



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ISABELLE TAIRA SIMÕES**

**ESTUDOS DE ENZIMAS P450 DA FAMÍLIA CYP152 CAPAZES DE PROMOVER A  
DESCARBOXILAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS**

CAMPINAS

2024

**ISABELLE TAIRA SIMÕES**

**ESTUDO DE ENZIMAS P450 DA FAMÍLIA CYP152 CAPAZES DE PROMOVER A  
DESCARBOXILAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para a Saúde.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Leticia Maria Zanphorlin Murakami  
Coorientador: Dr. Wesley Cardoso Generoso

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ISABELLE TAIRA SIMÕES, ORIENTADA PELA PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> LETICIA MARIA ZANPHORLIN MURAKAMI E COORIENTADA PELO DR WESLEY CARDOSO GENEROSO.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si51e Simões, Isabelle Taira, 1997-  
Estudos de enzimas P450 da família CYP152 capazes de promover a descarboxilação de ácidos graxos / Isabelle Taira Simões. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Leticia Maria Zanphorlin Murakami.  
Coorientador: Wesley Cardoso Generoso.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Biocombustíveis. 2. Carboxilases. 3. Citocromo P-450. I. Murakami, Leticia Maria Zanphorlin, 1984-. II. Generoso, Wesley Cardoso. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Studies of P450 enzymes of the CYP152 family capable of promoting the decarboxylation of fatty acids

**Palavras-chave em inglês:**

Biofuels

Carboxy-lyases

Cytochrome P-450

**Área de concentração:** Ciências Farmacêuticas: insumos farmacêuticos naturais, biotecnológicos e sintéticos

**Títuloção:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Leticia Maria Zanphorlin Murakami

Danielle Biscaro Pedrolli

Priscila Oliveira de Giuseppe

**Data de defesa:** 23-07-2024

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Farmacêuticas

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0487-9932>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2822642324378106>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Autora** Isabelle Taira Simões

**Orientadora** Dr<sup>a</sup>. Leticia Maria Zanphorlin Murakami

**Coorientador** Dr. Wesley Cardoso Generoso

Dissertação aprovada em 23 de julho de 2024

**Comissão Examinadora**

Dr<sup>a</sup>. Leticia Maria Zanphorlin Murakami

Dr<sup>a</sup>. Danielle Biscaro Pedrolli

Dr<sup>a</sup>. Priscila Oliveira de Giuseppe

**A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.**

Campinas, 23 de julho de 2024.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Dra. Leticia Zanphorlin e ao meu co-orientador Dr. Wesley Generoso pela oportunidade e por todos os ensinamentos e paciência ao longo desses anos.

Ao Dr. Rodrigo Ledesma e Dra. Javiera López por todo o suporte e aprendizado transmitido durante meu período de BEPE.

Ao Dr. Ricardo Melo pelos ensinamentos e contribuições durante o desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas de laboratório, que sempre me incentivaram e apoiaram, deixando esta jornada mais leve e divertida. Em especial, ao Renan e Mayara por me acolherem desde o começo de meu mestrado. Ao Richard pelos 7 anos de amizade e companheirismo nos momentos mais complicados.

Aos meus amigos, sempre presentes, mesmo que não fisicamente, me apoiando e aconselhando.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a realizar meus sonhos e me ensinaram o valor da educação.

À banca avaliadora, composta por Dra. Priscilla Giuseppe e Dra. Danielle Pedrolli por aceitarem meu convite.

Ao CNPEM, em especial ao LNBr, pela infraestrutura disponibilizada para a execução do projeto.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Unicamp.

E, finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desta dissertação, meu sincero agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2021/14410-2.

## RESUMO

Nos últimos anos, a urgência em se desenvolver alternativas mais sustentáveis para a substituição de derivados de petróleo tem crescido consideravelmente. Essa demanda é impulsionada por fatores como a flutuação do preço do petróleo bruto, redução irreversível das reservas, rápido aumento da demanda global de energia, além das preocupações relacionadas ao desequilíbrio ambiental gerado pela extração e utilização dessas substâncias. Portanto, o estudo aprofundado de rotas biológicas capazes de realizar a produção de hidrocarbonetos, componentes majoritários do petróleo, a partir de matéria prima vegetal se torna uma interessante opção. A descoberta de peroxigenases P450 ganhou notoriedade devido à capacidade destas de catalisar a síntese de alcenos com uma dupla ligação no carbono  $\alpha$  a partir da reação de descarboxilação de ácido graxo livre. Apesar disso, ainda pouco se sabe sobre essas proteínas, denominadas OleTs, e alguns desafios precisam ser superados, como a obtenção de enzimas com atividade preferencial de descarboxilação sobre a hidroxilação, visto que peroxigenases P450 podem catalisar ambas reações. Nesse sentido, a compreensão dos mecanismos de reação das descarboxilases P450, assim como a descoberta de diferentes enzimas com esta atividade, são cruciais para o desenvolvimento de novas tecnologias. A presente dissertação propôs, portanto, a investigação aprofundada de novas peroxigenases P450 putativas com possíveis funções descarboxilases e suas aplicações na produção *in vitro* e *in vivo* de alcenos. As enzimas investigadas foram selecionadas a partir de análises *in-silico* por meio de redes de similaridade de sequências (SSN), em que clusteres isofuncionais foram definidos e utilizados como nichos para a busca de peroxigenases com atividade de descarboxilação. Os dados obtidos a partir de caracterizações bioquímicas indicou que as enzimas estudadas apresentam especificidades diferentes entre elas e outras reportadas na literatura. Como destaque, a peroxigenase de *Aeromicrobium yanjieii* (OleT<sub>Aer</sub>), de um cluster nunca explorado, demonstrou grande capacidade descarboxilase, com taxas de conversão de diferentes ácidos graxos e que superam, inclusive, enzimas já descritas na literatura. Esse dado possibilitou a utilização dessa OleT na construção de cepas da levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* para a produção *in vivo* de alcenos. O presente trabalho demonstrou, portanto, o potencial das enzimas descarboxilases da família CYP152 para a produção sustentável (*in vitro* e *in vivo*) de hidrocarbonetos a partir de ácidos graxos.

**Palavras-chaves: biocombustíveis drop-in, descarboxilase, citocromo P450.**

## ABSTRACT

The urgency to develop more sustainable alternatives to replace petroleum derivatives has grown considerably in recent years. This demand is driven by fluctuations in the price of crude oil, irreversible reduction in reserves, rapid increase in global energy demand, and concerns related to the environmental imbalance generated by the extraction and use of these substances. Thus, the in-depth study of biological routes capable of producing hydrocarbons, the main petroleum component, from vegetable raw materials becomes an interesting option. The discovery of P450 peroxygenase proteins gained notoriety due to their ability to catalyze the removal of oxygen from medium- to long-chain fatty acids, producing hydrocarbons. These enzymes, known as OleTs, catalyze the synthesis of alkenes with a double bond at carbon  $\alpha$ , from the free fatty acid decarboxylation reaction. However, little is known about these proteins and some challenges need to be overcome, such as obtaining enzymes with preferential decarboxylation activity over hydroxylation, since P450 peroxygenases can catalyze both reactions. In this sense, understanding the reaction mechanisms of P450 decarboxylases and the discovery of different enzymes with this activity is crucial for developing new technologies. The present dissertation therefore proposed the in-depth investigation of new putative P450 peroxygenases with possible decarboxylase functions and their applications in the in vitro and in vivo production of alkenes. The investigated enzymes were selected from in-silico analyses using sequence similarity networks (SSN). This analysis defined isofunctional clusters and used as niches to search for peroxygenases with decarboxylation activity. The data obtained from biochemical characterizations indicated that the enzymes studied have different specificities between them and others reported in the literature. As a highlight, the peroxygenase from *Aeromicrobium yanjieii* (OleT<sub>Aer</sub>), from a cluster never explored, demonstrated great decarboxylase capacity, with conversion rates of different fatty acids that surpass data already described in the literature. These results made it possible to use this OleT in the construction of strains of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for the in vivo production of alkenes. Therefore, the present work demonstrated the potential of decarboxylase enzymes from the CYP152 family for the sustainable production (in vitro and in vivo) of hydrocarbons from fatty acids.

**Keywords: drop-in biofuels, decarboxylase, cytochrome P450.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1: Ciclo catalítico do citocromo P450.</b> .....	15
<b>Figura 2: Reações de hidroxilação e descarboxilação catalisadas por peroxigenases P450.</b> .....	16
<b>Figura 3: Comparação da estrutura tridimensional da OleT<sub>JE</sub> (em roxo, código PDB 4L40) e BS<math>\beta</math> (em verde, código PDB 1IZO).</b> .....	17
<b>Figura 4: Visão geral da composição dos combustíveis atuais. Visão geral da composição dos combustíveis atuais.</b> .....	20
<b>Figura 5: Redes de similaridade de sequências (SSN).</b> .....	36
<b>Figura 6: SDS-PAGE 12% contendo amostras de diferentes etapas de purificação por cromatografia de afinidade.</b> .....	38
<b>Figura 7: Cromatografias de exclusão molecular em sistema FPLC.</b> .....	40
<b>Figura 8: SDS-PAGE 12% contendo frações coletadas da cromatografia de exclusão molecular.</b> .....	41
<b>Figura 9: SEC-MALS das proteínas P450<sub>Cav</sub>, P450<sub>Dni</sub>, P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mce</sub> e P450<sub>Mgl</sub>.</b> .....	43
<b>Figura 10: Comparação da estrutura tridimensional da OleT<sub>JE</sub> (em azul, código PDB 4L40) e do modelo da proteína P450<sub>Aer</sub>, gerado pelo servidor web ROBETTA (em vermelho).</b> .....	44
<b>Figura 11: Purificação por cromatografia de exclusão molecular e análise da P450<sub>Aer</sub><math>\Delta</math>N74 por SEC-MALS.</b> .....	46
<b>Figura 12: Espectro de dicroísmo circular (CD) obtido das enzimas P450<sub>Cav</sub>, P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mce</sub>, P450<sub>Mgl</sub>, P450<sub>Dni</sub> e P450<sub>Aer</sub>.</b> .....	47
<b>Figura 13: Análise da estabilidade térmica das enzimas e a influência de um ligante na temperatura de melting.</b> .....	48
<b>Figura 14: Avaliação da influência da salinidade na atividade enzimática.</b> .....	50
<b>Figura 15: Avaliação da influência do pH na atividade enzimática.</b> .....	51
<b>Figura 16: Avaliação da influência da temperatura na atividade enzimática.</b> .....	52
<b>Figura 17: Perfil de produção de alcenos e hidroxilados.</b> .....	54
<b>Figura 18: Corrida de gel de agarose 1% com as amostras de PCR de colônia.</b> .....	58
<b>Figura 19: Seleção de cepas com auxotrofia para leucina e uracila.</b> .....	60
<b>Figura 20: Gel de agarose das transformações em <i>Y. lipolytica</i>. As PCRs de colônia foram feitas utilizando-se o mesmo par de primers usado para a construção dos vetores.</b> .....	61
<b>Figura 21: Curvas de crescimento em meio sintético comparando as cepas engenheiradas e seus respectivos parentais.</b> .....	62
<b>Figura 22: Produção de alcenos das cepas HYDy61, HYDy54, HYDy55 e HYDy62.</b> .....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1: Genótipo das linhagens utilizadas neste trabalho. ....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 2: Genótipo dos vetores montados e utilizados neste trabalho. ....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 3: Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho. ....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 4: Valores de e-value e identidade encontrados no alinhamento das sequências de aminoácidos de P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mgl</sub>, P450<sub>Mce</sub>, P450<sub>Gsi</sub>, P450<sub>Aer</sub>, P450<sub>Cav</sub> e P450<sub>Dni</sub>, tendo a proteína modelo OleT<sub>JE</sub> e OleTP<sub>RN</sub> como referências. ....</b>	<b>37</b>
<b>Tabela 5: Valores de T<sub>m</sub> encontrados nas análises por dicroísmo circular. ....</b>	<b>49</b>
<b>Tabela 6: Valores de <math>\mu_{\text{máx}}</math> e tempo de duplicação calculados a partir de dados experimentais. ....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{M}$	Micromolar
Arg	Arginina
BS	<i>Bacillus subtilis</i>
CD	Dicroísmo circular
CYP	Citocromo P450
Dls	Espalhamento dinâmico de luz
FID	Detector por ionização de chama
FOX	<i>Ferrous oxidation-xylene orange</i>
GC	Cromatografia gasosa
Gln	Glutamina
h	Horas
His	Histidina
HS	<i>High spin</i>
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
IQ	2-amino-3-metilimidazol [4,5-f]quinolina
JE	<i>Jeotgalicoccus sp</i>
LAO	$\alpha$ -alcenos alifáticos
LS	<i>Low spin</i>
Min	Minuto
mM	Milimolar
NAD(P)H	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
nm	Nanômetro
OD	Densidade óptica
OleT	Enzimas com capacidade de catalisar a produção de olefinas terminais
Phe	Fenilalanina
s	Segundo
SP	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
SSN	Redes de similaridade de sequências
$T_m$	Temperatura de <i>melting</i>

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	13
1.1 Citocromos P450 – CYPs .....	13
1.2 Potencial biotecnológico de enzimas descarboxilases P450.....	19
1.3 Produção <i>in vivo</i> de biohidrocarbonetos .....	21
<b>2. Objetivos</b> .....	23
<b>3. Material e Métodos</b> .....	24
3.1 Linhagens de <i>Y. lipolytica</i> utilizadas neste trabalho .....	24
3.2 Vetores construídos neste trabalho .....	25
3.3 Oligonucleotídeos .....	25
3.4 Meios de cultivo.....	25
3.5 Soluções Tampão .....	27
3.6 Investigações <i>in-silico</i> das sequências de aminoácidos .....	29
3.7 Expressão da proteína heteróloga em <i>Escherichia coli</i> BL21 .....	29
3.8 Purificação das proteínas heterólogas expressas em <i>E. coli</i> BL21 .....	30
3.8.1 Lise e purificação por cromatografia de afinidade.....	30
3.8.2 Cromatografia de exclusão molecular e cálculo da concentração proteica.....	30
3.9 Caracterização da atividade peroxigenase .....	30
3.10 Análise GC para produção <i>in vitro</i> de alcenos .....	31
3.11 Análise de estrutura secundária e termo estabilidade usando técnica de dicroísmo circular (CD).....	31
3.12 Cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz em multiângulos (SEC-MALS).....	32
3.13 Construção dos vetores para transformação em <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	32
3.14 Transformação de <i>Y. lipolytica</i> .....	33
3.15 Teste de Crescimento Celular .....	33
3.16 Preparação das amostras para avaliação da produção <i>in vivo</i> de alcenos por HS-SPME .....	34
<b>4. Resultados e discussão</b> .....	35
4.1 Investigação <i>in-silico</i> de sequência de proteínas da família CYP152 .....	35
4.2 Expressão e purificação das enzimas peroxigenases P450 .....	37
4.3 Cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz em multiângulos (SEC-MALS).....	41
4.4 Mutação dirigida da enzima P450 <sub>Aer</sub> .....	44

4.5 Avaliação da estrutura secundária e desnaturação térmica.....	47
4.6 Caracterização enzimática da atividade peroxigenase .....	49
4.7 Análise de Cromatografia Gasosa (GC) para a produção de alcenos. ....	53
4.8 Seleção da enzima e construção dos vetores para produção <i>in vivo</i> de alcenos .....	56
4.9 Construção das cepas de <i>Y. lipolytica</i> para produção <i>in vivo</i> de alcenos.....	58
4.10 Teste de Crescimento das cepas de <i>Y. lipolytica</i> .....	62
4.11 Quantificação da produção de alcenos <i>in vivo</i> .....	64
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>66</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>67</b>
<b>7. Anexo — Declaração de biossegurança .....</b>	<b>71</b>

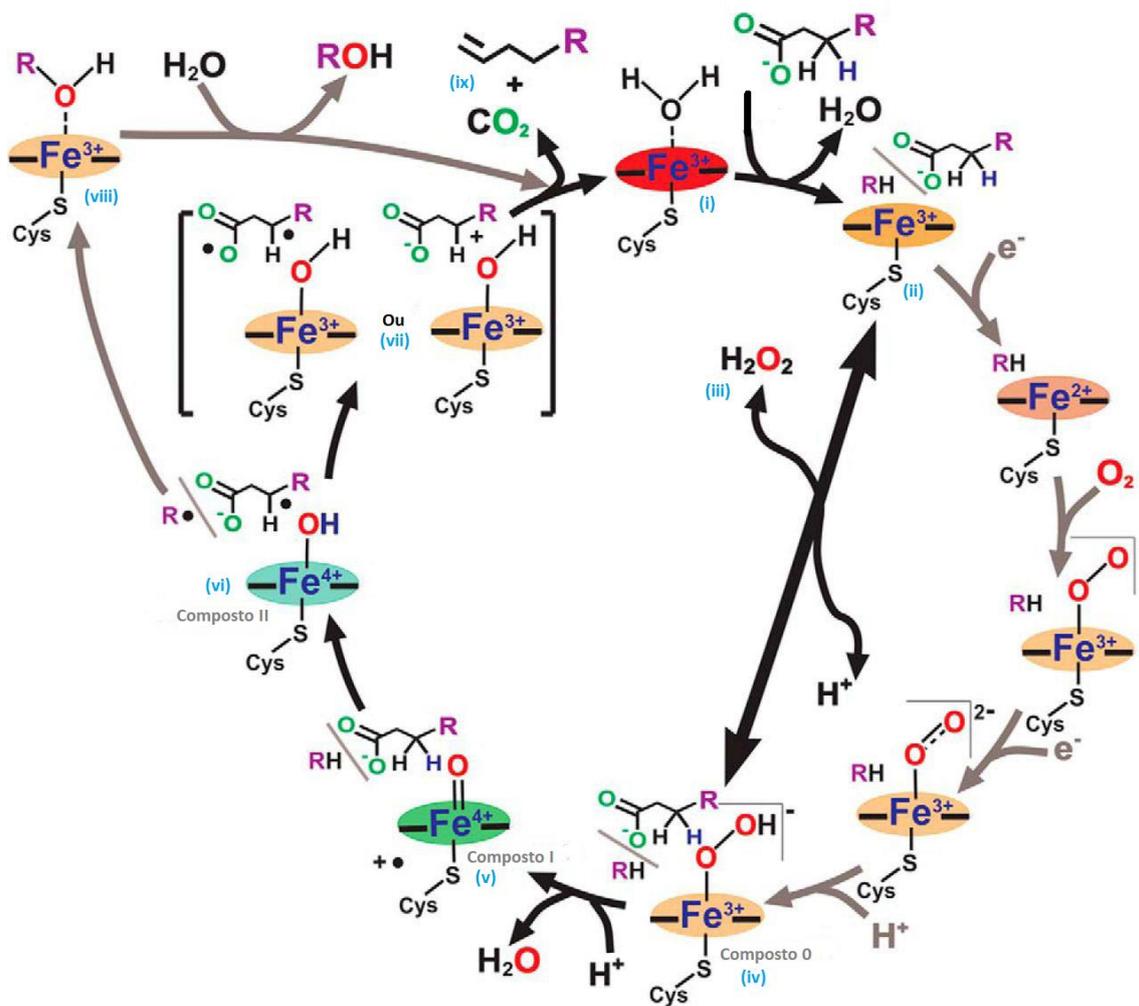
## 1. Introdução

### 1.1 Citocromos P450 – CYPs

Citocromos P450 (CYPs) são uma superfamília de enzimas presentes em arqueias, procariotos e eucariotos, capazes de realizar uma vasta diversidade de reações químicas como hidroxilações, oxidações, desalogenações, epoxidações e descarboxilações (BHARADWAJ et al., 2018). Em humanos, as CYPs desempenham um papel importante na biotransformação de fármacos e toxinas, além de atuarem no metabolismo de hormônios esteroides e ácidos graxos (GUENGERICH, 1993). A primeira etapa da detoxificação de xenobióticos envolve a biotransformação da substância ativa. Nesse contexto, as enzimas P450 atuam através de reações de hidroxilação, redução e desalquilação, tornando a molécula mais polar e, conseqüentemente, mais hidrossolúvel, facilitando sua excreção (NEBERT; GONZALEZ, 1987). Entretanto, essas transformações podem levar à formação de metabólitos mais reativos, sendo necessárias coenzimas que auxiliarão nas reações de conjugação. Na conjugação, há a transferência de uma unidade hidrofílica de um composto (ácido glicurônico, sulfatos, glutationa, aminoácidos ou acetato) para o fármaco a ser excretado. Os conjugados tendem a ser menos tóxicos, devido a menor reatividade, além de serem mais solúveis em água (NEBERT; GONZALEZ, 1987; ZEHETNER; HÖFERL; BUCHBAUER, 2019).

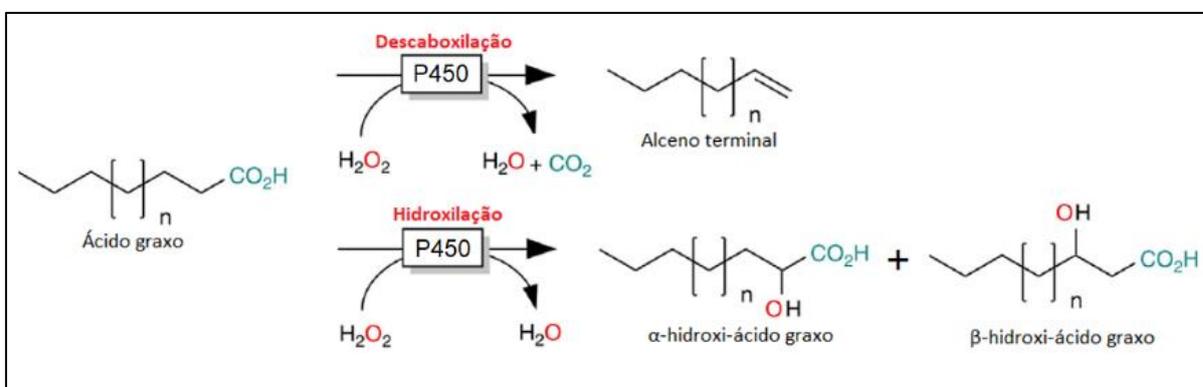
As CYPs são constituídas por um grupamento heme coordenado por um resíduo de cisteína tiolado, que possui um pico espectrofotométrico máximo (banda de Soret) no comprimento de onda de 418 nm. Em sua forma ferrosa, estas proteínas são capazes de se ligar ao monóxido de carbono, um inibidor, formando um complexo com banda de Soret próxima à 450 nm, característica que deu nome a essa superfamília (MUNRO et al., 2018). Em geral, as CYPs agem como monooxigenases, através da ligação de um dioxigênio ao ferro do grupamento heme. No ciclo catalítico canônico, essa reação é conduzida, majoritariamente, com o auxílio de parceiros redox dirigidos por NAD(P)H, responsáveis pela transferência de dois elétrons e contribuindo para a redução do heme férrico, o que possibilita a ligação da molécula de O<sub>2</sub> (GIRVAN; MUNRO, 2016; MUNRO et al., 2018). Após a ligação do dioxigênio, ocorrem duas sucessivas protonações, formando primeiramente a espécie hidroperóxido-férrico (composto 0) e, em seguida, é formado o radical altamente reativo óxido-ferril (composto I), que catalisa a inserção de um grupo hidroxila ao substrato, com conseqüente liberação de uma molécula de água durante a reação (MATTHEWS et al., 2017). A rota tradicional dos citocromos P450 pode ser observada na Figura 1.

Embora a maioria das enzimas P450 siga o ciclo catalítico canônico, estudos demonstraram a existência de caminhos alternativos adotados por CYPs que utilizam peróxido de hidrogênio (ou peróxidos orgânicos) em vez de parceiros redox, desviando o ciclo de sua rota principal. A provável origem dessas proteínas decorre de um ambiente atmosférico com pouco O<sub>2</sub>, porém, com alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sendo assim, essas enzimas podem ter se originado a partir de seres procarióticos anaeróbicos que desenvolveram a capacidade de utilizar peróxidos como doadores de oxigênio para catalisar a oxigenação de substratos (HRYCAY; BANDIERA, 2012). As peroxigenases P450, como são conhecidas estas proteínas capazes de utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, convertem diretamente a forma férrica da enzima para o composto 0, quando ligada ao substrato. Essa via alternativa, denominada “*peroxide shunt*”, embora efetiva para condições anaerobióticas, pode levar à fácil inativação da enzima, devido aos danos oxidativos causados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao grupamento heme. Entretanto, já foram identificadas algumas CYPs capazes de utilizar peróxido de hidrogênio de forma eficiente (MUNRO et al., 2018). Um destes exemplos foi apresentado por ANARI et al., 1997 que demonstrou que baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ativar a catalisação da amina aromática heterocíclica 2-amino-3-metilimidazol [4,5-f] quinolina (IQ) pela enzima P450 humana CYP1A2, produzindo metabólitos genotóxicos. Igualmente, ZHANG et al., 2002 observou que, na ausência de parceiros redox, a CYP3A4 é capaz de utilizar a via *peroxide shunt* para catalisar a reação do grupamento ciano da droga pinacidil em sua amina correspondente. De acordo com esse estudo, o mecanismo de ação da enzima envolve a oxidação nucleofílica do carbono da nitrila pelo intermediário hidroperóxido de ferro, levando à biotransformação do fármaco. Na Figura 1, está demonstrada a via *peroxide shunt*, observada em algumas CYPs.



**Figura 1: Ciclo catalítico do citocromo P450.** Em (i) a enzima P450 se apresenta em sua forma low-spin (LS), com o grupamento heme axialmente coordenado pela cisteína tiolada e uma molécula de  $H_2O$ . A ligação do substrato (ácido graxo) converte o heme férrico da enzima (ii) da forma LS para a forma high-spin (HS). A partir desta ligação, o ciclo pode seguir pelo caminho canônico (representado pelas setas cinzas) com o auxílio de parceiros redox, ocorrendo duas reações de redução, sendo a primeira responsável pela ligação do dióxigênio ( $O_2$ ), e uma protonação. Entretanto, as peroxigenases P450 podem seguir um caminho alternativo, denominado “*peroxide shunt*” (iii), no qual a interação da enzima com  $H_2O_2$  auxilia a conversão direta do ferro para sua forma transitente de hidropéroxido de ferro (composto 0). Em seguida, há uma protonação e consequente desidratação, que resulta no composto I. Posteriormente, o composto I remove um átomo de hidrogênio na posição  $C_\beta$  do substrato, resultando na formação de uma molécula radicalar e o intermediário hidróxido-ferryl, que constituem o composto II. A inserção do grupo hidroxila resulta da recombinação do substrato à enzima (viii), com subsequente liberação do produto (ROH). Outra possível via envolve uma descarboxilação da molécula, que ocorre mediante a redução do composto II pelo substrato, podendo formar uma espécie dirradical ou um carbocátion. Essas espécies reativas podem, facilmente, liberar uma molécula de  $CO_2$ , com consequente formação de uma ligação dupla entre C-C, o que resulta em um alceno terminal. Adaptado de MATTHEWS et al., 2017.

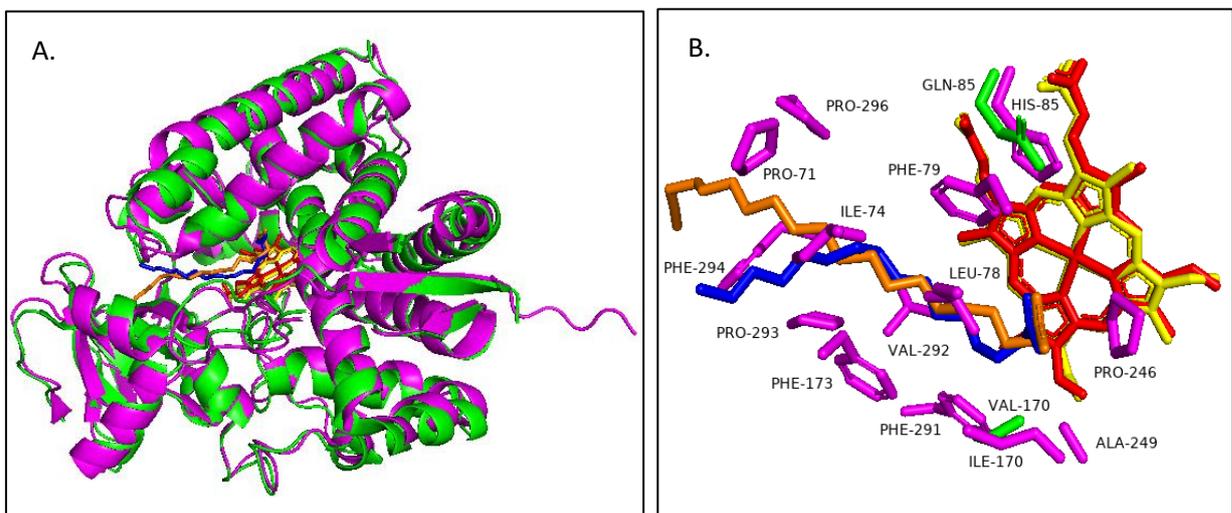
Além da rota alternativa *peroxide shunt*, outro importante desvio passível de ocorrer no ciclo de peroxigenases P450 consiste na descarboxilação atípica do substrato, principalmente nas enzimas que catalisam reações com ácidos graxos. Essa rota contrapõe-se à convencional hidroxilação, sendo proposto que o composto II seja reduzido pelo substrato, formando um dirradical ou um carbocátion, espécies reativas que podem liberar com facilidade uma molécula de CO<sub>2</sub> e, por consequência, acontece a formação de um alceno como produto final. A Figura 2 ilustra, de forma simplificada, as reações de hidroxilação e descarboxilação catalisadas por CYP152 a partir de um ácido graxo (MATTHEWS et al., 2017).



**Figura 2: Reações de hidroxilação e descarboxilação catalisadas por peroxigenases P450.** Reações de descarboxilação resultam em alcenos terminais, enquanto hidroxilações podem formar compostos α-hidroxilados ou β-hidroxilados. Adaptado de FANG et al., 2017.

Em meados de 1999, estudos conduzidos por MATSUNAGA et al., 1999, 2000 caracterizaram as peroxigenases P450 SP<sub>α</sub> (CYP152B1 de *Sphingomonas paucimobilis*) e BS<sub>β</sub> (CYP152A1 de *Bacillus subtilis*), sendo observado a formação predominante de ácidos graxos α- e β-hidroxilados, respectivamente, em reações envolvendo peróxido de hidrogênio como acceptor de oxigênio. Outra peroxigenase P450 de bastante importância é a enzima OleT<sub>JE</sub> (CYP152L1 de *Jeotgalicoccus* sp.) que, diferentemente das enzimas de *S. paucimobilis* e *B. subtilis*, é capaz de catalisar predominantemente reações de descarboxilação oxidativa de ácidos graxos de cadeias médias e longas, produzindo alcenos terminais (BELCHER et al., 2014). No entanto, embora a OleT<sub>JE</sub> promova a descarboxilação do substrato, a reação de hidroxilação, principalmente no carbono β, ainda está presente, despertando o interesse da comunidade científica em entender os mecanismos de especificidade do substrato e seletividade de reação (hidroxilação ou descarboxilação) dessas enzimas (FANG et al., 2017). Dessa maneira,

BELCHER et al., 2014 descreveu dados das propriedades bioquímicas e biofísicas da enzima OleT<sub>JE</sub>, com elucidação da estrutura cristalográfica complexada com o ácido eicosanóico (C20:0). O estudo demonstrou uma relação evolutiva próxima dessa CYP a outras peroxigenases já descritas, porém com cerca de 40% de identidade com a sequência primária de BS<sub>β</sub>. Por outro lado, foi demonstrado que a ligação ao substrato da OleT<sub>JE</sub> ocorre de modo similar a outras peroxigenases com ação hidroxilase, como pode ser observado na Figura 3. As principais diferenças entre essas enzimas referem-se ao resíduo His-85 do sítio ativo (numeração referente a OleT<sub>JE</sub>), que em BS<sub>β</sub> e SP<sub>α</sub> é substituído por glutamina, além de uma diferença conformacional de seu grupamento heme.



**Figura 3: Comparação da estrutura tridimensional da OleT<sub>JE</sub> (em roxo, código PDB 4L40) e BS<sub>β</sub> (em verde, código PDB 1IZO). (A) A sobreposição foi feita utilizando a forma ligada das enzimas. Os substratos representados são o ácido eicosanóico (em laranja, ligado à OleT<sub>JE</sub>) e o ácido palmítico (em azul, ligado à BS<sub>β</sub>). (B) Comparação entre os sítios de ligação em que é possível observar a diferença de aminoácidos entre OleT<sub>JE</sub> (His-85) e a BS<sub>β</sub> (Gln-85) e na conformação do grupamento heme (amarelo para BS<sub>β</sub> e vermelho para OleT<sub>JE</sub>). Adaptado de FANG et al., 2017.**

Estudos conduzidos por meio de mutagênese no sítio ativo da enzima OleT<sub>JE</sub> revelaram a funcionalidade de alguns resíduos de aminoácidos na descarboxilação dos substratos. No entanto, o mutante construído pela mudança da His-85 para a Gln ainda apresentou um favorecimento na formação de alcenos, indicando a presença de mecanismos redundantes na protonação e a existência de outros mecanismos chaves para a descarboxilação MATTHEWS et al., 2017. Por outro lado, a baixa capacidade desse mutante em converter o heme férrico para sua forma HS confirma o papel chave desse resíduo em descarboxilases P450. No mesmo

estudo, as mutações do resíduo Phe-79 (F79Y/W/A) resultaram na menor afinidade da enzima pelo substrato, apresentando baixa atividade com ácidos graxos de cadeias mais curtas (C10 ~ C16), além de menor conversão da forma HS do heme férrico. Já o resíduo Arg-245 aparenta ser essencial para a ligação do carboxilato do substrato no sítio ativo, pois sua mutação (R245L/E) comprometeu a atividade enzimática e a ligação ao grupamento heme.

Apesar da importância clara do papel de determinados aminoácidos no sítio ativo de enzimas peroxigenases P450, outros elementos distantes dessa região também podem influenciar a atividade de descarboxilase dessas proteínas. Assim, AMAYA et al., 2018 avaliaram o papel de aminoácidos distantes do ferro heme na proteína OleT<sub>JE</sub>, identificando uma alça estruturalmente desordenada, conhecida como F-G *loop*. Essa região é essencial no controle da liberação do produto e auxilia no ancoramento do substrato, principalmente os mais longos, afetando a mobilidade do ácido graxo no sítio ativo, além de aumentar a solvatação da bolsa catalítica, o que dificulta a recuperação do oxigênio do composto II no ciclo da enzima (AMAYA et al., 2018). A interrupção das interações entre o F-G loop e o substrato, através da mutação de um único aminoácido, é responsável pela conversão da OleT<sub>JE</sub> de descarboxilase para hidroxilase convencional. Esse resultado indica que a restrição da mobilidade do substrato no sítio ativo da enzima é uma peça-chave na regulação da atividade catalítica preferencial da OleT<sub>JE</sub>.

Em 2023, RADE et al., 2023 identificaram uma nova OleT com um mecanismo nunca observado em descarboxilases P450. A OleTP<sub>RN</sub> (descarboxilase produtora de alceno terminal e poli-insaturado de *Rothia nasimurium*) consiste em uma enzima dimérica, tolerante a altas concentrações de peróxido. Essa proteína possui um F-G loop curto, semelhante ao encontrado na P450 BS<sub>β</sub>, sem a presença de 4 resíduos observados na OleT<sub>JE</sub>, evidenciando a diversidade de mecanismos moleculares presentes em enzimas da família CYP152. Através de simulações computacionais associados à dados experimentais, foi demonstrado que a OleTP<sub>RN</sub> possui um motivo, denominado *hydrophobic cradle*, na região distal ao bolsão catalítico. Esse motivo é crucial para a capacidade de conversão de ácidos graxos de cadeia longa, além de facilitar a liberação, no sítio ativo, de produtos de cadeias mais curtas. A OleTP<sub>RN</sub> representa a única enzima da família CYP152, descrita na literatura, a adotar uma configuração dimérica. Essa característica aparenta ser crítico para a estabilização do *hydrophobic cradle* e, portanto, é essencial para o correto funcionamento da enzima. A OleTP<sub>RN</sub> apresenta ótimas taxas de produção de alcenos poli-insaturados, sem a necessidade de altas concentrações de sal durante

a catálise, características incomuns para as descarboxilases P450. Entre os substratos com boas taxas de conversão pela enzima está o ácido oleico, reportado previamente ser inibidor da OleT<sub>JE</sub> (ZACHOS et al., 2015). A ampla variedade de substratos dessa enzima é uma importante característica para a aplicação na produção de biocombustíveis, uma vez que os ácidos graxos insaturados são matérias-primas abundantes na natureza e facilmente produzidos por microrganismos que metabolizam açúcar e glicerol, por exemplo.

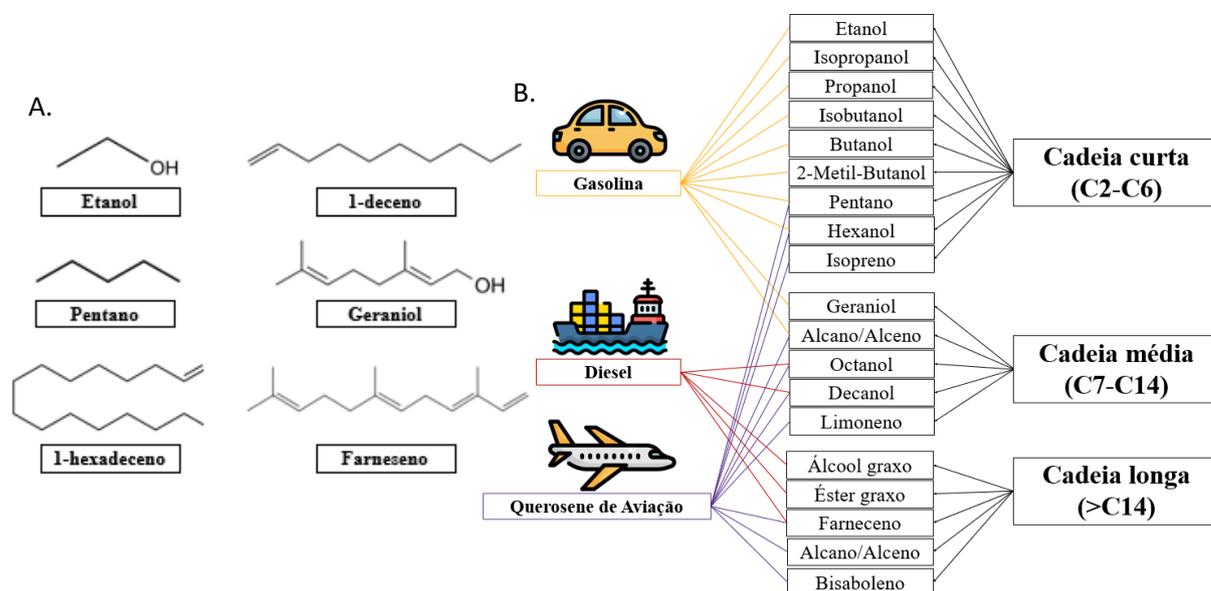
A utilização de descarboxilases para a produção industrial de alcenos depende de um entendimento aprofundado dessas enzimas, de modo a favorecer uma reação com bom rendimento e sem comprometer seu funcionamento. Apesar de haver muitos estudos com peroxigenases P450 capazes de atuar em ácidos graxos, estes se concentram em poucas proteínas. Assim, a descoberta de novas descarboxilases nativas não só favorecerá o *pool* de enzimas para a aplicação biotecnológica, como também ajudará no entendimento das características moleculares que levam à produção dos alcenos.

## 1.2 Potencial biotecnológico de enzimas descarboxilases P450

Os  $\alpha$ -alcenos alifáticos ou  $\alpha$ -olefinas (LAOs) são hidrocarbonetos de cadeia linear com ao menos uma ligação dupla entre os carbonos. Esses compostos desempenham um importante papel na indústria química, podendo ser empregados em diferentes aplicações (VAN DER KLIS et al., 2012). Enquanto hidrocarbonetos de cadeia curta podem ser usados na produção de comônômeros de polietilenos, os alcenos de cadeia longa podem ser utilizados na produção de lubrificantes e surfactantes (VAN DER KLIS et al., 2012). Atualmente, as  $\alpha$ -olefinas são predominantemente produzidas a partir do petróleo, através da oligomerização do etileno (LU et al., 2018). Considerando os impactos ambientais gerados pela extração, além de uma futura escassez de reservas petrolíferas, faz-se necessária a busca por uma rota alternativa renovável para a produção desses compostos (LIU et al., 2014).

A produção de hidrocarbonetos renováveis também pode auxiliar o desenvolvimento de biocombustíveis menos tóxicos ao meio ambiente. Combustíveis produzidos a partir da biomassa representam uma opção mais adequada ecologicamente. Apesar do bioetanol predominar no ramo dos biocombustíveis, sabe-se que os biocombustíveis *drop-in* compõem uma classe de compostos com características similares aos derivados de petróleo e possuem um grande interesse comercial (LIU et al., 2014). Os biocombustíveis *drop-in* são hidrocarbonetos,

principalmente alcenos e alcanos de cadeias médias a longas, que podem surgir como uma opção mais sustentável para o setor de locomoção. Um dos parâmetros utilizados para distinguir os combustíveis se baseia no tamanho da cadeia carbônica da molécula em questão. A gasolina tradicional é normalmente empregada em motores de ignição por centelha e compreende uma mistura de hidrocarbonetos C4 ~ C12, enquanto o diesel é utilizado, principalmente, em motores de compressão, com hidrocarbonetos C10 ~ C22. O combustível de aviação é uma mistura de moléculas C8 ~ C16, com um máximo de conteúdo aromático de 25%, além de diversas outras especificações, como ponto de congelamento abaixo de -40 °C (KARATZOS; MCMILLAN; SADDLER, 2014). Dessa maneira, o bioetanol, assim como o biodiesel, não são capazes de suprir a demanda desse setor e, por isso, os biocombustíveis *drop-in* serão cada vez mais necessários. Outra vantagem consiste na compatibilidade desse fluido com a infraestrutura de motores de veículos de transporte utilizada atualmente, não havendo a necessidade, portanto, de maiores adaptações do mercado (KARATZOS et al., 2017; KARATZOS; MCMILLAN; SADDLER, 2014). Na Figura 4 estão representados os principais componentes de combustíveis utilizados atualmente, assim como suas respectivas aplicações, de acordo com sua cadeia carbônica.



**Figura 4: Visão geral da composição dos combustíveis atuais.** (A) Representação molecular de alguns componentes dos combustíveis. (B) Os combustíveis podem ser divididos em 3 categorias, de acordo com o número de átomos de carbono em sua estrutura. A gasolina, o diesel e o querosene de aviação possuem composições diferentes, afetando as características intrínsecas de cada fluido. Adaptado de LIU et al., 2021.

A conversão da biomassa vegetal em hidrocarbonetos compatíveis com os obtidos a partir do petróleo surge como uma medida eficaz para diminuir a nossa dependência da indústria petroquímica. Assim, entre as alternativas de produção de alcenos de forma biotecnológica, está a descarboxilação direta de ácidos graxos livres através de catálises enzimáticas (VAN DER KLIS et al., 2012). Porém, apesar da utilização de enzimas livres ser uma possibilidade neste cenário, o processo de purificação de proteínas encarece o bioprocessamento, conferindo uma desvantagem no contexto industrial (ZHANG, 2010). Desta maneira, a utilização de chassis biológicos robustos, que viabilizem a obtenção da molécula de interesse, se apresentam como uma solução a esse entrave econômico. Entretanto, um desafio ainda encontrado na produção microbiana de hidrocarbonetos renováveis é a falta de um microrganismo capaz de produzir grandes quantidades do metabólito de interesse por meio de modificações na regulação endógena da via de produção. Nesse sentido, a engenharia genética de microrganismos se apresenta como uma via alternativa a esse entrave, além de permitir o estudo de funções enzimáticas (PERALTA-YAHYA et al., 2012a).

### **1.3 Produção *in vivo* de biohidrocarbonetos**

A obtenção de lipídios, atualmente, ocorre através de extrações químicas realizadas a partir de matérias vegetal ou animal. Esse processo, portanto, provoca questionamentos a respeito da sustentabilidade da produção dessas moléculas, além de uma competição com a indústria alimentícia (WANG et al., 2022). Nesse sentido, microrganismos oleaginosos surgem como uma interessante alternativa de chassi para a produção sustentável de hidrocarbonetos a partir de ácidos graxos. Esses seres são capazes de acumular grandes quantidades de lipídeos, podendo atingir cerca de 20% do peso seco celular. Diversas abordagens utilizando ferramentas de engenharia genética já foram empregadas na tentativa de transformar organismos modelos, como *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, em microrganismos oleaginosos (LEDESMA-AMARO; NICAUD, 2016). Entretanto, alguns organismos são capazes de produzir e acumular, naturalmente, grandes quantidades de lipídeos, sem a necessidade de engenharia genética prévia. Entre eles, destaca-se a levedura *Yarrowia lipolytica*, devido às suas características fisiológicas e biotecnológicas, como as diversas ferramentas genéticas disponíveis para esse microrganismo e uma alta capacidade intrínseca de lipogênese. Além disso, *Y. lipolytica* é um organismo não patogênico, geralmente considerado seguro (generally

regarded as safe - GRAS) e consegue crescer em substratos hidrofóbicos de baixo custo (LIU et al., 2021a).

O desenvolvimento da biologia sintética e engenharia genética de microrganismos oleaginosos possibilita a produção *in vivo* de diversas moléculas derivadas de ácidos graxos. Em 2019, BRUDER et al., 2019 demonstrou que a superexpressão da fotodescarboxilase CvFap (da microalga *Chlorella variabilis*) em diferentes cepas de *Y. lipolytica* promove a produção de alcanos. A atividade de descarboxilação da proteína CvFap é dependente da luz azul (entre 400 e 520 nm) e essa enzima demonstra atividade catalítica em ácidos graxos de cadeias C12 ~ C22 (SORIGUÉ et al., 2017). O estudo revelou que a conversão de ácidos graxos livres (*free fatty acids* – FFA) em hidrocarbonetos ocorre em uma única etapa e, embora altas intensidades e tempo de exposição de luz promovam um aumento na atividade enzimática, favorecendo a produção de alcanos, isso pode impactar negativamente no crescimento microbiano. Em contraste à CvFap, as descarboxilases da família CYP152 não necessitam de luz durante a catálise, entretanto, essas enzimas nunca foram expressas em *Y. lipolytica*. CHEN; LEE; CHANG, 2015 demonstrou o potencial das P450 peroxigenases na produção *in vivo* de hidrocarbonetos ao expressar a OleT<sub>JE</sub> e outros sete genes homólogos em *S. cerevisiae*, resultando na produção de alcenos a partir do consumo de açúcares. Porém, esse estudo demandou o engenheiramento da cepa de *S. cerevisiae* para a produção de FFA, melhoramento na produção de cofatores, ajuste de expressão genética e otimização da fermentação.

Embora as descarboxilases CYP152 possuam um grande potencial biotecnológico na produção sustentável de hidrocarbonetos utilizando leveduras oleaginosas como chassis, poucas enzimas já foram exploradas para construção de uma via metabólica para a conversão de ácidos graxos em alcenos. A falta de enzimas capazes de produzir uma grande quantidade de alcenos e o escasso conhecimento sobre elas até o momento, implica na necessidade de investigação de novas proteínas descarboxilases para uma melhor aplicação tanto *in vivo* quanto *in vitro* dessas proteínas (PERALTA-YAHYA et al., 2012b). Este projeto visa, portanto, a produção sustentável de alcenos, utilizando técnicas de enzimologia, para a investigação de novas peroxigenases P450 com potencial para descarboxilação de ácidos graxos, aliado a estratégias de biologia sintética para a produção *in vivo* desses compostos.

## 2. Objetivos

Este estudo teve como proposta investigar novas peroxigenases P450 da família CYP152, visando a descoberta de enzimas descarboxilases com potencial de síntese de alcenos *in vitro* e *in vivo* a partir de ácidos graxos, utilizando-se uma combinação de técnicas estruturais, espectroscópicas e bioquímicas. Deste modo, os objetivos específicos desse projeto, foram:

- 2.1 *Screening* de proteínas com potencial atividade de descarboxilase através de dados *in silico*;
- 2.2 Expressar e purificar as proteínas selecionadas por cromatografia de afinidade e de exclusão para se obter as proteínas puras solúveis;
- 2.3 Caracterizar bioquimicamente as enzimas para a identificação dos parâmetros ótimos de atividade;
- 2.4 Caracterizar biofisicamente as enzimas em relação à estrutura secundária e termo-estabilidade da proteína;
- 2.5 Determinar, por análise de GC-FID, o tipo predominante de atividade (hidroxilação ou descarboxilação) e especificidade de substrato de cada enzima;
- 2.6 Construir os vetores e as cepas para a expressão em *Y. lipolytica* da proteína com os melhores resultados obtidos *in vitro*;
- 2.7 Avaliar o crescimento e produção de alcenos das cepas construídas.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Linhagens de *Y. lipolytica* utilizadas neste trabalho

<b>Linhagem</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Referência</b>
po1d	MATa; $\Delta$ ura3-302; $\Delta$ leu2-270; xpr2-322	(NICAUD et al., 1989)
JMY5746	$\Delta$ mfe1; $\Delta$ faa1; pTEF-DGA2; pTEF-TGL4; pTEF-ScTGL3	(LEDESMA-AMARO et al., 2016)
Obese	MATa; $\Delta$ ura3-302; $\Delta$ leu2-270; xpr2-322; $\Delta$ pox1-6; $\Delta$ tgl4; pTEF-DGA2; pTEF-GPD1	(LAZAR et al., 2014)
po1d-prototrophic	po1d, URA3, LEU2	Rodrigo-Ledesma Collection
JMY5381	$\Delta$ mfe1; $\Delta$ faa1; $\Delta$ dga1; $\Delta$ dga2; $\Delta$ are1; $\Delta$ lro1; pTEF-RnTEII	(LEDESMA-AMARO et al., 2016)
Obese-prototrophic	Obese, LEU2, URA3	Rodrigo-Ledesma Collection
HYDy41	JMY5746; pTEF1-OleT <sub>Aer</sub> -LEU2	Este trabalho
HYDy43	JMY5746; $\Delta$ leu2	Este trabalho
HYDy45	JMY5746; 8UASpTEF1-OleT <sub>Aer</sub> -LEU2	Este trabalho
HYDy49	JMY5381; $\Delta$ ura3; $\Delta$ leu2	Este trabalho
HYDy50	po1d; pTEF1-OleT <sub>Aer</sub> -LEU2; URA3	Este trabalho
HYDy51	Obese; pTEF1-OleT <sub>Aer</sub> -LEU2; URA3	Este trabalho
HYDy52	po1d; 8UASpTEF1-OleT <sub>Aer</sub> -LEU2; URA3	Este trabalho
HYDy53	Obese; 8UASpTEF1-OleT <sub>Aer</sub> -LEU2; URA3	Este trabalho
HYDy54	JMY5381; pTEF1-OleT <sub>Aer</sub> -LEU2; URA3	Este trabalho
HYDy55	JMY5381; 8UASpTEF1-OleT <sub>Aer</sub> -LEU2; URA3	Este trabalho
HYDy57	JMY5746; 8UASpTEF1-OleTP <sub>RN</sub> -LEU2	Este trabalho
HYDy60	po1d; 8UASpTEF1-OleTP <sub>RN</sub> -LEU2; URA3	Este trabalho
HYDy61	Obese; 8UASpTEF1-OleTP <sub>RN</sub> -LEU2; URA3	Este trabalho
HYDy62	JMY5381; 8UAS-pTEF1-OleTP <sub>RN</sub> -LEU2; URA3	Este trabalho

**Tabela 1: Genótipo das linhagens utilizadas neste trabalho.**

### 3.2 Vetores construídos neste trabalho

Plasmídeo	Genótipo
pHYD57	ColE1; Spc; LEU2; 8UAS_TEF-OleT <sub>Aer</sub> -PTS1
pHYD58	ColE1; Spc; LEU2; TEF-OleT <sub>Aer</sub> -PTS1
pHYD60	ColE1; Spc; LEU2; 8UAS_TEF-OleTP <sub>RN</sub> -PTS1

**Tabela 2: Genótipo dos vetores montados e utilizados neste trabalho.**

### 3.3 Oligonucleotídeos

Oligonucleotídeo	Sequência
pTEF1-Fw	5'-CCAATTGCCCAATTGAC-3'
OleT <sub>Aer</sub> -Rv	5'-GACTCGAACAGGATAGAGC-3'
OleTP <sub>RN</sub> -Rv	5'-CAGTTCGGTATCCTCCTTAAC-3'
PromoterT7-Fw	5'-AATACGACTCATATAGGG-3'
TerminatorT7-Rv	5'-GCTAGTATTGCTCAGCGG-3'
OleTAer $\Delta$ N74-Fw	5'-CAGCCATATGTCCTTACGGTCGTGACCACTCTCTG-3'
OleTAer $\Delta$ N74-Rv	5'-CGACCGTAAGACATATGGCTGCCGCGCG-3'

**Tabela 3: Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.**

### 3.4 Meios de cultivo

#### 3.4.1 Meio LB (Luria Bertani)

Triptona	1% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Cloreto de sódio	0,17 M
Ágar (se sólido)	2% (p/v)

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o volume final foi acertado. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C por 20 min.

### 3.4.2 Meio TB (Terrific Broth)

Triptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	2,4 % (p/v)
Glicerol	0,5 % (p/v)
Tampão fosfato de potássio (pH 7,5)	90 mM

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o volume final foi acertado. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C por 20 min.

### 3.4.3 Meio YPD

Peptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	1% (p/v)
Dextrose	2% (p/v)
Ágar (se sólido)	2% (p/v)

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o volume final foi acertado. A solução de dextrose foi esterilizada separadamente e depois adicionado ao meio. A esterilização do meio ocorreu por calor úmido em autoclave a 120 °C por 20 min.

### 3.4.4 Meio YD

Extrato de levedura	1% (p/v)
Dextrose	2% (p/v)
Ágar (se sólido)	2% (p/v)

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o volume final foi acertado. A solução de dextrose foi esterilizada separadamente. A esterilização do meio ocorreu por calor úmido em autoclave a 120 °C por 20 min.

### 3.4.5 Meio SMD

YNB (sem aminoácidos e sulfato de amônio)	0,17% (p/v)
Dextrose	2% (p/v)
Cloreto de Amônio	0,5% (p/v)
Tampão Fosfato de sódio (pH 6.8)	50 mM
Ágar (se sólido)	2% (p/v)

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o volume final foi acertado. As soluções foram esterilizadas separadamente. As soluções estoques de YNB, Cloreto de Amônio e tampão fosfato de sódio foram filtradas em filtros de poros de 22  $\mu$ M. A dextrose e o ágar (quando sólido) foram autoclavados a 120 °C por 20 min.

### 3.4.6 Meio SMD 6%

YNB (sem aminoácidos e sulfato de amônio)	0,17% (p/v)
Dextrose	6% (p/v)
Cloreto de Amônio	0,15% (p/v)
Tampão Fosfato de sódio (pH 6.8)	50 mM

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o volume final foi acertado. As soluções foram esterilizadas separadamente. As soluções estoques de YNB, Cloreto de Amônio e tampão fosfato de sódio foram filtradas em filtros de poros de 22  $\mu$ M. A dextrose e o ágar (quando sólido) foram autoclavados a 120 °C por 20 min.

## 3.5 Soluções Tampão

### 3.5.1 Tampão A

Tampão Fosfato de Sódio (pH 7.5)	30 mM
NaCl	250 mM

Glicerol	5% (v/v)
Imidazol	30 mM
Triton X-100	0,5 % (v/v)

Após a adição dos componentes, o pH foi ajustado para 7,5 e o volume final foi acertado.

### **3.5.2 Tampão B**

Tampão Fosfato de Sódio (pH 7.5)	30 mM
NaCl	250 mM
Glicerol	5% (v/v)
Imidazol	500 mM

Após a adição dos componentes, o pH foi ajustado para 7,5 e o volume final foi acertado.

### **3.5.3 Tampão C**

Tampão Fosfato de Sódio (pH 7.5)	30 mM
NaCl	300 mM
Glicerol	5% (v/v)

Após a adição dos componentes, o pH foi ajustado para 7,5 e o volume final foi acertado.

Importante ressaltar que, exclusivamente para a proteína Mce, utilizou-se 600 mM de NaCl.

### **3.5.4 Tampão Fosfato-Citrato-Glicina**

Glicina	50 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM

Ácido Cítrico

50 mM

Após a adição dos componentes, o pH foi ajustado em um range de 4,0 a 10 e o volume ajustado.

### 3.6 Investigações *in-silico* das sequências de aminoácidos

As proteínas P450 investigadas nesse projeto foram definidas a partir de redes de similaridade de sequência (*Sequence Similarity Networks* - SSN) desenvolvida no software Cytoscape e em parceria com o grupo de Ômicas Integrativas, sob liderança da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Felix Persinoti do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR). A sequência da enzima OleTP<sub>RN</sub> foi usada como modelo para potenciais novas descarboxilases. A análise de SSN foi construída utilizando um cutoff com e-value de  $1e^{-10}$  e com sequências conectadas de pontuação de alinhamento de, pelo menos, 90. O alinhamento das sequências foi realizado com a ferramenta Blastp.

### 3.7 Expressão da proteína heteróloga em *Escherichia coli* BL21

Os genes utilizados neste projeto foram adquiridos comercialmente no vetor pET28a, fusionados a uma cauda de histidina na região N-terminal. Inicialmente, o plasmídeo foi utilizado para transformação de cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  pelo método de choque térmico, de acordo com SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989. Selecionou-se uma colônia de cada transformação, cultivando-as por 16h, 37 °C a 220 rpm em meio líquido LB com canamicina 50  $\mu$ g/mL. A extração dos plasmídeos ocorreu através do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification da Promega. Os plasmídeos extraídos foram utilizados nas transformações da cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3), contendo o gene hemA, responsável pela codificação da enzima ácido delta-aminolevulínico sintase, catalisador a síntese de ácido 5-aminolevulínico (precursor na via de síntese de porfirinas). A cepa de expressão contendo o gene da hemA foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa da Dr<sup>a</sup>. Leticia Zanphorlin e Dr. Wesley Generoso. Após a transformação, as cepas foram cultivadas em meio TB, suplementado com tiamina 500  $\mu$ M e FeCl<sub>3</sub> 50  $\mu$ M, a 30 °C e 220 rpm, até atingir a densidade óptica em 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) de 0,8. Ao atingir a DO, a temperatura de cultivo foi modificada para 18 °C, com o objetivo de diminuir a taxa metabólica das células. A indução da expressão gênica ocorreu após 30 minutos da incubação à 18 °C, com a adição de IPTG na concentração final de 0,5 mM. O cultivo foi mantido na mesma temperatura e rotação por 24h.

### **3.8 Purificação das proteínas heterólogas expressas em *E. coli* BL21**

#### **3.8.1 Lise e purificação por cromatografia de afinidade**

Para a purificação da proteína recombinante, a cultura foi centrifugada a 7.000 g e o pellet foi ressuspendido em Tampão A contendo 0,5% de Triton X-100. A lise celular ocorreu em sonicador Sonics Vibra-Cell™ com ciclos de 4 minutos de duração, com pulsos de 60 s e intervalo de 60 s, com amplitude de 40%, mantendo-se as amostras em banho de gelo. Foram realizados 3 ciclos de sonicação, com intervalo de 15 min para homogeneização à 4 °C em agitador linear. O lisado foi centrifugado a 15.000 g por 50 min e o sobrenadante foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de cobalto, com fluxo por gravidade. O sistema foi previamente equilibrado utilizando-se Tampão A e, após a adição da amostra, fez-se uma lavagem com 50 mL utilizando Tampão A. A eluição ocorreu utilizando-se 100% de Tampão B e as amostras foram analisadas em gel de SDS-PAGE 12%.

#### **3.8.2 Cromatografia de exclusão molecular e cálculo da concentração proteica**

As amostras provenientes da cromatografia de afinidade seguiram para uma segunda etapa de purificação em coluna de exclusão molecular (Superdex 200 16/60) acoplada ao sistema AKTA-FPLC (GE Healthcare) previamente equilibrada com Tampão C. A corrida foi realizada em fluxo de 1 mL/min e monitorada no comprimento de onda de 420 nm (referente à absorção do grupamento heme presente nas enzimas P450). Os picos foram analisados em gel de SDS-PAGE 12%. As amostras foram concentradas utilizando-se Amicon Ultra-4 30 kDa (Millipore) e a concentração das proteínas foi calculada a partir da absorbância observada em 420 nm.

### **3.9 Caracterização da atividade peroxigenase**

A atividade peroxigenase das enzimas foi analisada bioquimicamente utilizando-se o reagente FOX (*Ferrous Oxidation in Xylenol orange*), conforme descrito por DELONG et al., 2002. A atividade enzimática foi avaliada em microplacas de 96 poços com 100 µL de cada reação contendo ácido palmítico (C16:0) 500 µM e 1 µM de enzima em tampão fosfato de sódio 50 mM (para pH 7,5) ou tampão fosfato-citrato-glicina (para a realização das curvas variando-se o pH entre 4 a 10). As amostras foram incubadas a 37 °C em termociclador por 5 min e, posteriormente, adicionou-se 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As amostras foram novamente incubadas a 37

°C por 15 min, com posterior adição do reagente FOX [*xylenol orange* 0,25 mM e Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 mM em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM]. Após 5 min de incubação a 60 °C, a DO<sub>560nm</sub> foi medida no Infinite® 200 PRO reader e os dados foram utilizados para a estimativa relativa de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tendo o valor mais alto de absorvância como referência para cada curva (sendo este valor considerado o 100%). O software GraphPad Prism 8 foi utilizado para o tratamento de dados e elaboração dos gráficos.

### 3.10 Análise GC para produção *in vitro* de alcenos

As reações enzimáticas com ácidos graxos foram submetidas à análise de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) para a quantificação dos produtos. O volume final utilizado nas reações foi de 500 µL, contendo 500 µM de substrato, 1 µM de enzima e 1 mM de peróxido de hidrogênio adicionado lentamente à solução (1 µM da solução estoque a cada 10 min). O tempo total das reações foi de 80 min, com interrupção da atividade enzimática através da adição de 5 µL de HCl 50% [v/v]. O padrão interno contendo C17:0 e C11:1 foi adicionado às amostras para posterior quantificação dos alcenos, hidroxilados e ácidos graxos remanescentes. Para a extração dos produtos, utilizou-se 500 µL de clorofórmio, com posterior agitação das amostras em vortex por 5 min. A fase orgânica foi coletada e transferida para frascos de vidro, após 5 min de centrifugação à 4.000 g em temperatura ambiente. Posteriormente, realizou-se a derivatização das amostras adicionando-se 25 µL de HCl 2M-metanólico e incubando à 50 °C por 30 min em banho úmido. Adicionou-se 40 µL de KOH 2M-metanólico e 600 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura. Após 5 min de agitação em vórtex e 5 min de centrifugação à 4.000 g em temperatura ambiente, a fase aquosa foi removida e as amostras enviadas ao grupo de Química Molecular, do LNBr, para as corridas em GC-FID. O volume de injeção no sistema foi de 1 µL. O software Microsoft Excel foi utilizado para a elaboração dos gráficos.

### 3.11 Análise de estrutura secundária e termo estabilidade usando técnica de dicroísmo circular (CD)

O espectro de CD foi obtido utilizando-se o espectrômetro J-815 (JASCO) em cubetas de quartzo de 1 mm de caminho óptico com 350 µL de proteína em concentrações que variaram de 1-5 µM em solução com Tampão C. Os resultados foram gerados a partir da média de 11

espectros (195 - 260 nm) obtidos por 100 nm/min, 0,4 nm de resposta. A termoestabilidade foi avaliada a partir da elipticidade molar mensurada a 222 nm através de uma curva de aquecimento de 1 °C/min. O software Origin (OriginLAB Corporation) foi utilizado para o tratamento de dados e elaboração dos gráficos.

### **3.12 Cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz em multiângulos (SEC-MALS)**

A técnica de SEC-MALS foi feita utilizando-se o sistema de HPLC Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies). As amostras foram injetadas a uma concentração de aproximadamente 2 mg/mL em ciclos de 100 µL na coluna de exclusão molecular Superdex 200 HR 10/300 (Cytiva), com um fluxo da fase móvel (Tampão C) de 0,5 mL/min. Foram utilizados o detector de espalhamento a múltiplos ângulos DAWN 8 e o detector de variação de índice de refração Optilab (Wyatt Technology). Os dados então foram analisados pelo programa ASTRA 8.1.2 (Wyatt Technology). Essa etapa foi feita em parceria com o grupo de Instalação Multiusuário de Biofísica de Macromoléculas (BFM) do LNBR – CNPEM.

### **3.13 Construção dos vetores para transformação em *Yarrowia lipolytica***

A partes biológicas contendo promotores, terminadores e backbone utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Professor Rodrigo Ledesma-Amaro, do Departamento de Bioengenharia da Imperial College London. Os genes da OleT<sub>Aer</sub> e OleTP<sub>RN</sub> foram adquiridos comercialmente com códons otimizados para expressão em *Y. lipolytica*. A montagem dos vetores ocorreu por *Golden Gate*, baseando-se em princípios descritos por LEE et al., 2015 e utilizando sequências flanqueadoras com similaridade entre as partes, conforme descrito por CELIŃSKA et al., 2017. Para cada reação de *Golden Gate*, utilizou-se 2,5 fmol de cada parte, 0,75 fmol do *backbone*, 0,3 µL da enzima de restrição BsaI (New England Biolabs®), 0,5 µL de enzima T7 DNA ligase (New England Biolabs®) e 1 µL de Buffer T4 (New England Biolabs®), completando-se com água o volume para 10 µL. Após homogeneização, a reação foi incubada em termociclador, com 60 ciclos de aquecimento a 37 °C por 5 min, seguido de 5 min a 16 °C e 1 ciclo de 37 °C por 45 min, seguido de 10 min a 80 °C. Após a incubação, utilizou-se a reação para transformação de *E. coli* TOP10, pelo método de choque térmico

(SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As transformações foram plaqueadas em meio sólido LB contendo o antibiótico espectinomicina a 100 µg/mL.

### 3.14 Transformação de *Y. lipolytica*

As integrações genômicas dos vetores ocorreram de forma não direcionadas, tendo como sequências alvos uma região de retrotansposons, conforme descrito por JURETZEK et al., 2001. Assim, fez-se a digestão dos plasmídeos utilizando-se 1000 ng de DNA, 0.3 µL da enzima de restrição Not1 (New England Biolabs®), 1 µL de Buffer rCutSmart (New England Biolabs®), completando-se com água o volume para 10 µL. A reação de digestão foi incubada a 37 °C por 4h e, posteriormente, a 65 °C por 20 min. Para a transformação de *Y. lipolytica*, estriou-se em placas com meio sólido YPD as cepas a serem utilizadas, incubando-as *overnight* a 28 °C. Parte da biomassa crescida foi adicionada em tubos de 2 mL contendo 90 µL de PEG 50%, 25 µL de LiAc 2M pH 6.0 e 25 µL de DTT 2M. Após a homogeneização das amostras, adicionou-se 10 µL da reação de digestão previamente preparada, além de 5 µL de esperma de salmão desnaturado (Invitrogen™). Homogeneizou-se gentilmente as transformações, incubando-as a 28 °C por 30 min. Em seguida, as amostras foram incubadas a 39 °C por 30 min e, posteriormente, centrifugadas a 3000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com água estéril. Por fim, as células foram ressuspensas em 100 µL de água e plaqueadas em meio seletivo (a depender da construção). As placas foram incubadas a 28 °C por 2 a 3 dias. A verificação dos candidatos positivos foi feita através de PCR de colônia.

### 3.15 Teste de Crescimento Celular

Para a obtenção de curvas de crescimento, as culturas celulares foram feitas em placas de 96 poços (Thermo Scientific™ 96 Well Black/Clear Bottom Plate) contendo 125 µL de meio SMD 6%. Fixou-se uma OD<sub>600</sub> inicial de 0.05 para todas as cepas testadas e as culturas foram incubadas a 28 °C, sob agitação linear constante de 560 rpm no leitor de placas Tecan Spark®. O crescimento celular foi acompanhado através de leituras de OD<sub>600</sub> realizadas a cada 1 h, por um período total de 58 h. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. Utilizou-se o software Excel para o tratamento dos dados e elaboração dos gráficos.

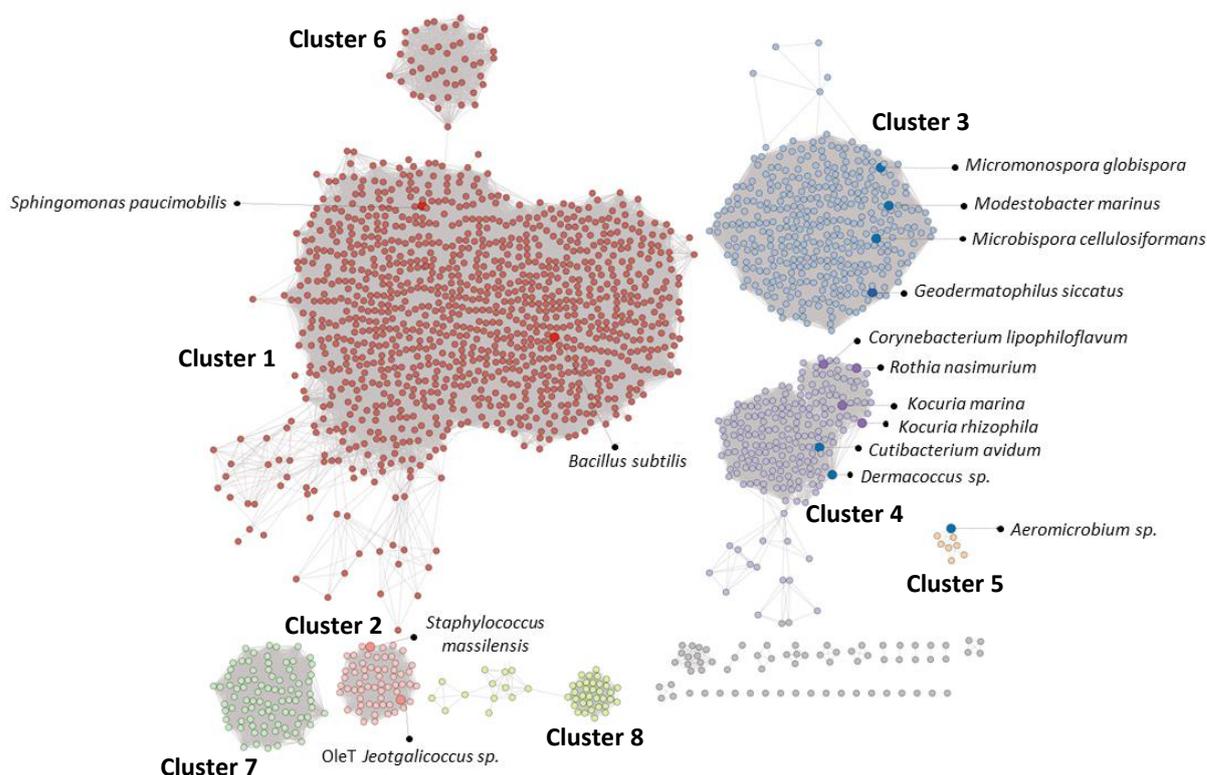
### 3.16 Preparação das amostras para a avaliação da produção *in vivo* de alcenos por Microextração em Fase Sólida em Headspace (HS-SPME)

A avaliação da produção de alcenos das cepas construídas foi realizada a partir de cultivos em tubos Falcon, contendo 5 mL de meio SMD 6%. A OD<sub>600</sub> inicial foi de 0.1 e todas as amostras foram feitas em triplicatas biológicas. Após 48 h de cultivo, a 30 °C e 220 rpm, as amostras foram centrifugadas a 4000 g por 5 min. Para a análise do conteúdo extracelular, verteu-se o sobrenadante em tubos de vidro de 20 mL contendo 40 µL do padrão interno (para posterior quantificação dos alcenos). As misturas foram agitadas em vórtex por 30 s e, posteriormente, adicionou-se NaCl puro até alcançar o ponto de saturação. As amostras foram novamente agitadas e entregues ao grupo de Química Molecular, do LNBr, para as corridas em HS-SPME. Para a análise do conteúdo intracelular, após a centrifugação dos cultivos, o pellet formado foi ressuspensionado em 500 µL de H<sub>2</sub>O e transferido para tubos de 2 mL. Centrifugou-se as amostras a 15.000 g por 2 min e o sobrenadante foi descartado. A lise celular foi realizada mecanicamente, adicionando-se 200 µL de glass-beads de 0.5 mm de diâmetro, 400 µL de etanol absoluto e 40 µL do padrão interno. As amostras foram vortexadas por 5 min e o conteúdo foi transferido para tubos de vidro de 20 mL contendo 4 mL de H<sub>2</sub>O. NaCl puro foi adicionado na mistura até atingir o ponto de saturação. As amostras foram agitadas e entregues ao grupo de Química Molecular, do LNBr, para as corridas em HS-SPME. Para isso, empregou-se uma agulha de injeção do tipo *arrow* (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) com fase extratora de polidimetilsiloxano (PDMS) com espessura de filme de 100 µm, diâmetro interno da agulha de 1,1 mm e comprimento de 20 mm. Os analitos foram dessorvidos termicamente no injetor do sistema GC-FID a 270 °C por 1 min, no modo split com taxa de divisão de 1:10.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Investigação *in-silico* de sequência de proteínas da família CYP152

Sequências de proteínas preditas da família CYP152 foram analisadas com a finalidade de se obter novas enzimas P450 peroxigenases com possível atividade de descarboxilação. Para isso, realizou-se um alinhamento das sequências e, aquelas contendo os aminoácidos conservados Phe79, His85 e Arg245 (numeração referente à enzima OleT<sub>JE</sub>), foram posteriormente empregadas para o estudo de redes de similaridade de sequências (*Sequence Similarity Networks* – SSN). A abordagem SSN *in-silico* foi desenvolvida no software Cytoscape, em parceria com o grupo de Ômicas Integrativas do LNBr, agrupando proteínas de acordo com a similaridade de suas sequências primárias e funcionalidade. Como observado na Figura 5, oito clusters principais foram definidos. O Cluster 1 inclui as hidroxilases P450 SP<sub>α</sub> e BS<sub>β</sub>, enquanto o Cluster 2 compreende a enzima descarboxilase modelo OleT<sub>JE</sub>. O Cluster 3 é composto por P450s não descritas na literatura e, portanto, possui características ainda desconhecidas. Assim, quatro enzimas desse cluster foram selecionadas para serem investigadas neste trabalho. São elas: P450<sub>Mar</sub> (de *Modestobacter marinus*), P450<sub>Mgl</sub> (de *Micromonospora globispora*), P450<sub>Mce</sub> (de *Microbispora celluliformans*) e P450<sub>Gsi</sub> (de *Geodermatophilus siccatus*). Além disso, outras duas enzimas do Cluster 4 também foram selecionadas, sendo elas a P450<sub>Dni</sub> (de *Dermacoccus nishinomiyaensis*) e P450<sub>Cav</sub> (de *Cutibacterium avidum*). Esse cluster também abrange a enzima OleTP<sub>RN</sub>, amplamente estudada pelo grupo de pesquisa da Dr<sup>a</sup> Leticia Zanphorlin (RADE et al., 2023), além de descarboxilases P450 provenientes de bactérias dos gêneros *Kocuria* e *Corynebacterium*. Tais microrganismos foram identificados como produtores de alcenos, conforme descrito por RUDE et al., 2011. Especificamente, dados de caracterização enzimática da P450 de *K. rhizophila* foram obtidos pelo grupo de pesquisa da Universidade de Manchester (resultados ainda não publicados), enquanto as enzimas de *K. marina* e *C. lipophiloflavum* foram investigadas pelo grupo de pesquisa do Dr. Wesley Generoso em um trabalho a ser publicado. Por fim, selecionou-se uma enzima do Cluster 5, a P450<sub>Aer</sub> (de *Aeromicrobium yanjiei*), que se agrupou isoladamente do restante das sequências e cujo grupo não há nenhuma OleT já descrita na literatura.



**Figura 5: Redes de similaridade de seqüências (SSN).** Redes de clusters agrupando proteínas CYP152 de acordo com a similaridade entre as seqüências primárias. A numeração referente a cada cluster foi atribuída de forma aleatória e utilizada apenas neste trabalho.

A fim de se analisar a homologia das seqüências escolhidas com a proteína modelo OleT<sub>JE</sub>, utilizou-se a ferramenta Blastp para o alinhamento das cadeias de aminoácidos. Assim, obteve-se um *query cover* de 89 % a 97 % para as proteínas analisadas, com todas apresentando menos de 40% de identidade. Além disso, verificou-se também a homologia dessas seqüências com a OleT<sub>RN</sub>, que possui elevados valores de conversão de ácidos graxos em alcenos terminais (RADE et al., 2023). O alinhamento indicou *query covers* que variaram de 88% a 99% e valores de identidades entre 33% e 48%. As P450<sub>Cav</sub> e P450<sub>Dni</sub> foram as enzimas com maiores valores de identidade quando comparadas à OleT<sub>RN</sub>, dado já esperado pois as três foram agrupadas no Cluster 4. A tabela a seguir apresenta os dados obtidos a partir dos alinhamentos das seqüências.

Enzima	<i>E-value</i> OleT <sub>JE</sub>	Identidade com OleT <sub>JE</sub> (%)	<i>E-value</i> OleTP <sub>RN</sub>	Identidade com OleTP <sub>RN</sub> (%)	Cluster
P450 <sub>Mar</sub>	2e-91	36,56	9e-68	34,67	3
P450 <sub>Mgl</sub>	1e-88	34,72	8e-70	35,38	3
P450 <sub>Mce</sub>	3e-83	37,95	2e-66	36,25	3
P450 <sub>Gsi</sub>	2e-79	34,47	2e-69	34,21	3
P450 <sub>Aer</sub>	7e-66	33,24	2e-58	33,41	5
P450 <sub>Cav</sub>	4e-62	31,26	4e-137	46,88	4
P450 <sub>Dni</sub>	9e-62	32,71	1e-129	47,55	4

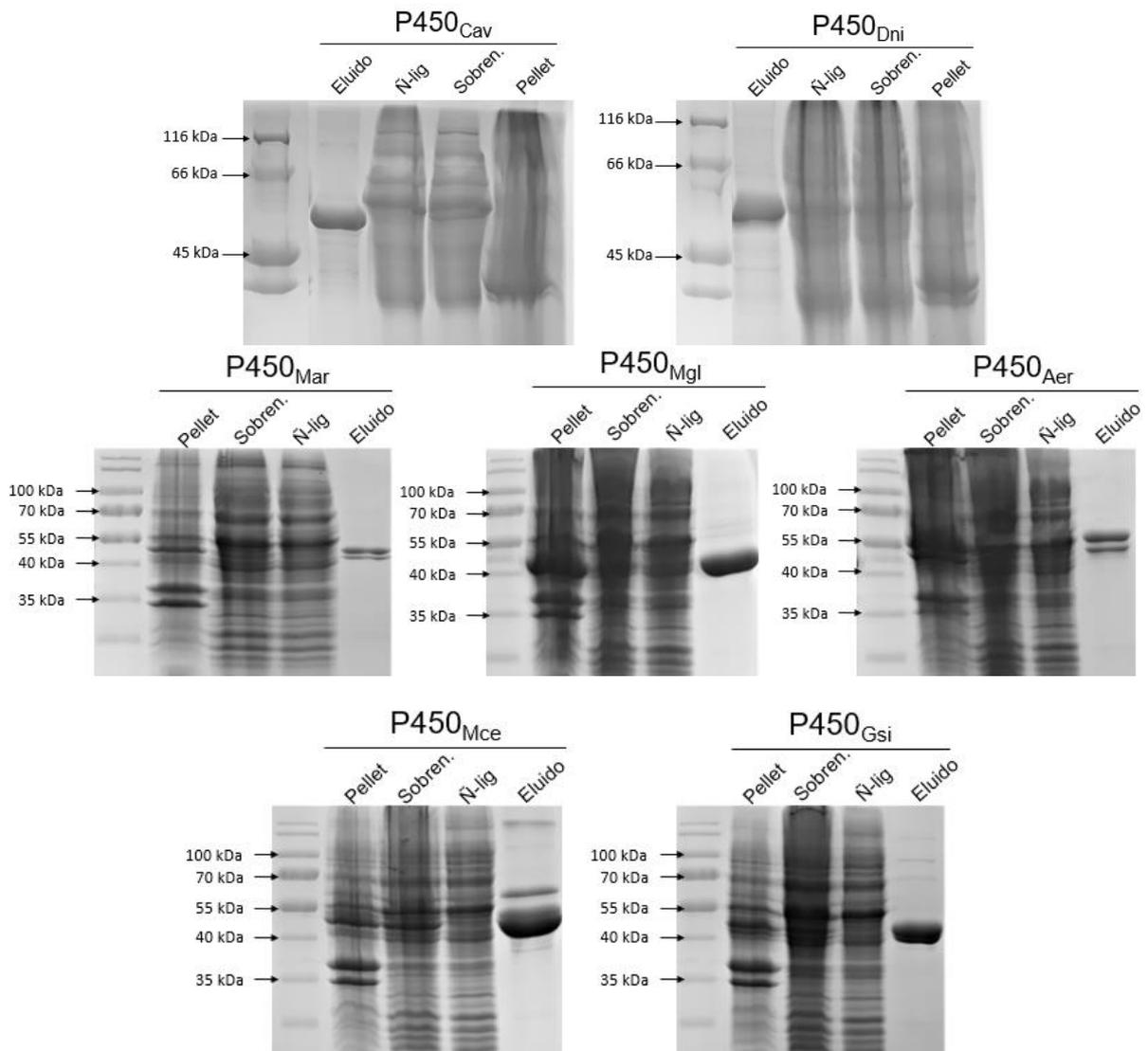
**Tabela 4:** Valores de *e-value* e identidade encontrados no alinhamento das sequências de aminoácidos de P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mgl</sub>, P450<sub>Mce</sub>, P450<sub>Gsi</sub>, P450<sub>Aer</sub>, P450<sub>Cav</sub> e P450<sub>Dni</sub>, tendo a proteína modelo OleT<sub>JE</sub> e OleTP<sub>RN</sub> como referências. Os alinhamentos foram realizados utilizando-se a ferramenta Blastp.

Os valores de identidade indicam que todas as proteínas escolhidas possuem sua sequência primária bastante distintas da OleT<sub>JE</sub> e OleTP<sub>RN</sub>, com exceção das P450<sub>Cav</sub> e P450<sub>Dni</sub> neste último caso. Desse modo, o estudo dessas enzimas pode auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação das descarboxilases P450, através da observação dos diferentes comportamentos bioquímicos apresentados por elas. Essas características divergentes, comparado à OleT<sub>JE</sub>, serão abordadas posteriormente nesse relatório, com a descrição dos resultados obtidos a partir de ensaios bioquímicos e de perfil de produção de ácidos graxos, além de análises biofísicas de estrutura secundária dessas proteínas.

#### 4.2 Expressão e purificação das enzimas peroxigenases P450

As sete P450 putativas foram clonadas em pET28a e sequenciadas para verificar possíveis mutações que pudessem interferir na expressão e atividade das enzimas. Após a confirmação da qualidade das sequências, as proteínas foram expressas em *E. coli* BL21 e purificadas por cromatografia de afinidade. A presença do grupamento heme no sítio ativo das enzimas P450 permite sua avaliação através de métodos espectroscópicos comuns, assim, quando ligado a uma molécula de água, o grupamento heme apresenta banda de Soret em aproximadamente 420 nm. Esse pico máximo sofre alteração pela presença do substrato (ácido graxo) no sítio ativo, que remove e substitui a molécula de H<sub>2</sub>O, deslocando a banda de Soret para 390 nm (LUTHRA; DENISOV; SLIGAR, 2011). Desta forma, após a purificação das

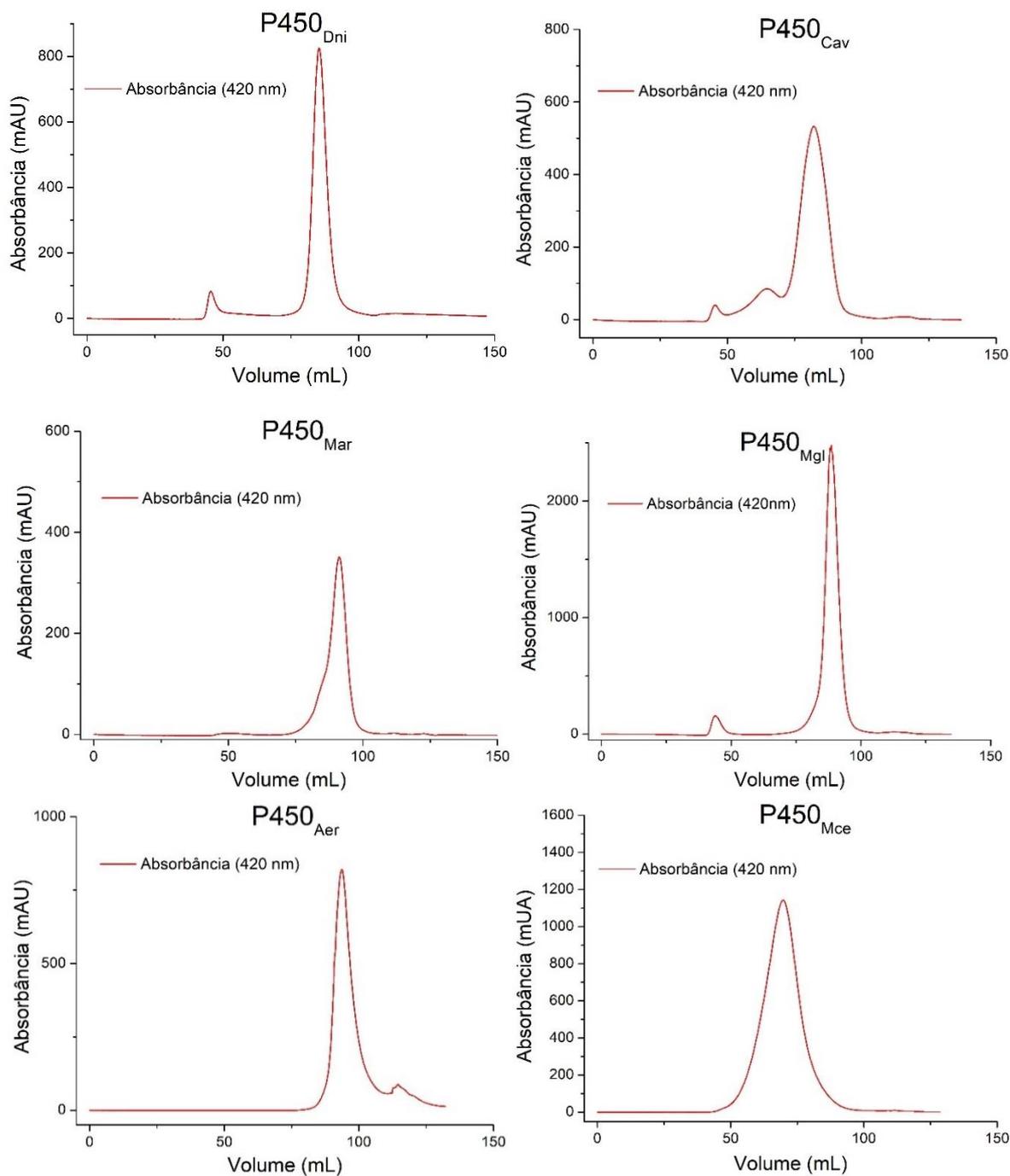
proteínas, fez-se uma análise de espectrofotometria e todos os genes putativos apresentaram espectros característicos de proteínas P450. Além disso, as expressões foram avaliadas em SDS-PAGE 12% (Figura 6). Coletou-se amostras de diferentes etapas da purificação, sendo possível constatar que todas as enzimas foram expressas em sua forma solúvel e com bandas compatíveis com o peso molecular teórico, especificamente 52,0 kDa para P450<sub>Dni</sub>; 50,1 kDa para P450<sub>Cav</sub>; 45 kDa para P450<sub>Gsi</sub>; 45,8 kDa para P450<sub>Mar</sub>; 45,2 kDa para P450<sub>Mgl</sub>; 52,1 kDa para P450<sub>Aer</sub>; e 47,9 kDa para P450<sub>Mce</sub>.



**Figura 6: SDS-PAGE 12% contendo amostras de diferentes etapas de purificação por cromatografia de afinidade.** Corrida em gel de amostras do pellet, sobrenadante, não-ligado e eluido da purificação das proteínas P450<sub>Dni</sub>, P450<sub>Cav</sub>, P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mgl</sub>, P450<sub>Aer</sub>, P450<sub>Gsi</sub> e P450<sub>Mce</sub>.

Após a purificação por cromatografia de afinidade em coluna com cobalto imobilizado, realizou-se um teste enzimático qualitativo para verificar se as enzimas foram purificadas em sua forma ativa. Este teste avaliou a atividade peroxigenase em presença do substrato ácido palmítico (C16:0), utilizando o reagente FOX (DELONG et al., 2002). Todas as enzimas apresentaram atividade peroxigenase, com exceção da P450<sub>Gsi</sub> que, apesar de ter sido eficientemente purificada por cromatografia de afinidade, aparenta não possuir atividade peroxigenase sob as condições testadas até o momento [ácido palmítico 500  $\mu$ M, fosfato de sódio 50 mM, peróxido de hidrogênio 100  $\mu$ M, pH 7,5, 37 °C]. Por este motivo, os experimentos com esta enzima foram descontinuados.

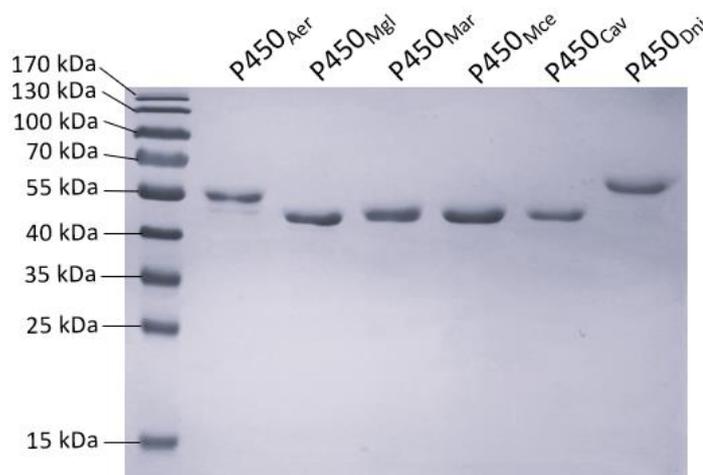
Após o teste preliminar de atividade peroxigenase, as proteínas seguiram para uma purificação em cromatografia de exclusão molecular para a remoção dos contaminantes restantes. Esta etapa foi feita em sistema FPLC e o monitoramento ocorreu no comprimento de onda de 420 nm, relativo à absorção do grupamento heme. Os espectros obtidos podem ser observados na Figura 7.



**Figura 7: Cromatografias de exclusão molecular em sistema FPLC.** As corridas foram monitoradas no comprimento de onda de 420 nm para todas as enzimas (P450<sub>Dni</sub>, P450<sub>Cav</sub>, P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mgl</sub>, P450<sub>Aer</sub> e P450<sub>Mce</sub>) possibilitada devido à presença do grupamento heme.

Nos cromatogramas, foi possível observar a presença de um pico próximo ao volume morto da coluna (40 mL) nas purificações de P450<sub>Dni</sub>, P450<sub>Cav</sub> e P450<sub>Mgl</sub>, indicando a presença de agregados. Além disso, observou-se um pequeno pico, próximo ao volume de eluição de 60 mL, no cromatograma referente à enzima P450<sub>Cav</sub>, podendo indicar que esta proteína possa

adotar dois estados oligoméricos distintos (ensaios de SEC-MALS foram realizados posteriormente para confirmar tal hipótese). Os picos de maior intensidade foram coletados e avaliados em SDS-PAGE 12%, como pode ser observado na Figura 8.



**Figura 8: SDS-PAGE 12% contendo frações coletadas da cromatografia de exclusão molecular.** Frações das purificações das enzimas P450<sub>Aer</sub>, P450<sub>Mgl</sub>, P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mce</sub>, P450<sub>Cav</sub> e P450<sub>Dni</sub> foram coletadas e avaliadas em SDS-PAGE 12%. Todas, com exceção da P450<sub>Aer</sub>, apresentaram banda única, indicando um bom processo de purificação. A enzima P450<sub>Aer</sub> apresentou uma segunda banda de tamanho inferior à principal.

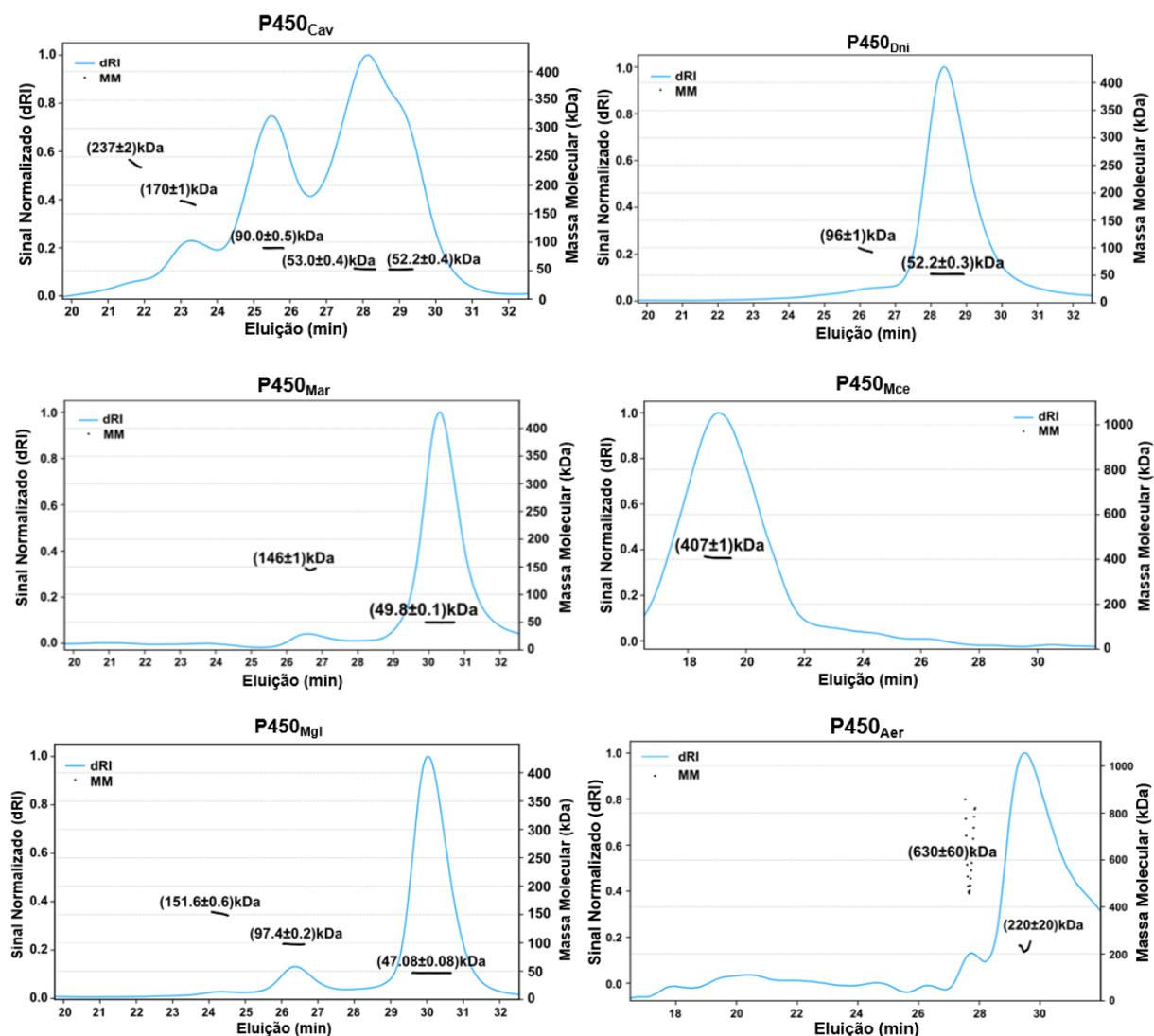
O gel indica que as enzimas P450<sub>Mgl</sub>, P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mce</sub>, P450<sub>Cav</sub> e P450<sub>Dni</sub> foram purificadas eficientemente, apresentando bandas únicas e de tamanho teórico esperado. A enzima P450<sub>Aer</sub> apresentou uma segunda banda inespecífica, de tamanho inferior ao esperado, e que também foi observada anteriormente após a purificação por afinidade. Apesar disso, o contaminante aparece em baixas concentrações e não aparenta influenciar na atividade peroxigenase da enzima, pois esta apresentou atividade peroxigenase no teste inicial, como descrito anteriormente. Por isso, sua caracterização bioquímica e biofísica seguiram normalmente.

#### 4.3 Cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz em multiângulos (SEC-MALS)

O espalhamento de luz em multiângulos (MALS) é uma técnica que determina o peso molecular absoluto de um analito em solução a partir de equações físicas básicas. Assim, a combinação desta técnica com a cromatografia de exclusão molecular (SEC) configura um

método confiável para a caracterização de soluções de uma ou mais espécies de proteínas (SOME et al., 2019). Dessa forma, a fim de se estimar a massa molecular e estado oligomérico das proteínas estudadas, as amostras foram avaliadas por SEC-MALS, em Tampão C, com cerca de 2 mg/mL de proteína.

As análises iniciais determinaram uma massa molecular de 57 kDa para a proteína P450<sub>Dni</sub>, indicando que, na condição avaliada, a enzima se encontra como um monômero, estado oligomérico comumente encontrado para a superclasse P450. Nas análises com as P450<sub>Mar</sub> e P450<sub>Mgl</sub> também foi determinado a presença de monômeros, com massas moleculares de 49,8 kDa e 47,55 kDa, respectivamente. Entretanto, é possível observar uma pequena quantidade de agregados, indicado por picos inespecíficos de 146 kDa e 110,5 kDa. A enzima P450<sub>Cav</sub>, apesar de ser possível observar a presença majoritária de monômeros (~52 kDa), apresentou uma grande quantidade de agregados com massas moleculares variando consideravelmente. Esse resultado pode indicar uma instabilidade da proteína na condição avaliada. Já a P450<sub>Mce</sub> apresentou uma massa molecular de 407 kDa, muito acima do valor monomérico esperado. Considerando-se a massa molar teórica, a medida encontrada corresponderia a um estado oligomérico de octâmero. Caso confirmado esse dado, será a primeira enzima descarboxilase P450 relatada a adotar esta conformação. Os gráficos obtidos a partir das análises de SEC-MALS podem ser observadas na Figura 9.

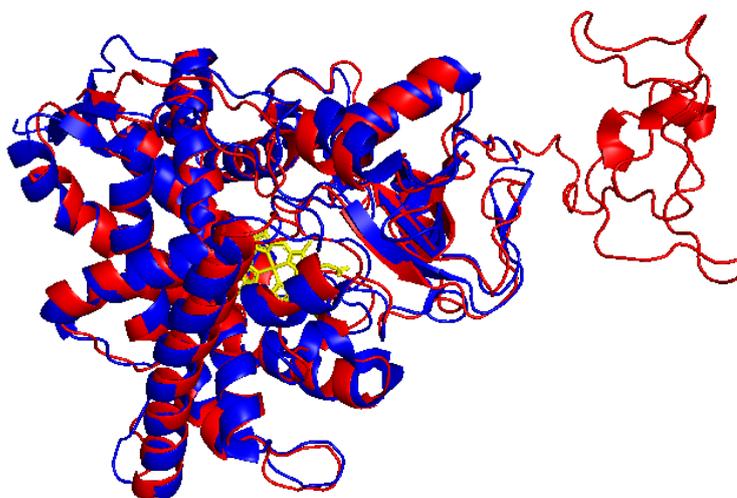


**Figura 9:** SEC-MALS das proteínas P450<sub>Cav</sub>, P450<sub>Dni</sub>, P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mce</sub>, P450<sub>Mgl</sub> e P450<sub>Aer</sub>. Os resultados obtidos indicaram uma conformação majoritária de monômeros das enzimas P450<sub>Cav</sub>, P450<sub>Dni</sub>, P450<sub>Mar</sub> e P450<sub>Mgl</sub>. O resultado obtido a partir da amostra da enzima P450<sub>Mce</sub> indicou uma conformação octamérica, estado oligomérico incomum para descarboxilases P450. Por fim, com o resultado apresentado pela enzima P450<sub>Aer</sub>, não foi possível definir o estado oligomérico desta proteína.

Por fim, a corrida de SEC-MALS realizada com a enzima P450<sub>Aer</sub> não apresentou um bom resultado, com um pico arrastado, como pode ser observado na Figura 9. Assim, investigou-se mais a fundo, através de simulações computacionais, a estrutura terciária adotada por essa enzima e que poderia elucidar os motivos dos comportamentos observados nos géis de SDS-PAGE e análise de SEC-MALS.

#### 4.4 Mutação dirigida da enzima P450<sub>Aer</sub>

A predição de estruturas terciárias de proteínas a partir de sua sequência de aminoácidos é um desafio complexo. Porém, nos últimos anos, houve um grande avanço nessa área, com o aprimoramento de técnicas computacionais e o desenvolvimento de tecnologias baseadas em *deep learning*. Assim, com o intuito de se investigar o comportamento observado no experimento de SEC-MALS da enzima P450<sub>Aer</sub>, gerou-se um modelo de sua estrutura tridimensional através do servidor web ROBETTA (<http://robetta.bakerlab.org>). O modelo gerado foi, então, alinhado e comparado com a proteína OleT<sub>JE</sub>, como pode ser observado na Figura 10.

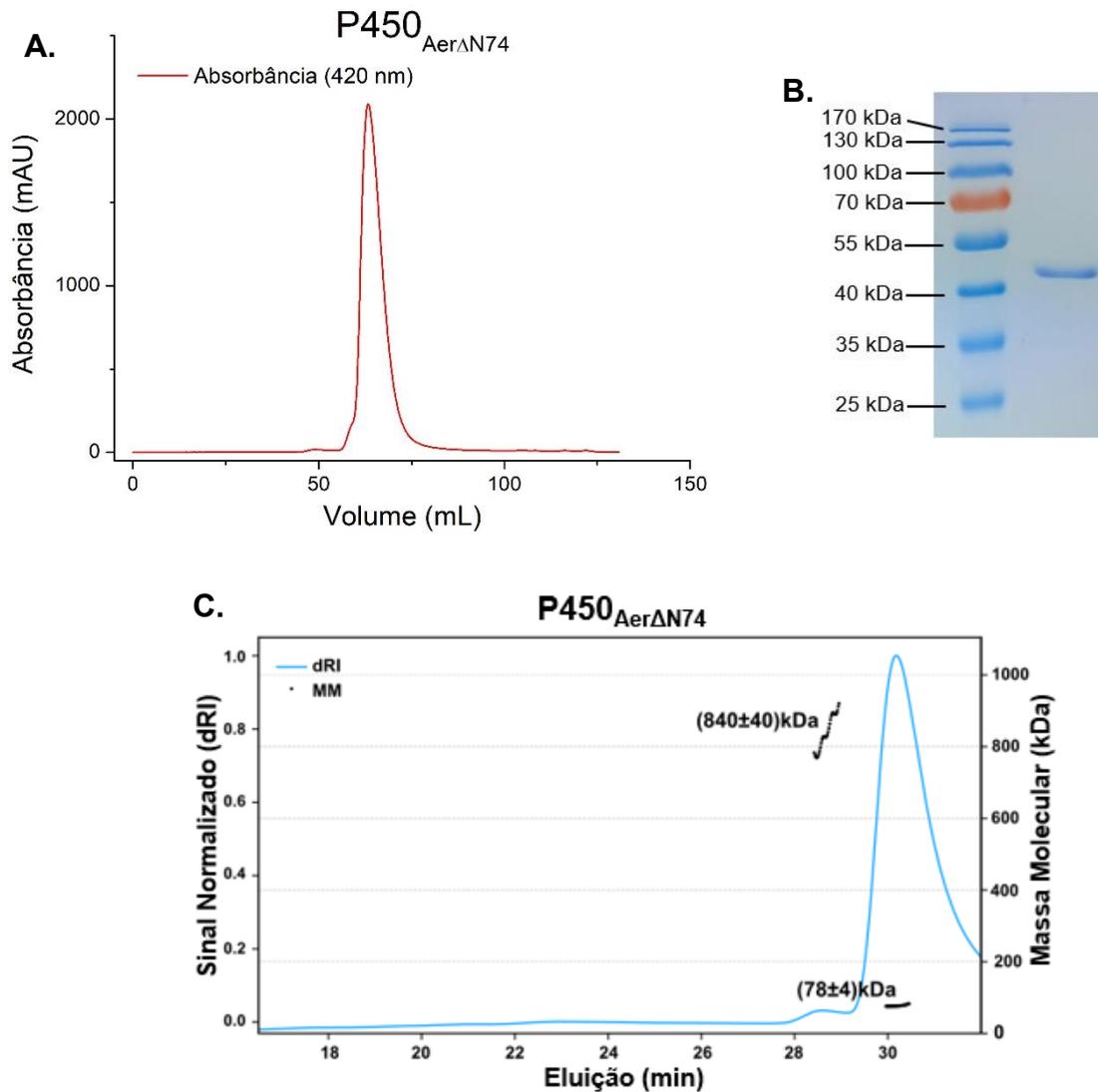


**Figura 10:** Comparação da estrutura tridimensional da OleT<sub>JE</sub> (em azul, código PDB 4L40) e do modelo da proteína P450<sub>Aer</sub>, gerado pelo servidor web ROBETTA (em vermelho). O alinhamento da estrutura terciária das enzimas evidenciou uma região, presente na P450<sub>Aer</sub>, sem estrutura definida.

Comparando-se as estruturas, é possível observar na região N-terminal da P450<sub>Aer</sub> a presença de uma extensão flexível composta por 74 aminoácidos, sem estrutura definida e inexistente na OleT<sub>JE</sub>. Uma hipótese levantada, portanto, baseia-se nessa região como a responsável pela instabilidade e agregação observada anteriormente na análise de SEC-MALS. Assim, com o intuito de proporcionar maior estabilidade na proteína, construiu-se uma enzima mutante (P450<sub>Aer</sub> $\Delta$ N74), com a extensão deletada. A remoção da estrutura foi realizada de forma racional, através de uma PCR de deleção, que consiste na construção de primers complementares às regiões flanqueadoras da parte a ser removida. Esses primers possuem, ainda, uma cauda com complementariedade entre si, permitindo o fechamento do plasmídeo

através da técnica de Gibson. Após a construção do vetor e clonagem em cepa DH5 $\alpha$ , o plasmídeo foi purificado e enviado para sequenciamento para confirmação da mutação.

A expressão da proteína P450<sub>Acr $\Delta$ N74</sub> ocorreu em cepas BL21 DE3 e sua purificação seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente. Assim, após a purificação por cromatografia de exclusão molecular (Figura 11), uma amostra foi analisada por SDS-PAGE, demonstrando que a banda inespecífica foi eliminada após a mutação. Além disso, realizou-se um teste de atividade peroxigenase utilizando o substrato C18:1 e o reagente FOX. O teste demonstrou que a enzima foi purificada em sua forma ativa, comprovando que a mutação não afetou a capacidade dessa enzima em atuar como peroxigenase nesse substrato. Por fim, a proteína purificada foi enviada para análise de SEC-MALS, obtendo-se desta vez uma corrida com um pico bem definido de 78 kDa, indicando um estado oligomérico de dímero, semelhante ao encontrado na proteína OleTP<sub>RN</sub>. A OleTP<sub>RN</sub> é, até o momento, a única descarboxilase P450 descrita com conformação dimérica. Essa particularidade proporciona características únicas a essa enzima, como a presença de uma esfera de segunda coordenação em torno do substrato, que é crucial para a acomodação adequada da cauda alifática do ácido graxo no bolsão catalítico (RADE et al., 2023).



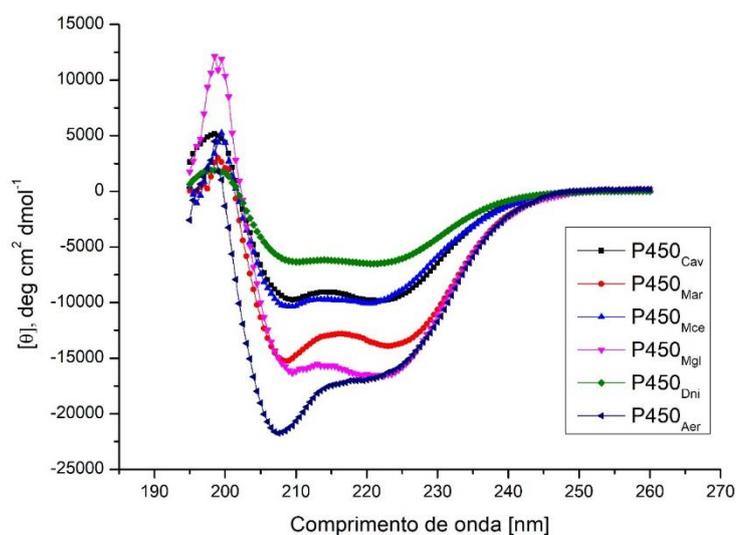
**Figura 11: Purificação por cromatografia de exclusão molecular e análise da  $P450_{Aer\Delta N74}$  por SEC-MALS.** (A) A corrida da proteína  $P450_{Aer\Delta N74}$  foi monitorada no comprimento de onda de 420 nm, possibilitada pelo grupamento heme. (B) SDS-PAGE 12% contendo a fração coletada durante a purificação em coluna de exclusão molecular. É possível observar uma banda única no gel, indicando uma boa qualidade da amostra. (C) A análise de SEC-MALS indicou que a  $P450_{Aer\Delta N74}$  se apresenta majoritariamente na conformação de dímero, similar ao encontrado na  $OleTP_{RN}$ .

As análises constatando a porção adicional no N-terminal da peroxigenase  $OleT_{Aer}$  foram realizadas mais ao final do período do mestrado, quando obtivemos dados não confiáveis de SEC-MALS. Apesar de testes preliminares de FOX demonstrar que aparentemente a atividade catalítica do mutante é bastante parecido com a selvagem, seria necessário uma maior investigação sobre o papel estrutural e funcional dessa extensão. Assim, é importante ressaltar

que nas próximas seções, todos os resultados se referem ao uso da proteína nativa, ou seja, contendo a porção extra no N-terminal.

#### 4.5 Avaliação da estrutura secundária e desnaturação térmica

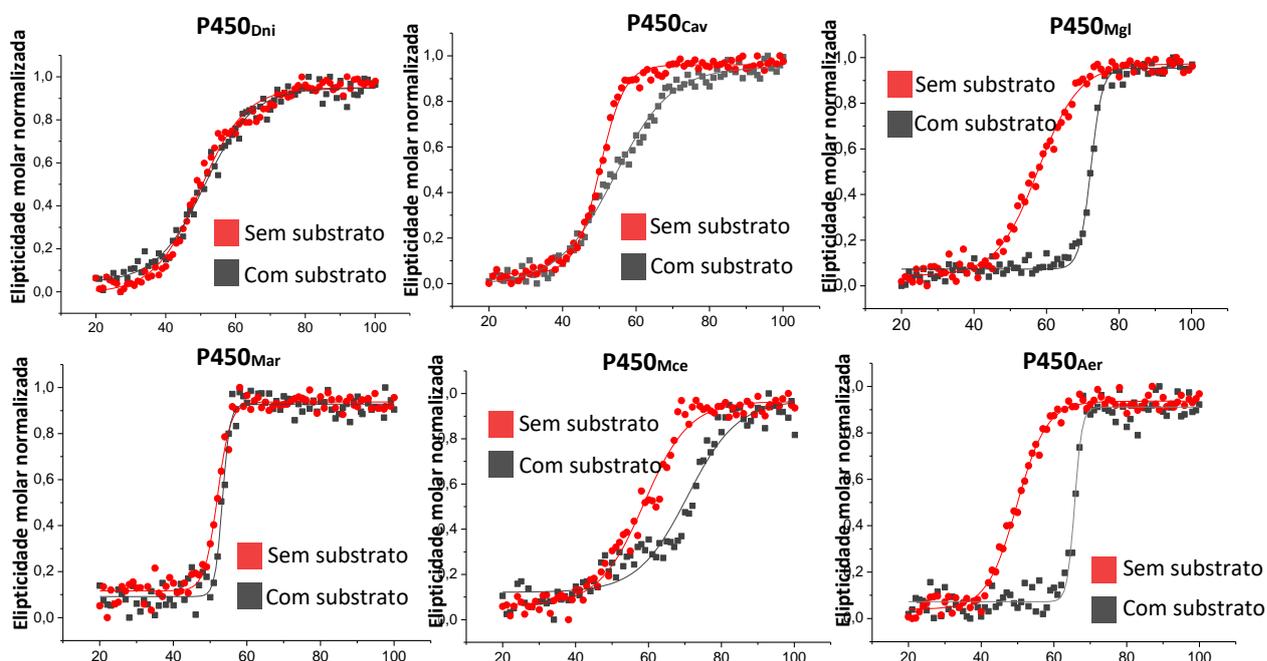
A análise de dicroísmo circular (CD) é capaz de monitorar a estabilidade das enzimas em função do aquecimento, além de permitir investigar a estrutura secundária de proteínas. Esta técnica envolve a incidência de uma luz circularmente polarizada na molécula, produzindo diferentes padrões de absorção conforme as conformações majoritárias de  $\alpha$ -hélice ou folhas  $\beta$  da proteína analisada (SCHOWEN, 1993). Assim, como pode ser observado na Figura 12, as análises de CD demonstraram uma predominância de  $\alpha$ -hélice na estrutura secundária de todas as enzimas desse trabalho, evidenciado pelas duas bandas negativas próximas à 208 nm e 222 nm. Esse resultado condiz com dados de OleT<sub>JE</sub>, P450<sub>BS $\beta$</sub>  e OleTP<sub>RN</sub> já descritos na literatura (RUDE et al., 2011).



**Figura 12: Espectro de dicroísmo circular (CD) obtido das enzimas P450<sub>Cav</sub>, P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mce</sub>, P450<sub>Mgl</sub>, P450<sub>Dni</sub> e P450<sub>Aer</sub>.** O software Origin foi utilizado para o tratamento de dados e elaboração do gráfico. As análises foram feitas em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol 5 %, pH 7,5. As concentrações de enzima utilizadas foram de 3,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M e 2  $\mu$ M para as proteínas P450<sub>Cav</sub>, P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mce</sub>, P450<sub>Mgl</sub> e P450<sub>Aer</sub> e P450<sub>Dni</sub>, respectivamente.

A termo-estabilidade das proteínas foi avaliada a partir da elipticidade molar mensurada a 222 nm sob aquecimento das amostras. A fim de se verificar o efeito da adição de substrato no meio reacional, realizou-se a desnaturação térmica de todas as enzimas na ausência e

presença de ligante. O ligante utilizado foi o C16:0 e os gráficos obtidos podem ser observados na Figura 13.



**Figura 13: Análise da estabilidade térmica das enzimas e a influência de um ligante na temperatura de *melting*.** Os gráficos foram gerados pelo software Origin a partir de valores normalizados da elipticidade molar a 222 nm. Utilizou-se Tampão C com ácido palmítico 100  $\mu\text{M}$  e 3,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$  para as enzimas P450<sub>Cav</sub>, P450<sub>Mar</sub>, P450<sub>Mce</sub>, P450<sub>Mgl</sub>, P450<sub>Aer</sub> e P450<sub>Dni</sub>, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que a enzima livre (sem a presença de um ligante) com maior  $T_m$  foi a P450<sub>Mce</sub> ( $T_m$  de aproximadamente 59 °C), enquanto as enzimas P450<sub>Aer</sub>, P450<sub>Dni</sub> e P450<sub>Cav</sub> apresentaram temperaturas de *melting* mais baixas e bem próximas entre si ( $T_m$  de aproximadamente 50 °C). Foi possível observar também que a presença de C16:0 provocou um aumento significativo na  $T_m$  de algumas proteínas, como a P450<sub>Aer</sub>, P450<sub>Mce</sub>, P450<sub>Mgl</sub> e P450<sub>Cav</sub>, indicando que a presença de um ligante pode proporcionar uma estabilização estrutural em alguns casos. A Tabela 5 resume os valores de  $T_m$  encontrados para cada proteína na presença e ausência do ligante.

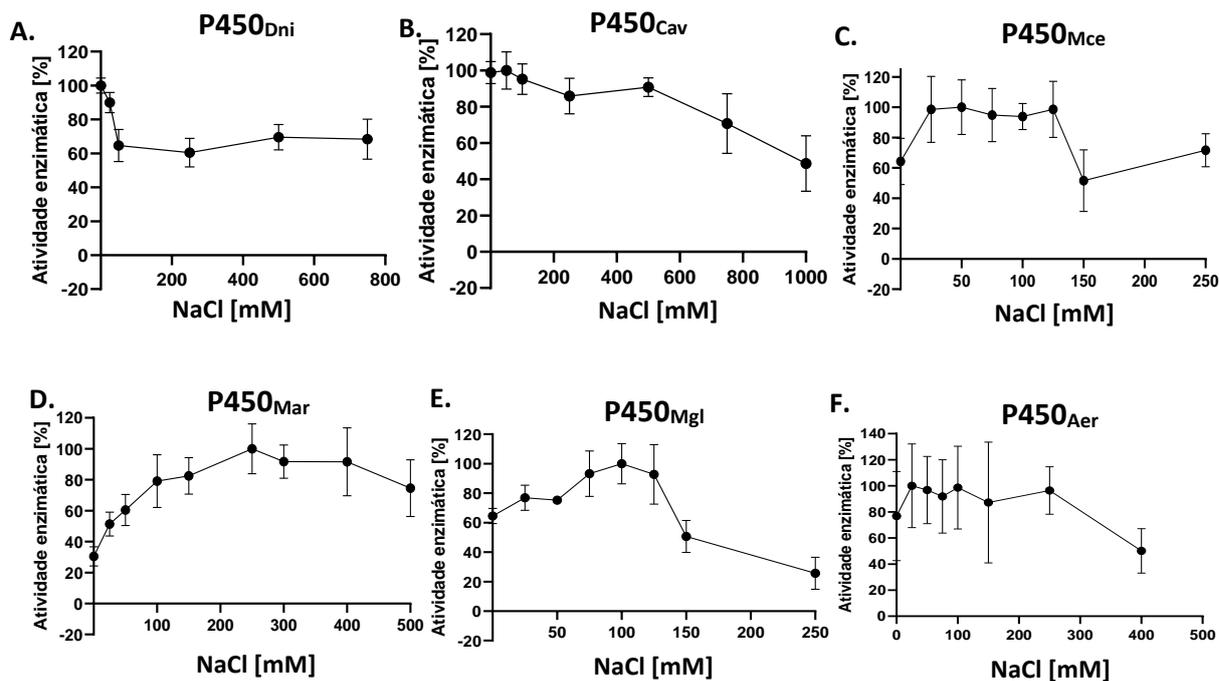
<b>Enzima</b>	<b>T<sub>m</sub> sem substrato</b>	<b>T<sub>m</sub> com substrato</b>
P450 <sub>Dni</sub>	49,8	51,1
P450 <sub>Cav</sub>	50,1	54,2
P450 <sub>Mgl</sub>	57,7	72,2
P450 <sub>Mar</sub>	52	53,4
P450 <sub>Mce</sub>	58,8	70,7
P450 <sub>Aer</sub>	49,8	66,7

**Tabela 5: Valores de T<sub>m</sub> encontrados nas análises por dicroísmo circular.** Foi verificado que a presença do substrato é capaz de deslocar a T<sub>m</sub> das proteínas analisadas.

#### 4.6 Caracterização enzimática da atividade peroxigenase

A caracterização da atividade peroxigenase foi realizada pela avaliação da presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em solução, utilizando o reagente FOX, conforme descrito por DELONG et al., 2002. Este método envolve a rápida oxidação de Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> mediada por peróxido e sob condições ácidas. O Fe<sup>3+</sup>, na presença de *xylene orange*, forma o complexo Fe<sup>3+</sup>-*xylene orange*, que pode ser medido espectrofotometricamente a 560 nm. Embora a análise da ação peroxigenase não confirme a capacidade de descarboxilação das enzimas, a observação de degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de substrato indica a capacidade destas em atuar no ácido graxo testado, confirmando a função de peroxigenase. Assim, com este método, é possível avaliar as melhores condições de atividade da enzima.

A caracterização bioquímica avaliou condições ótimas de reação em relação à concentração de NaCl, pH e temperatura de cada peroxigenase. A concentração das proteínas utilizadas nas caracterizações foi selecionada com base na realização de uma curva de linearidade, assegurando que a quantidade de enzima nos testes estivesse dentro da faixa linear de atividade enzimática. Esta curva foi obtida ao se variar a concentração das proteínas em uma reação contendo 500 μM de ácido palmítico e 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão fosfato de sódio, pH 7,5. Os resultados obtidos a partir da variação de concentração de NaCl no meio reacional pode ser verificado na Figura 14.

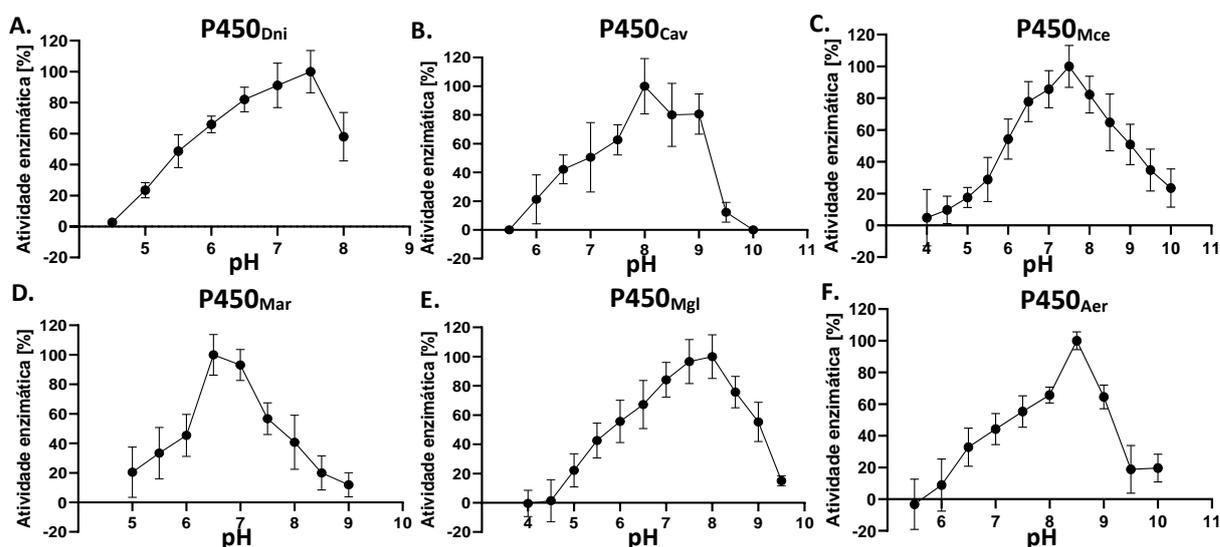


**Figura 14: Avaliação da influência da salinidade na atividade enzimática.** Curvas obtidas a partir da variação da concentração de NaCl nas reações em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e a 37 °C.

A avaliação da melhor concentração de NaCl na reação de cada enzima foi feita com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e a 37 °C. Os resultados obtidos demonstraram que as enzimas P450<sub>Dni</sub> e P450<sub>Cav</sub>, ambas provenientes do Cluster 4 têm suas atividades reduzidas conforme há um aumento na concentração de NaCl na reação (Figuras 14A e 14B). Esses dados se diferem da tendência halofílica encontrada na maioria das peroxigenases já descritas na literatura, como a OleT<sub>JE</sub>, que se estabiliza em 750 mM de sal (BELCHER et al., 2014; RUDE et al., 2011), e as OleT<sub>JH</sub> (de *Jeotgalicoccus halophilus*), OleT<sub>SQ</sub> (de *Salinicoccus qingdaonensis*) e OleT<sub>SA</sub> (de *Staphylococcus aureus*) consideradas halofílicas moderadas por necessitaram de 500 mM de NaCl (JIANG et al., 2019). Essa característica menos halofílica confere uma vantagem na utilização *in vitro* dessas proteínas, já que facilitaria o emprego delas em processos de descarboxilação em larga escala, não havendo a necessidade de inclusão de aditivos para a reação enzimática, simplificando também o processo de purificação dos produtos desejados. Além disso, a necessidade de baixas concentrações de sal, torna-as mais adequadas para serem utilizadas em construções de engenharia metabólica visando a produção *in vivo* de hidrocarbonetos, considerando-se a baixa concentração natural desses íons no meio intracelular de microrganismos. Poucas OleTs, até o momento, apresentaram atividade sem a necessidade de NaCl no meio reacional, sendo uma delas a OleT<sub>PRN</sub> (RADE et al., 2023), também do Cluster 4 e amplamente estudada pelo nosso grupo de pesquisa, indicando que essa

característica é, provavelmente, intrínseca ao cluster estudado. Da mesma maneira, as enzimas P450<sub>Mce</sub> e P450<sub>Aer</sub> apresentaram resultados satisfatórios nesta avaliação, visto que ambas possuem atividade na ausência de NaCl e necessitam de baixas concentrações deste sal (cerca de 25 mM) para que haja aumento da atividade enzimática (Figuras 14C e 14F). Por fim, as enzimas P450<sub>Mar</sub> e P450<sub>Mgl</sub>, embora apresentem atividade na ausência de NaCl, demonstraram uma maior atividade na presença de 250 mM e 100 mM de NaCl, respectivamente (Figuras 14D e 14E). Apesar disso, quando comparadas à proteína modelo OleT<sub>JE</sub>, todas as enzimas apresentaram atividade de peroxigenase em baixas concentrações de sal.

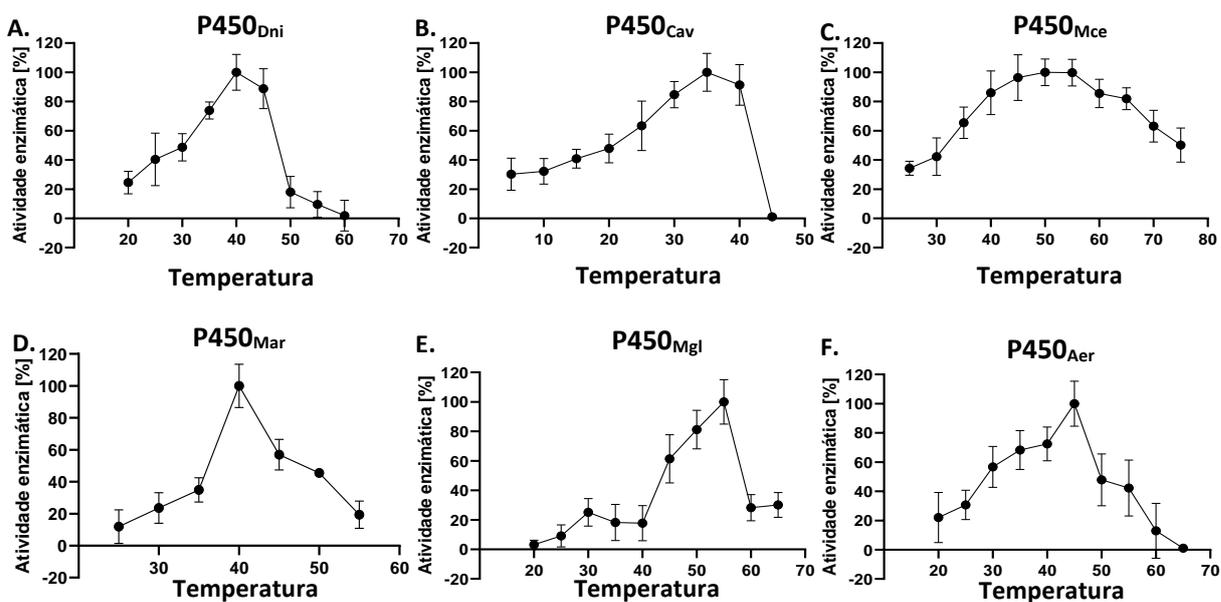
A análise do efeito do pH na catálise da reação foi estabelecida a 37 °C, utilizando-se tampão fosfato-citrato 50 mM para a enzima P450<sub>Dni</sub>, com pontos definidos entre os pH 4 e 8. A avaliação da atividade enzimática em pH acima de 8 não foi possível devido à incompatibilidade da enzima com tampões com capacidade de tamponamento nesta faixa. Já para a P450<sub>Cav</sub>, a reação foi feita a 37 °C e utilizou-se tampão fosfato-citrato 50 mM para a faixa de pH entre 5,5 e 8,0 e tampão glicina 50 mM entre pH 8,0 e 10. Para as demais proteínas, utilizou-se tampão fosfato-citrato-glicina, a 37 °C. As concentrações de NaCl utilizadas em cada caracterização foi baseada nos valores ótimos de cada enzima encontrados na curva de NaCl descrita anteriormente. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 15.



**Figura 15: Avaliação da influência do pH na atividade enzimática.** Curvas obtidas a partir da variação do pH nas reações conduzidas em tampão fosfato-citrato 50 mM a 37 °C para a enzima P450<sub>Dni</sub>. Para a avaliação de P450<sub>Cav</sub>, utilizou-se tampão fosfato-citrato 50 mM para a faixa de pH entre 5,5 e 8,0 e tampão glicina 50 mM entre pH 8,0 e 10. A reação foi incubada a 37 °C. Por fim, utilizou-se tampão fosfato-citrato-glicina 50 mM a 37 °C, para as demais reações, com concentração de NaCl de acordo com os ideais observados nas curvas anteriores.

A partir dos resultados de avaliação da influência do pH (Figura 15), foi possível constatar que as P450s analisadas possuem pH ótimo de atividade próximo do neutro a básico, sendo a P450<sub>Mar</sub> a enzima com menor pH ótimo de atividade (aproximadamente 6,5) e a P450<sub>Aer</sub> com maior valor de pH ótimo (aproximadamente 8,5). Como observado na Figura 15A e 15C, as enzimas P450<sub>Dni</sub> e P450<sub>Mce</sub> apresentaram o mesmo pH ideal para a atividade peroxigenase, em torno de 7,5. Já as proteínas P450<sub>Cav</sub> e P450<sub>Mgl</sub> demonstraram um pico de atividade no valor de pH 8 (15B e 15E). Esses resultados se aproximam do pH ideal para a atividade da OleT<sub>JE</sub> e OleTP<sub>RN</sub>, conforme descrito na literatura (BHARADWAJ et al., 2018; LIU et al., 2014; RADE et al., 2023).

As curvas de temperatura foram feitas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e concentração de sal de acordo com os valores ótimos de cada enzima, encontrados na curva de NaCl descrita anteriormente. Os resultados obtidos a partir desta análise podem ser observados na Figura 16.



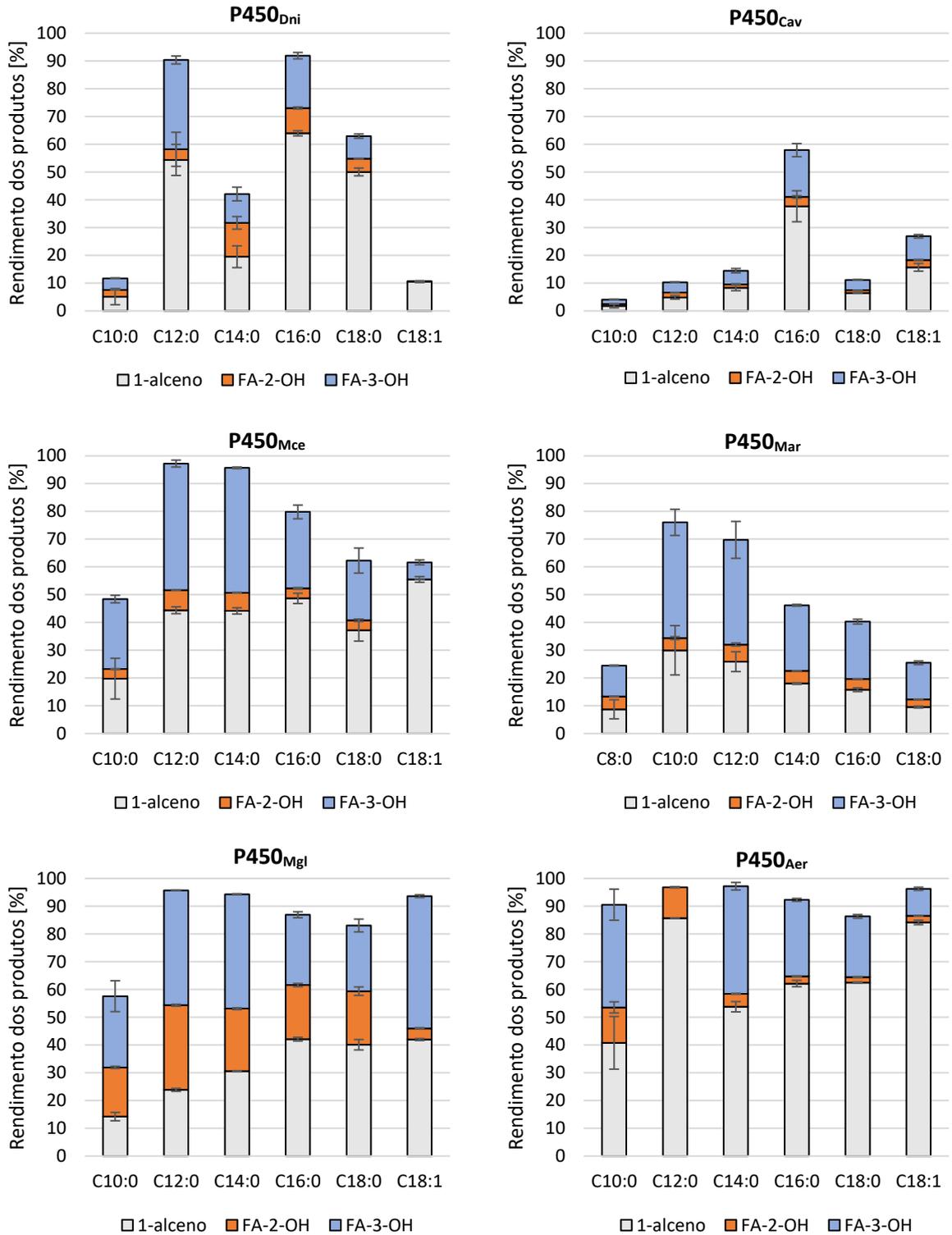
**Figura 16: Avaliação da influência da temperatura na atividade enzimática.** Curvas obtidas a partir da variação da temperatura em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e concentração de NaCl de acordo com os ideais encontrados nas análises anteriores.

Em relação ao efeito da temperatura na atividade enzimática, observou-se que as peroxigenases P450<sub>Mce</sub> e P450<sub>Mgl</sub> apresentam preferência por temperaturas mais altas, com pico de atividade em torno de 55 °C (Figura 16C e 16E). Por outro lado, a enzima P450<sub>Cav</sub> (Figura 16B) apresentou a temperatura ótima mais baixa (35 °C) dentre as P450 analisadas neste

projeto, seguida das enzimas P450<sub>Dni</sub> e P450<sub>Mar</sub> (Figura 16A e 16D), ambas com maior atividade em 40 °C. Esses resultados se assemelham ao descrito para a enzima OleTP<sub>RN</sub>, que apresenta melhores conversões entre 30 °C e 35 °C (RADE et al., 2023). Por fim, a proteína P450<sub>Aer</sub> demonstrou ser mais ativa à 45 °C (Figura 16E), temperatura intermediária entre as enzimas avaliadas. A partir desses resultados, pode-se afirmar que todos os valores de atividade máxima encontrados divergem consideravelmente da temperatura ótima de atividade da enzima OleT<sub>JE</sub> (28 °C) (LIU et al., 2014). Essa variação indica, possivelmente, que a característica termofílica pode ser intrínseca aos organismos do cluster analisado, com destaque para o Cluster 3, cujas proteínas apresentaram os valores mais altos. A característica termofílica das enzimas pode, ainda, auxiliar numa possível aplicação industrial em sistemas *cell free*, já que a utilização de temperaturas altas pode minimizar problemas de contaminação por microrganismos durante a reação. Além disso, as temperaturas correspondentes à diminuição brusca da atividade são similares aos valores de *T<sub>m</sub>* obtidos por dicroísmo circular (Figura 13), indicando que a queda de atividade, observada nas temperaturas mais altas, pode estar relacionada à perda da estrutura secundária adequada para a catálise da reação.

#### **4.7 Análise de Cromatografia Gasosa (GC) para a produção de alcenos.**

A identificação e quantificação dos produtos das reações enzimáticas foi realizada através da cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama. Essa técnica permite a separação de misturas complexas de analitos voláteis, sendo possível sua quantificação a partir de padrões internos (DALLÜGE; BEENS; BRINKMAN, 2003). Assim, a fim de se verificar a capacidade das enzimas em atuar em diferentes substratos, as reações foram conduzidas utilizando os ácidos graxos C10:0 (ácido caprílico), C12:0 (ácido láurico), C14:0 (ácido mirístico), C16:0 (ácido palmítico), C18:0 (ácido esteárico) e C18:1 (ácido oleico). As condições de reação para cada enzima foram estipuladas a partir dos dados obtidos na caracterização bioquímica descrita anteriormente. Utilizou-se os valores de pH, temperatura e concentração de NaCl em que as proteínas apresentaram valor máximo de atividade peroxigenase. Os resultados de GC-FID estão representados na Figura 17.



**Figura 17: Perfil de produção de alcenos e hidroxilados.** As reações foram conduzidas em uma faixa de ácidos graxos e utilizando-se as condições ótimas de pH, temperatura e concentração de sal observados na caracterização bioquímica. Em cinza está representada a produção de alcenos, em laranja a produção de  $\alpha$ -hidroxilados e em azul os  $\beta$ -hidroxilados.

A partir das análises representadas na Figura 17, é possível observar a presença de produtos hidroxilados e alcenos para todos os substratos e enzimas testadas, confirmando que todas as enzimas podem ser consideradas OleTs. Foi possível observar também que, em alguns casos, não houve conversão total (100%) do substrato em produto pela enzima. Dentre as enzimas avaliadas, a OleT<sub>Cav</sub> apresentou as menores conversões de substrato, no geral. Por outro lado, a OleT<sub>Aer</sub> apresentou resultados promissores, principalmente na conversão de C12:0 e C18:1.

A obtenção de 1-noneno, a partir de C10:0, ocorreu em maior porcentagem através da catálise com as enzimas OleT<sub>Aer</sub> e OleT<sub>Mar</sub>. Esta última, ainda, demonstrou uma clara preferência a substratos de cadeia carbônica menores, havendo diminuição na taxa de conversão de hidroxilados e alcenos, conforme houve um aumento no tamanho da cadeia. Entretanto, os produtos hidroxilados em C10:0 correspondem a uma grande porcentagem em ambos os casos, apresentando resultados menos satisfatórios, nesse substrato, quando comparados a enzimas descritas na literatura, que obtiveram conversões próximos à 60% (JIANG et al., 2019; MATTHEWS et al., 2017; RADE et al., 2023; XU et al., 2017).

Dentre todos os ácidos graxos avaliados, o C12:0 apresentou maior porcentagem de conversão em alceno terminal pela enzima OleT<sub>Aer</sub>, superando inclusive valores descritos na literatura para a OleT<sub>JE</sub>, OleT<sub>SA</sub> e OleT<sub>PRN</sub> e se aproximando dos observados para OleT<sub>JH</sub> e OleT<sub>SQ</sub>, ambas com conversões próximas a 80% (JIANG et al., 2019; LIU et al., 2014; MATTHEWS et al., 2017; RADE et al., 2023). Além da OleT<sub>Aer</sub>, a OleT<sub>Dni</sub> também apresentou boa taxa de descarboxilação, com cerca de 55% de produção de alcenos, o que indica uma tendência à descarboxilação frente à hidroxilação desse substrato. Esses resultados indicam a possibilidade de aplicação futura dessas enzimas para a produção de 1-undeceno a partir do ácido láurico.

A produção de 1-trideceno ocorreu em maior proporção nas reações com as enzimas OleT<sub>Aer</sub> e OleT<sub>Mce</sub>. Ainda assim, os valores observados de conversão não foram tão elevados quanto os descritos por LIU et al., 2014 e RADE et al., 2023 ao utilizar as OleT<sub>JE</sub> (cerca de 95% de conversão) e OleT<sub>RN</sub> (60% de conversão), respectivamente (JIANG et al., 2019). Em relação à produção de 1-pentadeceno, as enzimas OleT<sub>Dni</sub> e OleT<sub>Aer</sub> obtiveram rendimentos bastante similares, com as melhores taxas de conversão de ácido palmítico (cerca de 60%). Esse resultado se aproxima ou ultrapassa valores encontrados na literatura para demais enzimas

P450, que variam de cerca de 10% a um pouco mais de 60% (JIANG et al., 2019; LIU et al., 2014; MATTHEWS et al., 2017; RADE et al., 2023; XU et al., 2017).

As enzimas OleT<sub>Mce</sub>, OleT<sub>Dni</sub> e, principalmente, OleT<sub>Aer</sub> demonstraram grande capacidade de conversão de ácido esteárico em 1-heptadeceno, alcançando resultados semelhantes ao descritos por RADE et al., 2023 com a OleT<sub>PRN</sub> (60%). Tal substrato não é comumente o preferencial de enzimas descarboxilases P450 (JIANG et al., 2019; LIU et al., 2014; XU et al., 2017). Em 2017, um estudo publicado por MATTHEWS et al., 2017, investigou o papel de alguns aminoácidos nas reações catalisadas por OleT<sub>JE</sub>. Os autores do artigo demonstraram que a variante R245L de OleT<sub>JE</sub> apresenta uma mudança de perfil de descarboxilação, havendo uma diminuição na produção de alcenos de cadeia média, porém com um aumento na produção de 1-heptadeceno. A porcentagem de conversão obtida na análise dessa variante é próxima do obtido a partir das catálises com OleT<sub>Aer</sub> e OleT<sub>Dni</sub>.

Por fim, as enzimas OleT<sub>Mce</sub> e OleT<sub>Aer</sub> demonstraram, ainda, serem capazes de converter o substrato monoinsaturado ácido oleico (C18:1), com altas taxas de formação de 1,8-heptadecadieno. Este ácido graxo corresponde a um dos FA mais abundantes na natureza, podendo ser encontrado na maioria dos óleos naturais (NTAMBI; MIYAZAKI, 2003). Assim, é de grande interesse a descoberta de OleTs capazes de atuar com eficiência nesse substrato. Até o momento, apenas a OleT<sub>PRN</sub> demonstrou essa capacidade, porém, com um rendimento menor que o encontrado para a OleT<sub>Aer</sub>, cerca de 60%.

Esses resultados podem contribuir significativamente para aumentar o arsenal de enzimas nativas disponíveis para serem utilizadas na produção de alcenos a partir de ácidos graxos, principalmente de cadeias longas. Além disso, a capacidade de descarboxilação de ácidos graxos de diferentes tamanhos e insaturações, com destaque para as taxas de conversão obtidas com a enzima OleT<sub>Aer</sub>, indica que as peroxigenases P450 aqui estudadas se apresentam como bons alvos para serem utilizados na produção *in vitro* e *in vivo* de hidrocarbonetos. Dessa forma, a OleT<sub>Aer</sub> foi selecionada para o engenheiramento da levedura oleaginosa *Y. lipolytica*.

#### **4.8 Seleção da enzima e construção dos vetores para produção *in vivo* de alcenos**

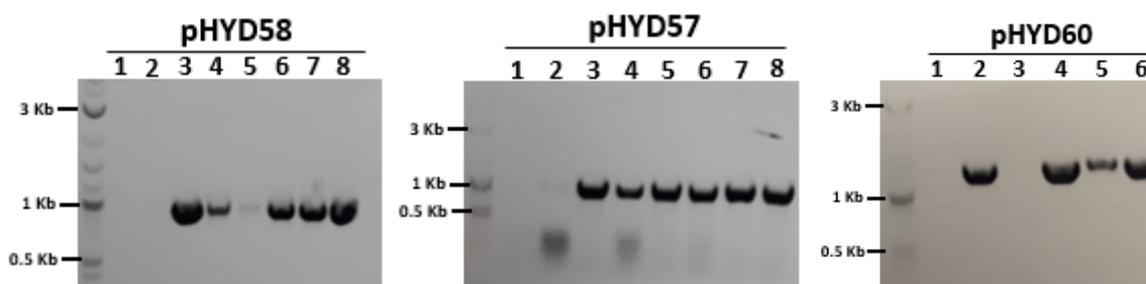
Os resultados obtidos a partir das análises de GC-FID indicaram a OleT<sub>Aer</sub> como a mais promissora na conversão de ácidos graxos em alcenos terminais, com destaque para as altas taxas de conversão do ácido oleico, o ácido graxo mais abundante em *Y. lipolytica*. Além disso,

a OleT<sub>Aer</sub> também apresenta atividade catalítica em condições fisiológicas, ou seja, pH 7-7,5 e 30-35°C. Assim, essa proteína foi selecionada para a construção de vetores para a produção *in vivo* de hidrocarbonetos na levedura oleaginosa *Y. lipolytica*. A enzima OleTP<sub>RN</sub> também foi utilizada para se obter uma referência na produção final de alcenos. Como descrito anteriormente, a OleTP<sub>RN</sub> já foi bem caracterizada e apresenta excelentes resultados em diferentes substratos, além de possuir atividade ótima em condições de temperatura e pH mais próximos da encontrada no meio intracelular de leveduras (RADE et al., 2023). Desta forma, ao final do projeto, comparou-se a produção total de hidrocarbonetos para ambas as construções, resultado que será discutido posteriormente. Os genes foram sintetizados comercialmente e, com a finalidade de garantir a disponibilidade de ácidos graxos e o co-substrato peróxido de hidrogênio para a atividade catalítica da enzima, o sinal de direcionamento de peroxissomo PTS1 (*Peroxisome Targeting Signal* tipo 1) foi adicionado ao final dos genes. O PTS1 codifica um tripeptídeo no C-terminal de proteínas, direcionando-as à matriz do peroxissomo. Em muitos organismos eucariotos, essa organela é responsável pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, produzindo peróxido de hidrogênio como subproduto da reação (YELDANDI; RAO; REDDY, 2000). Assim, acredita-se que o endereçamento de peroxigenases P450 para o peroxissomo facilite a obtenção tanto do substrato quanto do co-substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os vetores foram construídos a partir da técnica de *Golden Gate*. Todas as partes utilizadas são flanqueadas por sequências complementares (*overhangs*) entre as diferentes partes biológicas (promotores e terminadores), desenhadas de forma racional. Assim, durante o *assembly*, cada parte se liga de acordo com a complementariedade do *building block* correspondente, impedindo, por exemplo, o fechamento do plasmídeo sem que haja a inserção do gene.

Para a construção dos vetores para superexpressão da OleT<sub>Aer</sub>, o terminador utilizado em todas as construções foi o tLIP2 (*Extracellular Lipase*), um dos mais encontrados na literatura em cassetes para expressão em *Y. lipolytica*. Além disso, testou-se duas versões distintas do promotor TEF (*Translation Elongation Factor*): o promotor nativo pTEF1 e uma variante para aumento da expressão da proteína recombinante (8UAS-pTEF), que contém um *enhancer* acoplado (UAS), cuja sequência é repetida 8 vezes. Assim, é possível verificar se a superexpressão do gene heterólogo provoca toxicidade celular, afetando o crescimento das cepas construídas. Por fim, o vetor *backbone* utilizado possui o gene LEU2 para seleção

auxotrófica dos transformantes de *Y. lipolytica*, além dos genes de resistência à espectinomicina, para seleção em bactéria, e GFP (*Green Fluorescent Protein*) como gene repórter. Após as montagens *in vitro* dos plasmídeos, as reações foram utilizadas para transformação em *E. coli* TOP10 em meio LB contendo espectinomicina. O gene GFP, presente no *backbone*, é flanqueado pelos sítios de restrição utilizados para clonagem, de forma que, durante o *assembly* das partes, esse gene é substituído pelo cassete de expressão, servindo de repórter de falsos negativos. Para validação dos transformantes, utilizou-se primers específicos para a região promotora e o gene de interesse inserido (Tabela 2), resultando em produtos de PCR de, aproximadamente, 950 pb (Figura 18). Assim, obteve-se as construções pHYD57 e pHYD58, contendo os promotores 8UAS-pTEF e pTEF1, respectivamente. Após um teste preliminar de transformação de *Y. lipolytica* com os plasmídeos recombinantes contendo OleT<sub>Aer</sub>, pode-se verificar que a expressão da enzima OleT<sub>Aer</sub> sob o promotor 8UAS-pTEF não afetava expressivamente o crescimento das colônias (resultado discutido posteriormente), assim, a mesma estratégia de clonagem foi realizada para o gene da OleTP<sub>RN</sub> com o promotor 8UAS-pTEF (pHYD60). Todos os vetores recombinantes foram posteriormente validados por sequenciamento.



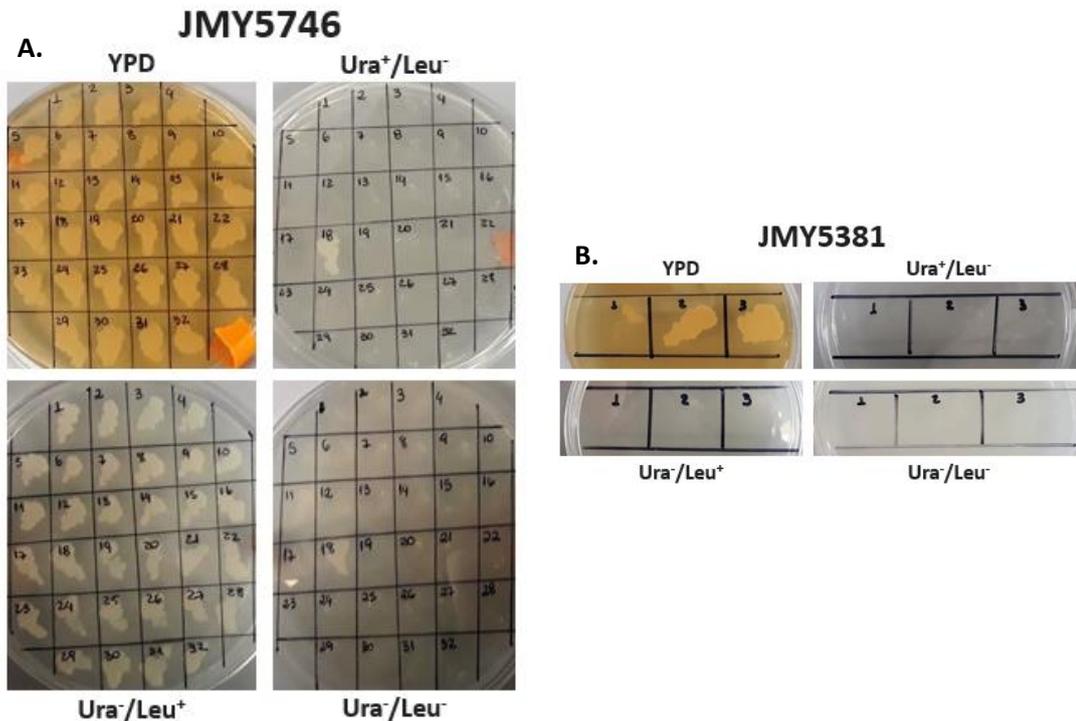
**Figura 18: Corrida de gel de agarose 1% com as amostras de PCR de colônia.** Após a transformação em *E. coli* TOP 10, os candidatos foram submetidos à PCR de colônia e os positivos foram identificados a partir da amplificação de fragmentos de 950 pb, para os vetores pHYD58 e pHYD57, e 1200 pb, para o vetor pHYD60.

#### 4.9 Construção das cepas de *Y. lipolytica* para produção *in vivo* de alcenos

Neste trabalho, foram utilizadas quatro cepas parentais, a cepa nativa *Y. lipolytica* Po1d, utilizada como controle, e três cepas engenheiradas anteriormente, sendo elas as cepas *Y. lipolytica* Obese, JMY5746 e JMY5381. A cepa Obese foi selecionada devido à sua capacidade de acumular altas quantidades de lipídio intracelular, mas não necessariamente FFA. De acordo

com LAZAR et al., 2014, a síntese lipídica da Obese foi aprimorada através da superexpressão de GPD1, gene importante para a formação de glicerol-3-fosfato, e DGA2, responsável por promover a formação de bolsas lipídicas (*Lipid droplets*). Por outro lado, as cepas JMY5746 e JMY5381 foram engenheiradas para superprodução de FFA. De acordo com LEDESMA-AMARO et al., 2016, estas cepas foram construídas baseadas em deleções e superexpressões de genes importantes para a produção e exportação de FFA. Ambas possuem interrupções nos genes da acil-CoA sintetase ( $\Delta faa1$ ) e multifunctional  $\beta$ -oxidation protein ( $\Delta mfe1$ ), essenciais para a degradação de ácidos graxos pela via de  $\beta$ -oxidação. No entanto, a cepa JMY5746 possui ainda a superexpressão dos genes DGA2 e TGL4, sendo o segundo responsável por codificar uma lipase, a fim de reciclar o ácido graxo livre incorporado aos triglicerídeos. Em contraste, DGA1 e DGA2, além de outros genes, foram deletados na cepa JMY5381, impedindo a formação das bolsas lipídicas, por coibir a formação de acilgliceróis e mantendo o ácido graxo na forma livre. Neste caso, a estratégia utilizada consiste em mimetizar a via bacteriana para a síntese de FFA (GIRVAN; MUNRO, 2016). Em bactérias, a síntese é conduzida por diferentes enzimas, entre elas uma tioesterase, que estaria diretamente relacionada à liberação de FFA para o citoplasma. Assim, a superexpressão de genes heterólogos da Acil-Coa tioesterase Rn-TEII aparenta aumentar a secreção de FFA na ausência de DGA1 e DGA2 (GIRVAN; MUNRO, 2016).

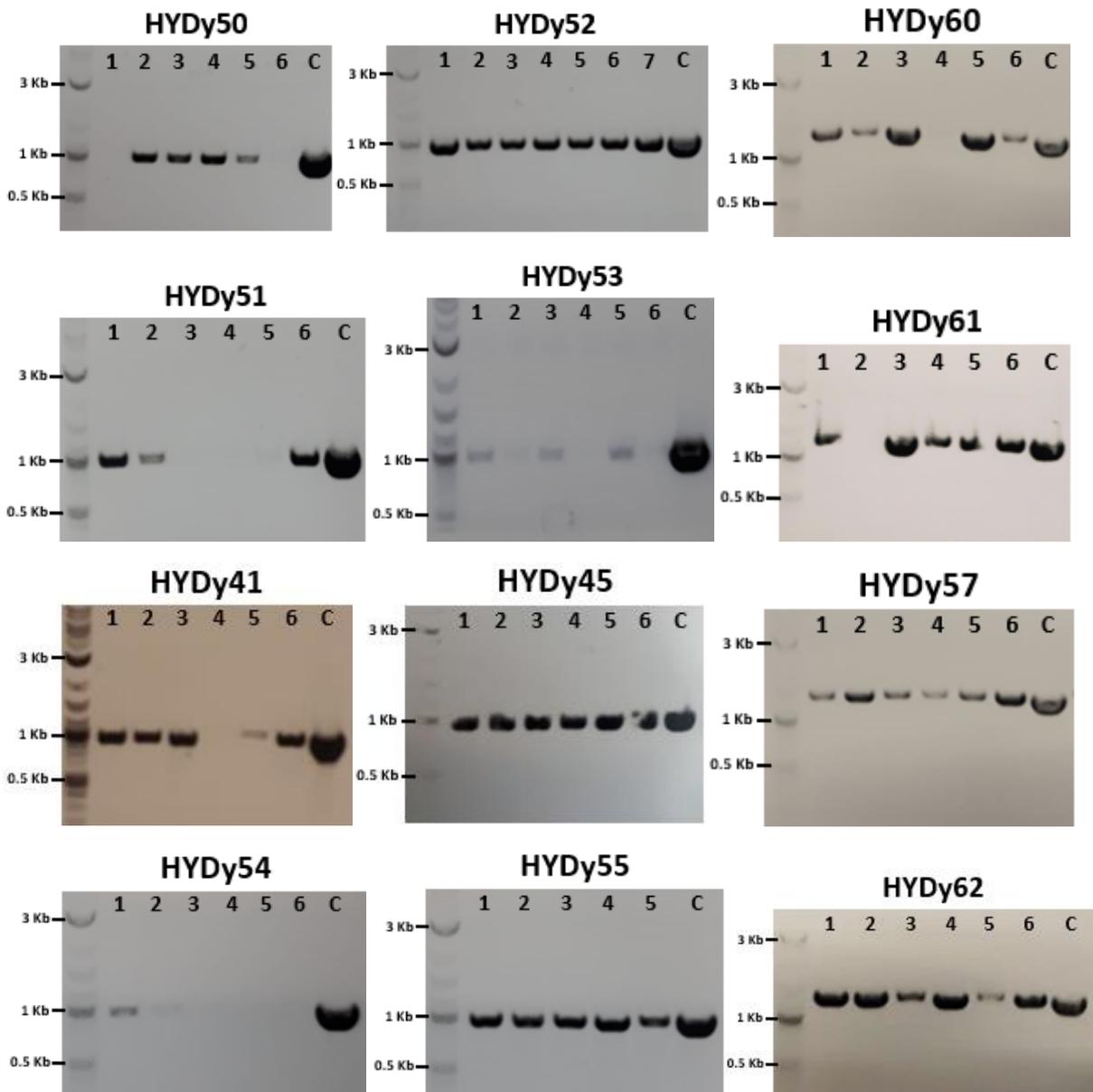
Para facilitar a seleção dos transformantes sem a necessidade de utilização de antibióticos, foi realizado primeiramente o *knockout* de LEU2 nas cepas JMY5746 e JMY5381, pois ambas são originalmente prototróficas. A deleção ocorreu pelo sistema de recombinação Cre-LoxP, técnica utilizada para excisar, inverter, translocar ou inserir um gene, a partir de sítios de 34 pb (loxP) que se recombinam quando a enzima Cre (*Causes recombination*) recombinase é expressa (KÜHN; TORRES, 2002). As cepas JMY5746 e JMY5381 foram previamente construídas com os genes LEU2 e URA3 sendo flanqueados por motivos loxP. Desta forma, para a deleção de LEU2 neste trabalho, as cepas foram transformadas utilizando um plasmídeo epissomal, com resistência à higromicina, contendo a sequência da recombinase Cre, selecionadas em meio YPD e posteriormente testadas em meio mínimo contendo uracila e/ou leucina. Os resultados obtidos das deleções podem ser observados na Figura 19



**Figura 19: Seleção de cepas com auxotrofia para leucina e uracila.** (A) Depois da transformação com a cepa JMY5746 utilizando o plasmídeo contendo a Cre recombinase, os candidatos foram plaqueados em diferentes meios. Todos os candidatos cresceram em YPD e SMD Ura<sup>+</sup>, enquanto apenas a cepa de número 18 foi capaz de crescer em SMD Leu<sup>+</sup>, indicando que as demais tiveram o gene LEU2 removido. (B) Após a transformação com a JMY5381 utilizando o plasmídeo com a Cre recombinase, apenas 3 colônias cresceram na placa. Essas colônias foram estriadas em diferentes meios para *screening*. Todos os candidatos cresceram em YPD, porém nenhuma foi capaz de crescer nas outras condições, indicando que todos os candidatos tiveram ambos os genes (URA3 e LEU2) removidos.

Como observado na Figura 19, com exceção do mutante 18, nenhum dos candidatos da JMY5746 cresceram em meio sem suplementação de leucina, indicando que o gene LEU2 foi removido com sucesso. Além disso, todos os candidatos cresceram na placa sem suplementação de uracila, indicando que o gene URA3 permaneceu intacto. Em contraste, os mutantes da cepa parental JMY5381 cresceram apenas em meio suplementado com ambos os substratos, indicando o *knockout* de ambos os genes. Após a obtenção de todas as cepas auxotróficas, estas foram, então, transformadas utilizando-se os vetores construídos anteriormente. As inserções dos genes heterólogos no genoma foram confirmados por PCR de colônia (Figura 20), utilizando os mesmo primers usados durante a criação dos vetores, e um clone de cada transformação foi selecionado para seguir para os próximos ensaios. Desta forma, 12 novos mutantes de *Y. lipolytica* foram gerados, resultante das transformações das cepas Pold

(HYDy50, 52 e 60), Obese (HYDy51, 53 e 61), JMY5746 (HYDy41, 45 e 57) e JMY5381 (HYDy54, 55 e 62), com os vetores pHYD58, pHYD57 e pHYD60 (respectivamente).



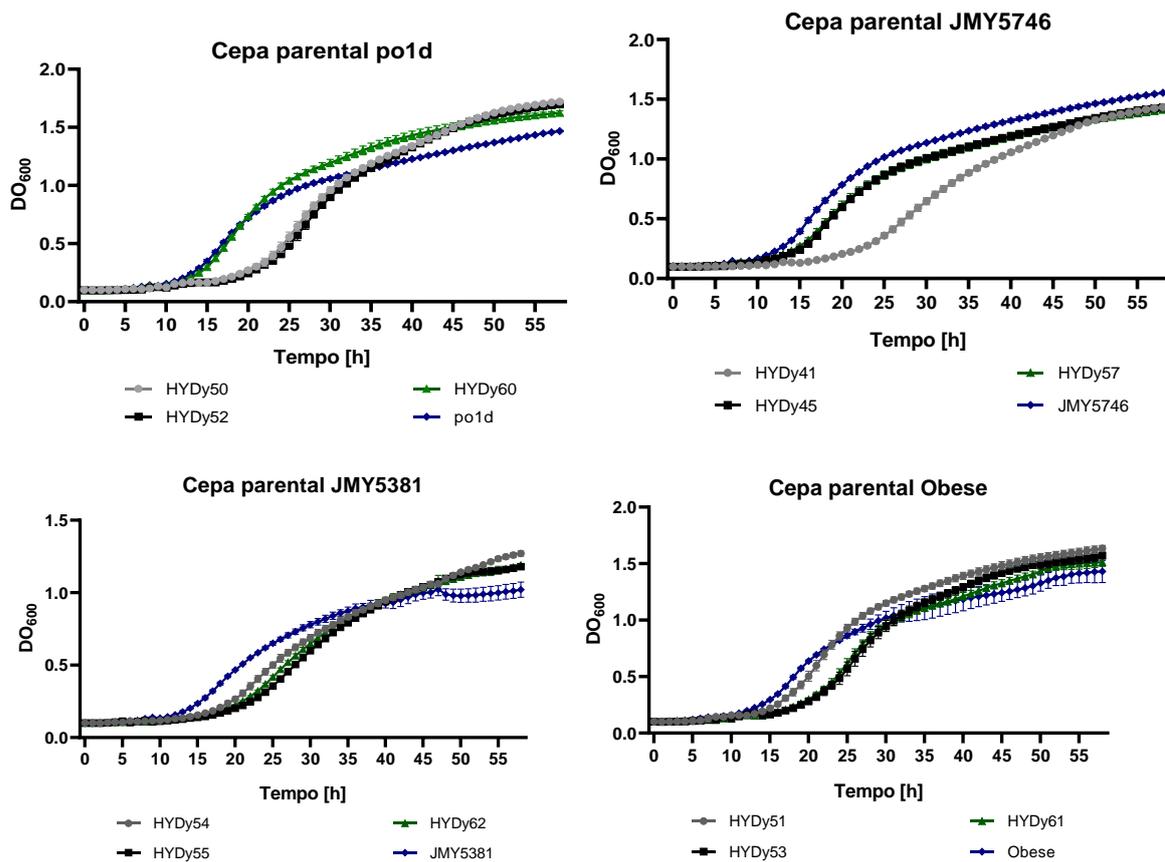
**Figura 20:** Gel de agarose das transformações em *Y. lipolytica*. As PCRs de colônia foram feitas utilizando-se o mesmo par de primers usado para a construção dos vetores. Para o vetor pHYD58 e pHYD57, o fragmento gerado foi de aproximadamente 950 pb, enquanto que para a construção pHYD60, os fragmentos gerados foram de aproximadamente 1200 pb.

Para os próximos passos, as cepas ainda auxotróficas para uracila foram transformadas novamente com um cassete contendo o gene *URA3*, restaurando a prototrofia. Assim, não há a

necessidade de suplementação do meio com essa base nitrogenada durante o cultivo. Todas as cepas de *Y. lipolytica* construídas nesse trabalho foram apresentadas na Tabela 1.

#### 4.10 Teste de Crescimento das cepas de *Y. lipolytica*

A avaliação do efeito da expressão gênica no crescimento das cepas engenheiradas foi realizada a partir de um teste em meio SMD 6%, com alta concentração de glicose e baixa disponibilidade de nitrogênio. Sabe-se que uma alta razão C/N afeta diretamente a produção de bolsas lipídicas e, conseqüentemente, a síntese de FFA (LEDESMA-AMARO et al., 2016). O crescimento foi avaliado em placas de 96 poços, em triplicata biológica, e as cepas parentais foram utilizadas como controle. As curvas obtidas podem ser observadas na Figura 21.



**Figura 21: Curvas de crescimento em meio sintético comparando as cepas engenheiradas e seus respectivos parentais.** Todas as cepas construídas nesse trabalho atingiram DO<sub>600</sub> finais similares aos controles.

De acordo com a Figura 21, especialmente as cepas HYDy41, HYDy50 e HYDy52 apresentaram uma fase lag mais longa, quando comparadas aos respectivos controles, indicando que a expressão da  $OleT_{Aer}$  pode aumentar o período de latência da célula, a depender da construção. Entretanto, todas atingiram uma DO final muito similar. Além disso, a partir dos dados de crescimento celular, a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) e o tempo de duplicação de cada cepa foram determinados (Tabela 6).

Cepa	$\mu_{m\acute{a}x}$ ( $h^{-1}$ )	Tempo de duplicação (h)
HYDy50	$0,1066 \pm 0,0031$	6,5641
HYDy52	$0,108 \pm 0,0026$	6,4635
HYDy60	$0,1222 \pm 0,003$	5,7274
po1d	$0,1106 \pm 0,0048$	6,3240
HYDy41	$0,0962 \pm 0,0016$	7,2727
HYDy45	$0,1109 \pm 0,0045$	6,3074
HYDy57	$0,11 \pm 0,0040$	6,3625
JMY5746	$0,1123 \pm 0,004$	6,2327
HYDy54	$0,0854 \pm 0,0027$	8,1900
HYDy55	$0,1064 \pm 0,0014$	6,5777
HYDy62	$0,1038 \pm 0,0015$	6,7411
JMY5381	$0,1226 \pm 0,0022$	5,7092
HYDy51	$0,120 \pm 0,0037$	5,7947
HYDy53	$0,1179 \pm 0,0028$	5,9342
HYDy61	$0,1112 \pm 0,0041$	6,2938
Obese	$0,1044 \pm 0,0042$	6,6992

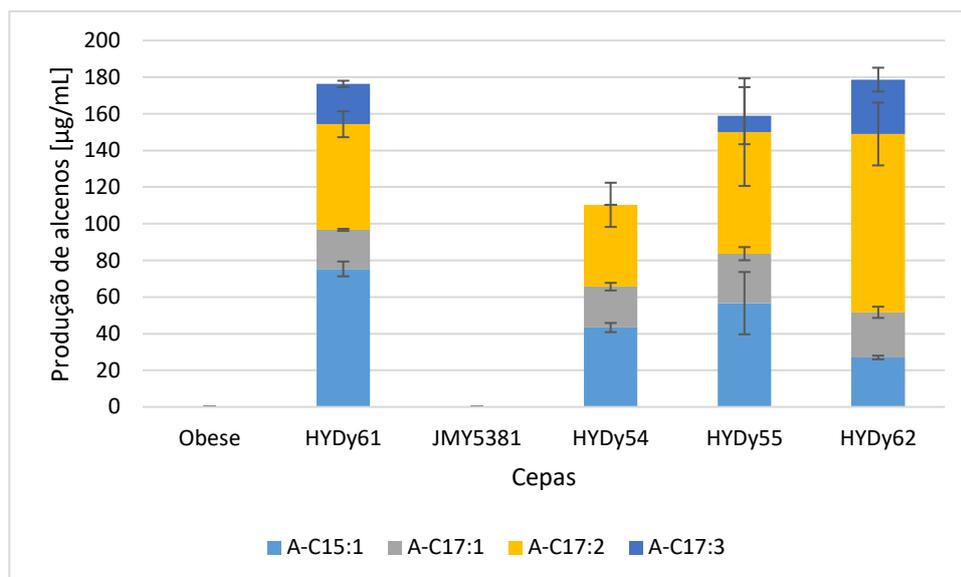
**Tabela 6: Valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  e tempo de duplicação calculados a partir de dados experimentais.** Os dados indicam valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  similares entre os respectivos controles e as cepas construídas.

Considerando-se os valores obtidos é possível concluir que as cepas construídas a partir da po1d e Obese possuem  $\mu_{m\acute{a}x}$  similares à parental, apresentando, inclusive, valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  superiores ao controle, como observado na HYDy51. Em relação às cepas derivadas da JMY5746, a HYDy41 apresentou a menor velocidade específica de crescimento. Por fim, dentre as cepas derivadas da JMY5381, todas demonstraram menores valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  quando comparadas à parental, com destaque para a HYDy54, que apresentou o valor mais baixo. Ainda

assim, de modo geral, os  $\mu_{\text{máx}}$  encontrados são bem próximos entre as cepas construídas e seus respectivos controles, indicando que a inserção do gene, provavelmente, não afetará de forma significativa a utilização dessas cepas para a produção de alcenos.

#### **4.11 Quantificação da produção de alcenos *in vivo***

A quantificação da produção de alcenos foi avaliada após 48h de cultivo à 30 °C em meio SMD 6%, utilizando-se as cepas recombinantes construídas nesse trabalho e seus respectivos controles (cepas parentais). Inicialmente, avaliou-se a produção intra e extracelular através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a HS-SPME. Essa técnica de injeção de amostras se baseia na sorção de analitos em uma fase extratora por uma fibra de sílica. A fibra é exposta ao “espaço vazio” (*headspace*) dos tubos de análise e, após o aquecimento controlado da amostra, ocorre a dessorção térmica do extrato concentrado no amostrador da cromatografia gasosa (VUCKOVIC et al., 2010). Assim, essa técnica permite a detecção de hidrocarbonetos presentes nos tubos de análise, sem a interferência dos ácidos graxos. Os resultados obtidos a partir da quantificação de alcenos pela técnica de HS-SPME acoplada à GC-FID demonstrou que quatro das doze cepas construídas foram capazes de produzir hidrocarbonetos, sendo as três cepas geradas a partir da JMY5381 (HYDy54, HYDy55 e HYDy62) e a cepa Obese superexpressando a enzima OleTP<sub>RN</sub> (HYDy61). No entanto, toda a produção de hidrocarbonetos se manteve dentro da célula. As concentrações calculadas podem ser observados na Figura 22.



**Figura 22: Produção de alcenos das cepas HYDy61, HYDy54, HYDy55 e HYDy62.** Foi possível observar a produção de alcenos em 4 das 12 cepas construídas neste trabalho, sendo as cepas HYDy61 e HYDy62 construídas a partir dos vetores contendo a enzima OleTP<sub>RN</sub> e as cepas HYDy54 e HYDy55 construídas a partir dos vetores contendo a enzima OleT<sub>Aer</sub>. Nas cepas controle Obese e JMY5381 não foi detectado produção de alcenos.

A quantificação da produção de alcenos indicou que a cepa contendo o promotor com o enhancer 8UAS (HYDy55) de fato apresentou um melhor rendimento quando comparado à cepa sem essa região (HYDy54), sendo ambas engenheiradas a partir do vetor contendo a OleT<sub>Aer</sub> e compartilhando a mesma cepa parental (JMY5381). Em relação à produção total de alcenos, pode-se verificar que as cepas contendo o gene da OleTP<sub>RN</sub> (HYDy61 e HYDy62) apresentaram os melhores resultados de produção *in vivo*, principalmente de C17:2. Esse dado conflita com o observado em testes *in vitro*, uma vez que a OleT<sub>Aer</sub> apresenta uma maior taxa de conversão do ácido oleico que a enzima OleTP<sub>RN</sub>. Possivelmente, apesar da OleT<sub>Aer</sub> apresentar atividade em temperaturas e pHs próximos do encontrado no meio intracelular de leveduras (30 °C e pH próximo de 7), essa enzima tem seu pico de atividade em 45 °C e pH 8,5, enquanto a OleTP<sub>RN</sub> possui ótimos próximos a pH 7,5 e 35°C. Essa característica pode ter impactado negativamente o funcionamento da enzima OleT<sub>Aer</sub> quando inserida na levedura. Apesar dos rendimentos obtidos não superarem os valores descritos na literatura de produção *in vivo* de hidrocarbonetos, este trabalho demonstra que as enzimas OleTs possuem um grande potencial, ainda pouco explorado para produção microbiana de hidrocarbonetos renováveis (LI et al., 2020).

## 5. Conclusão

A necessidade de opções mais sustentáveis na produção de hidrocarbonetos evidencia a importância da investigação de rotas biológicas como alternativa à esse problema. Este trabalho, portanto, demonstrou o potencial biotecnológico de enzimas peroxigenases P450 na produção *in vitro* e *in vivo* de alcenos. Ao todo, 7 proteínas foram exploradas e, com exceção da P450<sub>Gsi</sub>, todas se apresentaram como OleTs (olefinas terminais). Além disso, constatou-se que estas possuem tendências menos halofílicas quando comparadas à maioria das OleTs já descritas na literatura, como a proteína modelo OleT<sub>JE</sub>, o que facilita a utilização dessas enzimas em processos industriais. Em relação à eficiência de conversão, o resultado de quantificação de alcenos *in vitro* demonstrou que a OleT<sub>Aer</sub> possui o melhor rendimento na maioria dos substratos avaliados, com destaque para o rendimento obtido a partir do ácido oleico, o ácido graxo mais abundante na natureza. Com base nessas observações, escolheu-se essa enzima para a expressão na levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica*. Essa etapa foi desenvolvida em parceria com o professor Dr. Rodrigo Ledesma-Amaro, do departamento de bioengenharia da Imperial College London. Durante o projeto, construiu-se 12 diferentes cepas, incluindo cepas contendo a enzima OleT<sub>RN</sub>, proteína amplamente estudada pelo grupo de pesquisa da Dra. Leticia Zanphorlin e cujas taxas de conversão em ácido oleico também são promissoras. Os dados demonstraram, ainda, que a expressão dessas enzimas e a produção de alcenos não afeta de modo significativo o crescimento das cepas. Por fim, a avaliação da produção *in vivo* de alcenos demonstrou que, das 12 cepas construídas, 4 foram capazes de produzir hidrocarbonetos em concentrações detectáveis ao método utilizado (cromatografia gasosa). Apesar das concentrações totais de alcenos obtidas ainda serem baixas, essa dissertação reporta pela primeira vez a prova de conceito da produção de olefinas por meio da inserção de enzimas descarboxilases P450 em *Yarrowia lipolytica*. Além disso, esse resultado demonstrou o potencial da engenharia genética, aliada à estratégias de enzimologia, na obtenção de bioprodutos mais sustentáveis.

## 6. Referências

- AMAYA, J. A. et al. A Distal Loop Controls Product Release and Chemo- and Regioselectivity in Cytochrome P450 Decarboxylases. **Biochemistry**, v. 57, n. 3, p. 344–353, 23 jan. 2018.
- ANARI, M. R. et al. Hydrogen Peroxide Supports Human and Rat Cytochrome P450 1A2-Catalyzed 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline Bioactivation to Mutagenic Metabolites: Significance of Cytochrome P450 Peroxygenase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 5, p. 582–588, 1 maio 1997.
- BELCHER, J. et al. Structure and Biochemical Properties of the Alkene Producing Cytochrome P450 OleTJE (CYP152L1) from the *Jeotgalicoccus* sp. 8456 Bacterium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 10, p. 6535–6550, mar. 2014.
- BHARADWAJ, V. S. et al. Different Behaviors of a Substrate in P450 Decarboxylase and Hydroxylase Reveal Reactivity-Enabling Actors. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- BRUDER, S. et al. Drop-in biofuel production using fatty acid photodecarboxylase from *Chlorella variabilis* in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 202, 24 dez. 2019.
- CELIŃSKA, E. et al. Golden Gate Assembly system dedicated to complex pathway manipulation in *Yarrowia lipolytica*. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 450–455, 19 mar. 2017.
- CHEN, B.; LEE, D.-Y.; CHANG, M. W. Combinatorial metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for terminal alkene production. **Metabolic Engineering**, v. 31, p. 53–61, set. 2015.
- DALLÜGE, J.; BEENS, J.; BRINKMAN, U. A. T. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 69–108, jun. 2003.
- DELONG, J. M. et al. Using a Modified Ferrous Oxidation–Xylenol Orange (FOX) Assay for Detection of Lipid Hydroperoxides in Plant Tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 248–254, 1 jan. 2002.
- FANG, B. et al. Mutagenesis and redox partners analysis of the P450 fatty acid decarboxylase OleTJE. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44258, 9 mar. 2017.
- GIRVAN, H. M.; MUNRO, A. W. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 31, p. 136–145, abr. 2016.
- GUENGERICH, F. PETER. Cytochrome P450 enzymes. **American Scientist**, v. 81, n. 5, p. 440–447, 1993.

- HRYCAY, E. G.; BANDIERA, S. M. The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 522, n. 2, p. 71–89, jun. 2012.
- JIANG, Y. et al. Biochemical characterization of three new  $\alpha$ -olefin-producing P450 fatty acid decarboxylases with a halophilic property. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 79, 8 dez. 2019.
- JURETZEK, T. et al. Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**, v. 18, n. 2, p. 97–113, 30 jan. 2001.
- KARATZOS, S. et al. Drop-in biofuel production via conventional (lipid/fatty acid) and advanced (biomass) routes. Part I. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 2, p. 344–362, 23 mar. 2017.
- KARATZOS, S.; MCMILLAN, J. D.; SADDLER, J. N. The potential and challenges of drop-in biofuels. **Report for IEA Bioenergy Task**, v. 39, 2014.
- KÜHN, R.; TORRES, R. M. Cre/ loxP Recombination System and Gene Targeting. Em: **Transgenesis Techniques**. New Jersey: Humana Press, 2002. p. 175–204.
- LAZAR, Z. et al. Hexokinase—A limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering**, v. 26, p. 89–99, nov. 2014.
- LEDESMA-AMARO, R. et al. Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids. **Metabolic Engineering**, v. 38, p. 38–46, nov. 2016.
- LEDESMA-AMARO, R.; NICAUD, J.-M. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 61, p. 40–50, jan. 2016.
- LEE, M. E. et al. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 9, p. 975–986, 18 set. 2015.
- LI, J. et al. Synthesis of high-titer alka(e)nes in *Yarrowia lipolytica* is enabled by a discovered mechanism. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 6198, 3 dez. 2020.
- LIU, H. et al. *Yarrowia lipolytica* as an Oleaginous Platform for the Production of Value-Added Fatty Acid-Based Bioproducts. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 5 jan. 2021a.
- LIU, Y. et al. Hydrogen peroxide-independent production of  $\alpha$ -alkenes by OleTJE P450 fatty acid decarboxylase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 28, 2014.
- LIU, Z. et al. Yeasts as microbial cell factories for sustainable production of biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 143, p. 110907, jun. 2021b.
- LU, C. et al. An Engineered Self-Sufficient Biocatalyst Enables Scalable Production of Linear  $\alpha$ -Olefins from Carboxylic Acids. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 7, p. 5794–5798, 6 jul. 2018.
- LUTHRA, A.; DENISOV, I. G.; SLIGAR, S. G. Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 507, n. 1, p. 26–35, mar. 2011.

- MATSUNAGA, I. et al. Characterization of the *ybdT* gene product of *Bacillus subtilis* : Novel fatty acid  $\beta$ -hydroxylating cytochrome P450. **Lipids**, v. 34, n. 8, p. 841–846, ago. 1999.
- MATSUNAGA, I. et al. Fatty acid-specific, regiospecific, and stereospecific hydroxylation by cytochrome P450 (CYP152B1) from *Sphingomonas paucimobilis* : Substrate structure required for  $\alpha$ -hydroxylation. **Lipids**, v. 35, n. 4, p. 365–371, abr. 2000.
- MATTHEWS, S. et al. Catalytic Determinants of Alkene Production by the Cytochrome P450 Peroxygenase OleTJE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 12, p. 5128–5143, mar. 2017.
- MUNRO, A. W. et al. Structure and function of the cytochrome P450 peroxygenase enzymes. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 1, p. 183–196, 19 fev. 2018.
- NEBERT, D. W.; GONZALEZ, F. J. P450 genes: structure, evolution, and regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 945–993, jun. 1987.
- NICAUD, J.-M. et al. Cloning, sequencing and amplification of the alkaline extracellular protease (XPR2) gene of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3–4, p. 285–297, dez. 1989.
- NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M. Recent insights into stearyl-CoA desaturase-1. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, n. 3, p. 255–261, jun. 2003.
- PERALTA-YAHYA, P. P. et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 320–328, 15 ago. 2012a.
- PERALTA-YAHYA, P. P. et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 320–328, 15 ago. 2012b.
- RADE, L. L. et al. Dimer-assisted mechanism of (un)saturated fatty acid decarboxylation for alkene production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 22, 30 maio 2023.
- RUDE, M. A. et al. Terminal Olefin (1-Alkene) Biosynthesis by a Novel P450 Fatty Acid Decarboxylase from *Jeotgalicoccus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1718–1727, mar. 2011.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. ed. [s.l.] Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- SCHOWEN, R. L. Principles of biochemistry 2nd ed. (Lehninger, Albert L.; Nelson, David L.; Cox, Michael M.). **Journal of Chemical Education**, v. 70, n. 8, p. A223, ago. 1993.
- SOME, D. et al. Characterization of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled to Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). **Journal of Visualized Experiments**, n. 148, 20 jun. 2019.
- SORIGUÉ, D. et al. An algal photoenzyme converts fatty acids to hydrocarbons. **Science**, v. 357, n. 6354, p. 903–907, set. 2017.

VAN DER KLIS, F. et al. Renewable linear alpha olefins by selective ethenolysis of decarboxylated unsaturated fatty acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 8, p. 911–918, 18 ago. 2012.

VUCKOVIC, D. et al. Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4041–4060, jun. 2010.

WANG, K. et al. Advances in synthetic biology tools paving the way for the biomanufacturing of unusual fatty acids using the *Yarrowia lipolytica* chassis. **Biotechnology Advances**, v. 59, p. 107984, out. 2022.

XU, H. et al. In vitro oxidative decarboxylation of free fatty acids to terminal alkenes by two new P450 peroxygenases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 208, 7 dez. 2017.

YELDANDI, A. V; RAO, M. S.; REDDY, J. K. Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 448, n. 2, p. 159–177, mar. 2000.

ZACHOS, I. et al. Photobiocatalytic decarboxylation for olefin synthesis. **Chemical Communications**, v. 51, n. 10, p. 1918–1921, 2015.

ZEHETNER, P.; HÖFERL, M.; BUCHBAUER, G. Essential oil components and cytochrome P450 enzymes: a review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, n. 4, p. 223–240, 5 jul. 2019.

ZHANG, Y. -H. P. Production of biocommodities and bioelectricity by cell-free synthetic enzymatic pathway biotransformations: Challenges and opportunities. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 4, p. 663–677, 19 mar. 2010.

ZHANG, Z. et al. Cytochrome P450 3A4-Mediated Oxidative Conversion of a Cyano to an Amide Group in the Metabolism of Pinacidil. **Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 2712–2718, 1 fev. 2002.

## 7. Anexo — Declaração de Biossegurança

Campinas, 23 de março de 2023.

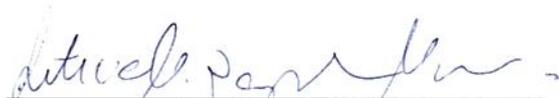
Para o Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da FCF-Unicamp

Ref. Declaração de Biossegurança

Prezados,

Declaramos para os fins da pós-graduação, que **Isabelle Taira Simões** desenvolve seu projeto de pesquisa associado à sua tese, intitulada “**Estudo de enzimas P450 da família CYP152 capazes de promover a descarboxilação de ácidos graxos**”, sob orientação da Dra. **Leticia Maria Zanphorlin Murakami**. O projeto utiliza organismos geneticamente modificados, classe de risco I, cumprindo os requisitos de biossegurança necessários, que integram o protocolo CIBio 2020-08 “Investigação molecular de novas peroxigenases para produção de hidrocarbonetos renováveis”, o qual foi **APROVADO** para execução no CNPEM.

Atenciosamente,



Leticia Maria Zanphorlin, PhD  
Orientadora / Pesquisadora responsável



Marcio Chaim Bajgelman, PhD  
Presidente da CIBio - CNPEM