Bacillus* sp. TS-25”

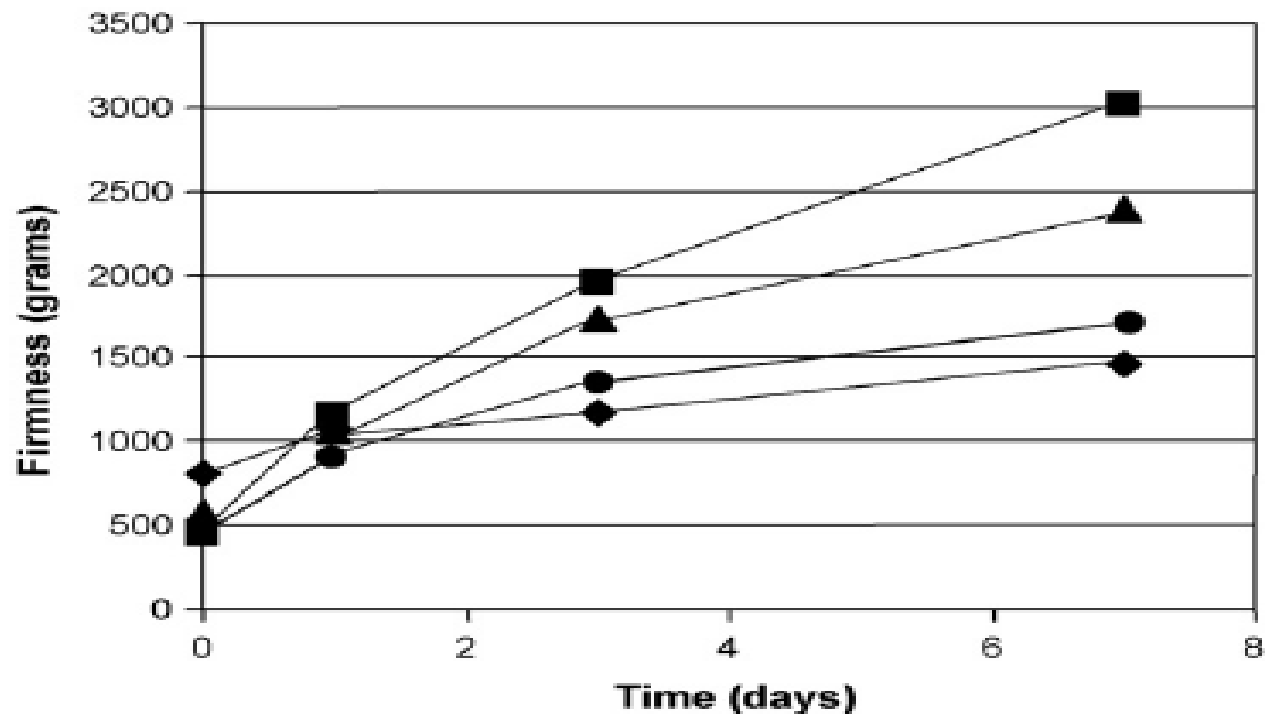


Fig. 5. Bread performance (staling) of wild-type Novamyl and variant NM447 as measured by firmness. Straight dough at pH 4.5 was supplemented with 15 mg Novamyl (◆), 3 mg Novamyl (▲), 0.5 mg variant NM447 (●), or no enzyme (■) (control). Purified enzymes and the no enzyme control were mixed with bread dough ingredients and allowed to ferment for 20 min at 24 °C. The dough was baked at 230 °C for 22 min. Baked samples were tested for initial firmness and then retested 1, 3 and 7 days after baking.

Aplicações Industriais

Enzima	Micro-organismo	Propriedade melhorada	Método	Aplicação
Beta-Glicosidase	<i>Trichoderma reesei</i>	Aumento do kcat/Km e do kcat em 5,3 e 6,9 vezes	Desenho Racional	Hidrólise de celobiose e celodextrinas
Lacase	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Aumento do Kcat/Km em 8000 vezes	Evolução Dirigida	Pré-tratamento de lignocelulosicos, síntese orgânica e bioeletrocatalise
Xylanase XT6	<i>Geobacillus stearo-thermophilus</i>	Aumento da estabilidade térmica em 52 x, e da eficiencia catalitica em 90%	Combinados	Biobranqueamento
Glicerol desidratase	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aumento da estabilidade em relação ao pH em 2x	Desenho Racional	Sintese de 1,3-propanodiol
Lipase	<i>Geobacillus</i> sp. NTU 03	Aumento da atividade em 79 vezes	Combinados	Transesterificação
Pyranose 2-oxidase	<i>Trametes multicolor</i>	Aumento da meia-vida de 7,7 min para 10 h, a 60°C	Desenho Racional	Alimentos

Estabilização

Modificação química

Monofunctionally substituted proteins

- Acylated proteins,
- alkylated proteins
- Amidation and guanidination → thermostabilization → replacement of Lys (or His) residues by Arg resulting in enhanced intramolecular or inter-subunit salt bridges.

Reticulation by glutaraldehyde and other bifunctional agents: diimides, disulfonylchlorides. Ex. dimethyl suberimide (DMS), dimethyl adipimide (DMA) and dimethyl 3,3'-dithiobispropionimide (DTBP).

Grafting to polysaccharides: Glycoproteins have interesting biological properties along with increased stability to proteolysis, heat, storage and chemical denaturants [4], which, in many cases, seems to be due to the carbohydrate part of the molecule. In addition, most glycoproteins have high water solubility. This has led to covalent attachment of dextran activated by S-triazine, cyanogen bromide or periodate to protein with high yields.

Estabilização

Modificação química

Grafting to polymers: There are relatively few reports on grafting of polymers to enzymes. In some cases the polymer-attached enzyme shows different kinetic properties and pH profiles. PVP conjugation with α -D-N-acetyl hexosaminidase showed increased enzyme stability to proteolytic attack and increased half-life, however, stability to heat and acid deactivation was similar or even slightly decreased as compared to native enzyme [4]. Polymergrafted enzymes have been patented for use in detergents, penicillin hydrolysis and other processes [4].

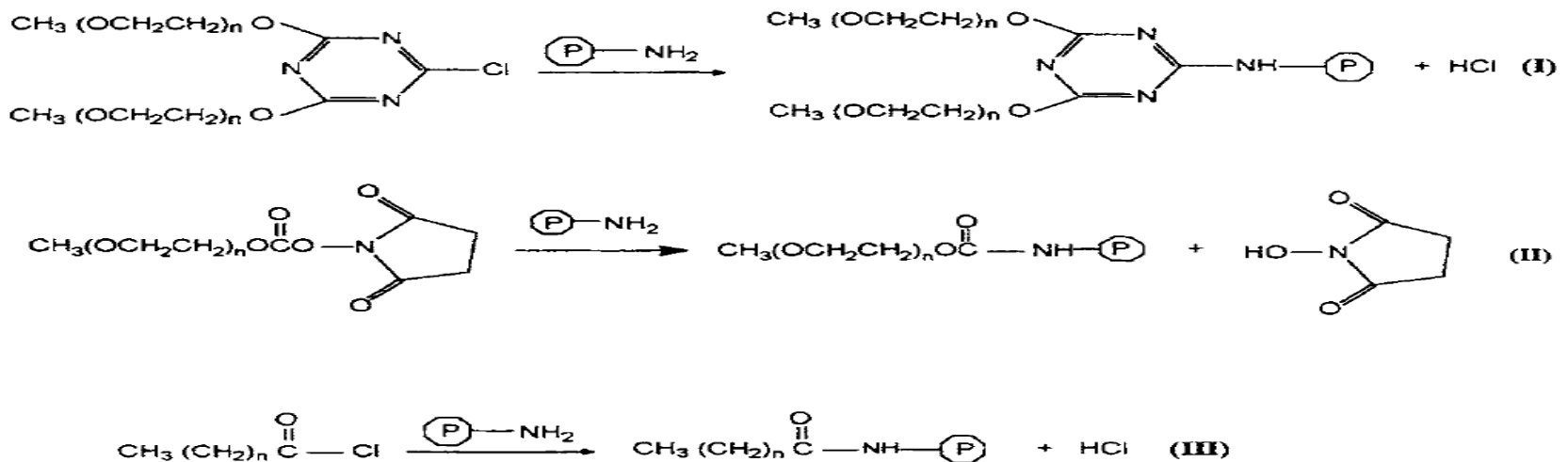


Figure 1. Scheme of the chemical modification of enzymes with: (I) methoxy-polyethylene glycol activated with triazine (TZ-PEG); (II) methoxy-polyethylene glycol activated with succinimidyl carbonate (SC-PEG); (III) fatty-acid chlorides.

Estabilização

Formulação

Addition of ligands: substrate, NAD, NADH, substrate analogues

Addition of salts:

- divalent cations on thermostability = 0.1 M
- non-specific ion effects (serie liotropica) > 0.1 M.

Addition of polyols and sugars: It has been shown that addition of sugars (trehalose, glucose, lactose, sucrose) and polyols (glycerol, sorbitol, mannitol, eritritol, xylitol e adonitol) to aqueous solutions of enzyme strengthens the hydrophobic interactions among non-polar amino acid residues leading to protein rigidification and resistance to thermodeactivation. Stabilization effect of these compounds has been attributed to a positive effect on the water activity of the medium and a decreased possibility of microbial contamination.

Another class of solutes are novel low molecular weight organic compounds like mannosylglycerate, di-glycerolphosphate, mannosylglyceramide which have been identified in thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria which may play a role in osmotic and/or thermal adjustment.

Estabilização

Formulação

Addition of DMSO and Glycerol as cryoprotectants: DMSO addition up to approx. 40% (v/v) led to 100% residual activity after 9 months for malate dehydrogenase. Glycerol when used as a cryoprotectant gives good results. Lactate dehydrogenase has been protected from damage during freeze–thawing using solutes from very dissimilar chemical classes including sugars, polyols, amino acids, methylamines, and lyotropic salts. These solutes are preferentially excluded from contact with the protein surface, thereby accounting for their cryoprotective action.

Addition of polyethylene glycols and synthetic polymers: Invertase is stabilized by incorporation of PEG in solution—an effect that increases with increasing concentration and chain length of PEG. This is due to increased solvent ordering of the medium. Studies on the thermal inactivation of glucose oxidase with time in the presence of PVA, PVP and acetylated PVA has found that PVP has stabilizing effect. This was explained by the non-specific but significant interactions between the enzyme and polymer.

Polyethyleneimine (PEI), a cationic polymer, at 0.01–1% (w/v) increased lactate dehydrogenase storage stability at 36 8C. PEI also prevented aggregation of the protein during long-term storage. Both high and low molecular weight (ca. 600,000 and 2000, respectively) PEI were equally effective.

Estabilização

Formulação

Addition of miscellaneous additives:

- Tween 20 in a concentration of 0.05% (v/v) has been found to show effective stabilization of α -amylase.
- Addition of 0.02% (w/v) Triton X-100 to a freshly prepared solution of porcine pancreatic amylase stabilized the enzyme over a period of 3 h and activated it by 41%. It has been postulated that stabilization occurs due to their binding to the enzyme-proteins to give an optimally folded and compact barrel motif structure that gives maximum activity