



CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ENERGIA E MATERIAIS (CNPEM)
LABORATÓRIO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO BIOETANOL (CTBE)

PROJETO DE PESQUISA - PIBIC

Peroxigenases P450: estudo da relação enzima/substrato para aplicação em bioenergia

Dra. Leticia Maria Zanphorlin

Orientador

2019

RESUMO

Os biocombustíveis *drop-in* são constituídos de biohidrocarbonetos (ou hidrocarbonetos renováveis), formados por cadeias médias e longas de alcenos/alcenos, os quais apresentam composições químicas e características físicas semelhantes aos combustíveis convencionais de petróleo. Essas propriedades garantem o compartilhamento da infraestrutura já utilizada na distribuição da gasolina, diesel e combustível de aviação e compatibilidade com os atuais motores dos veículos de transporte rodoviário, marítimo e aéreo. Entretanto, um dos maiores desafios para a produção de *drop-in* a partir de biomassas vegetais é a presença de intermediários oxigenados, uma vez que, o oxigênio presente na estrutura química do biocombustível pode danificar peças e motores dos veículos. Atualmente, a desoxigenação ocorre via processos termoquímicos baseados no uso de hidrogenação (grande quantidade de H₂), altas temperaturas e metais pesados. Esses processos são agressivos ao meio ambiente, o que se faz necessário estudos de rotas biológicas mais brandas que cause menos dano ambiental. Com isso, a identificação e o completo entendimento de enzimas capazes de produzir alcenos/alcenos se tornam cada vez mais fundamentais, como foi recentemente enfatizado em uma publicação na *Science* – “*Enzymes make light work of hydrocarbon production* (Scrutton, 2017). Nos últimos anos, a descarboxilase/peroxigenase denominada OleT_{IE} pertencente à família 152 da superclasse P450 ganhou grande notoriedade das comunidades científica e industrial devido ao fato de apresentar uma propriedade única que é remover o oxigênio do ácido graxo de cadeia longa (C₁₂-C₂₀), produzindo como produto, 1-alceno. No entanto, ainda pouco se conhece sobre a mecanística funcional/molecular das peroxigenases, visto que poucas enzimas dessa família foram reportadas até o momento. Diante do exposto, esse projeto de pesquisa propõe descobrir e explorar novas peroxigenases P450 que são funcionalmente ativas na descarboxilação de ácidos graxos. Com o referido projeto, pretendemos entender a especificidade à diferentes cadeias de ácidos graxos de novas peroxigenases já isoladas em nosso laboratório. Para isso, utilizaremos uma combinação de métodos espectroscópicos e bioquímicos que já são extensivamente utilizados em nosso grupo de pesquisa. Pelo menos no nosso conhecimento, nosso grupo será um dos pioneiros na elucidação dessa nova família de P450 e com isso poderemos contribuir para aumentar o arsenal de descarboxilases além de gerar conhecimento inédito e extremamente relevante para a área de biotecnologia industrial.

Palavras chaves: enzimas, P450, descarboxilases, peroxigenases, biocombustíveis, biotecnologia.

1. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

1.1. Potencial aplicação biotecnológica das enzimas citocromos P450

Os citocromos P450 (P450s ou CYPs) são uma superfamília de enzimas mono-oxigenases que contém o grupamento heme e estão presentes em archaea, bactérias e eucariotos (Munro *et al.*, 2018). Essas enzimas participam do metabolismo oxidativo de esteroides, ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos, aminas biogênicas, feromônios e metabólitos de plantas, além de metabolizarem inúmeras drogas, químicos carcinógenos, mutagênicos e outros contaminantes ambientais (Nebert & Gonzalez, 1987). Alguns exemplos de reações catalisadas pelas P450: oxidação alifática, desalogenação oxidativa/reduziva, N-hidroxilação, N-oxidação, formação de sulfóxidos, N-S-O-desalquilação, oxidação alifática, hidroxilação aromática, hidroxilação, descarboxilação (Meunier *et al.*, 2004). Sendo assim, estão envolvidas em diversas aplicações das diferentes áreas biotecnológicas, como biorremediação, agricultura e desenvolvimento de fármacos (Liu *et al.*, 2014; Guengerich *et al.*, 2017). O ciclo catalítico canônico das P450 está mostrado na Figura 1. A maioria das P450s catalisa a cisão redutiva do dioxigênio ligado ao seu ferro heme, contando com a entrega de dois elétrons doados via parceiros redox (Denisov *et al.*, 2005). O primeiro elétron é entregue ao substrato ligado ao heme férrico, que por sua vez está coordenado com o grupo tiolado da cisteína protéica, levando a redução do ferro a forma ferrosa (Fe^{2+}) e permitindo que o dioxigênio (O_2) se ligue para a formação do complexo superóxido-férrico (Fe^{3+}). O segundo elétron reduz esse complexo para o estado peróxido-férrico e então duas sucessivas protonações ocorrem. Prótons são tipicamente retransmitidos de um par de aminoácidos ácidos conservados entre as P450s para formar, primeiramente, a espécie hidroperoxido-férrico (composto 0 no ciclo) e, em seguida, o heme radical altamente reativo, óxido-ferryll (Fe^{4+}) (composto I no ciclo), com a perda de uma molécula de água (Rittle & Green, 2010). O Composto I abstrai um hidrogênio do substrato para formar o hidróxido-ferryll (R^\bullet e Fe^{4+}) (composto II no ciclo) que se recombina com o substrato formando o produto hidroxilado (ROTA 1), que é sequencialmente liberado (ROH) e deixando o ferro heme no estado férrico (Fe^{3+}) no qual a água pode blindar novamente a enzima e restaurar o estado de repouso completando o ciclo catalítico (Groves, 2006).

Embora a maioria das P450 operam de acordo com o ciclo evidenciado na Figura 1, outras são conhecidas catalisar a oxidação do substrato por meio do mecanismo conhecido como “*peroxide shunt*”, no qual o H_2O_2 converte o substrato ligado diretamente ao composto 0: segue-se as setas pretas em detrimento das cinzas (Matthews *et al.*, 2017). Em muitas P450s, essa reação é ineficiente ocorrendo um dano oxidativo a proteína e ao seu grupamento heme. Entretanto, algumas P450s evoluíram no uso eficiente do mecanismo de “*peroxide shut*” para oxidar seus substratos (Groves, 2006; Rittle & Green, 2010). Esse é o caso das peroxigenases P450 da família 152 (CYP152). As CYP152 são um subgrupo das P450 que evoluíram em micróbios para catalisar o metabolismo oxidativo de ácidos graxos usando peróxido de hidrogênio como única fonte de oxigênio e agente oxidante ao invés de sistemas dependentes da redução de co-fatores e dioxigênio (O_2), tornando o processo menos complexo (Wang

et al., 2017; Munro *et al.*, 2018). Supõe-se que essas enzimas tenham evoluído em procariontes antigos em um ambiente desprovido de oxigênio, mas relativamente rico em peróxido de hidrogênio e outros compostos orgânicos peroxigenados (Matthews *et al.*, 2017). Como evidenciado na Figura 1, após o substrato remover a molécula de água distal e fazer o ferro heme férrico ser penta-coordenado, ao invés de ser reduzido diretamente, a enzima “pula” as etapas e é levada diretamente à formação do Composto 0, sendo reduzida somente pelo peróxido de hidrogênio, que também é a fonte de oxigênio da reação ao invés do dióxigênio (O₂) (Wang *et al.*, 2017; Munro *et al.*, 2018). Nesse ponto, os caminhos canônico e de “*peroxide shut*” convergem com um passo de protonação que resulta na desidratação de um intermediário transiente para formar o composto 1 (Matthews *et al.*, 2017). Adicionalmente, outro importante desvio que pode ocorrer no ciclo de catálise por uma peroxigenase é a descarboxilação (ROTA 2), uma reação do composto II com o substrato de forma diferente da hidroxilação (Matthews *et al.*, 2017). Essa reação é ainda muito pouco entendida: propõe-se que o composto II seja reduzido pelo substrato radical podendo formar um substrato diradical ou carbocátions que decompõem com a liberação do CO₂ para formar o produto final alceno (Munro *et al.*, 2018).

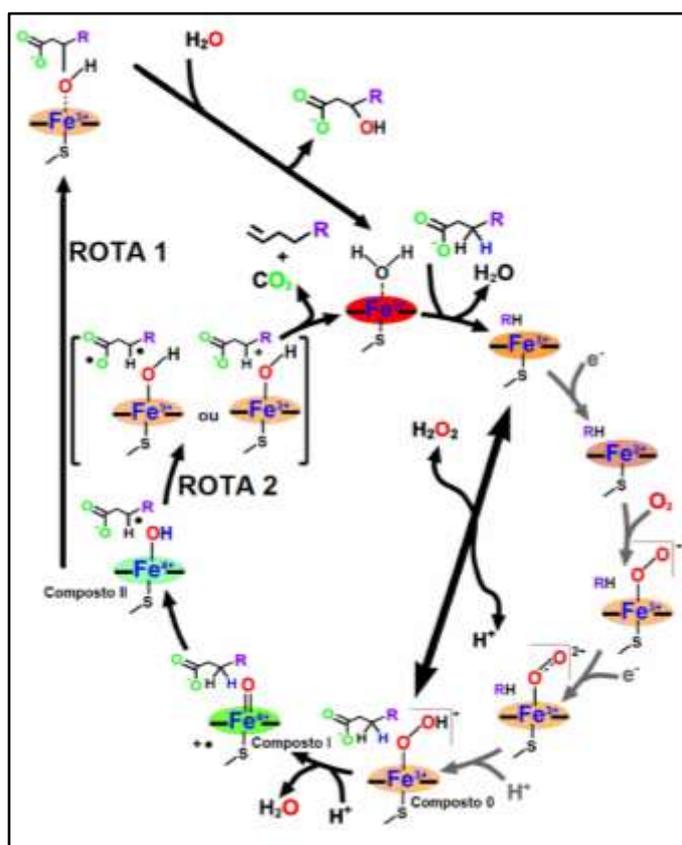


Figura 1 – O ciclo canônico da P450 é mostrado em uma representação circular, iniciando pela ligação do substrato (mostrado como RH e também como uma estrutura química) que converte a enzima da forma LS para a forma HS. Como mostrado pelas setas em cinza deste ponto em diante ocorrem dois passos de redução e um de protonação que seguem o caminho canônico requerendo um ou mais parceiros redox. A seta preta atravessando o ciclo ilustra o caminho de “*peroxide shunt*” pelo qual o estado férrico com o substrato ligado a enzima pode ser convertido diretamente a forma transiente de hidroperoxido de ferro (composto 0) usando H₂O₂. Nesse ponto, os caminhos canônicos e de “*peroxide shunt*” convergem com um passo de protonação que resulta na desidratação de um intermediário transiente para formar o composto 1. Então o composto 1 desprotona o substrato, produzido um radical e o ferro ocupa o intermediário hidróxido-ferryl (composto II). Nesse estágio, os caminhos catalíticos para a hidroxilação ou descarboxilação do substrato divergem. O substrato hidroxilado é formado pelo mecanismo de religação do substrato (ROTA 1). Estudos recentes indicam que a descarboxilação (ROTA 2) para formar o alceno terminal provavelmente envolve a redução do composto II pelo substrato radical podendo formar um novo substrato diradical ou carbicátions que decompõem com a liberação do CO₂. Fonte: Adaptado de Matthews *et al.*, 2017.

Com isso, de forma simplificada, as reações de descarboxilação e de hidroxilação passíveis de catálise por uma CYP152 estão ilustradas na Figura 2 (Mclean *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017; Matthews, 2016).

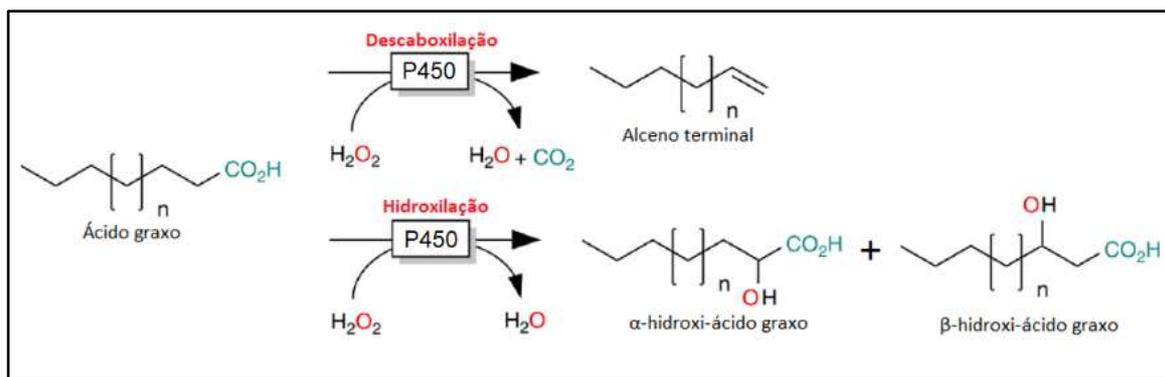


Figura 2 – Reações de descarboxilação e de hidroxilação catalisadas pelas peroxigenases P450 da família 152
 Fonte: Adaptada de Fang *et al.*, 2017;

Até meados de 2011, as duas principais peroxigenases representantes da família CYP152 eram as: P450_{SP α} (CYP152A1) isolada de *Sphingomonas paucimobilis* (Matsunaga *et al.*, 1996; Matsunaga *et al.*, 1997) e a P450_{BS β} (CYP152B1) oriunda de *Bacillus subtilis* (Matsunaga *et al.*, 1999), com identidade na sequência de aminoácido de 44% entre si. Tipicamente, a P450_{SP α} catalisa a reação específica de α -hidroxilação de ácidos graxos, enquanto que a P450_{BS β} apresenta catálise tanto de α -hidroxilação quanto de β -hidroxilação de ácidos graxos, tendo uma proporção de 40:60 (α : β). Em 2011, houve a descoberta da peroxigenase/descarboxilase OleT_{JE} (CYP152L1) isolada do microrganismo *Jeotgalicoccus* sp. 8456 por meio de engenharia reversa, capaz de predominantemente catalisar a descarboxilação de ácidos graxos e produzir alcenos (Rude *et al.*, 2011). Em 2014 foi publicada (Belcher *et al.*, 2014) a primeira estrutura tridimensional da OleT_{JE} (41% de identidade na sequência primária com as outras peroxigenases P450_{BS β} e P450_{SP α}) e a partir daí pesquisadores de grupos de pesquisa internacionais estão se esforçando para entender o mecanismo dessa catálise além de encontrar outras peroxigenases que possuem preferencialmente atividade de descarboxilação devido à importância industrial do produto gerado (Yan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Herman & Zhang 2016; Fang *et al.*, 2017; Matthews *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017; Albertolle *et al.*, 2018; Girvan *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019). Para constar, descarboxilar ácidos graxos para a produção de alcenos pode contribuir para solucionar um dos maiores entraves da produção de biocombustíveis *drop-in*, já que há a remoção do oxigênio da cadeia.

2. OBJETIVO GERAL

A proposta desse projeto é entender a especificidade de novas peroxigenases P450 da família 152, à diferentes cadeias de ácidos graxos. Sendo assim, os objetivos específicos contemplam:

- 3.1 Produzir das enzimas em plataforma bacteriana;
- 3.2 Purificação por cromatografia líquida para obtenção de enzimas solúveis com alta pureza;
- 3.3 Caracterização UV/VIS das heme-proteínas purificadas;
- 3.4 Determinação das constantes de dissociação (K_d) para diferentes substratos ácidos graxos (C10-C20) por titulação monitorando UV/VIS.

3. PLANO DE TRABALHO

3.1. Cronograma de execução do projeto

Atividades	Objetivo Específico	Trimestre			
		Primeiro	Segundo	Terceiro	Quarto
Produção enzimática em diferentes cepas de bactéria, temperatura, tempo e concentração de indutor	1				
Ensaio cromatográfico para a purificação de enzimas em diferentes colunas de afinidade, troca iônica e exclusão molecular	2				
Caracterização UV/VIS	3				
Titulação dos substratos ácidos graxos para determinação da K_d	4				
Escrita do relatório					

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para a execução desse projeto de pesquisa, serão realizados experimentos que envolvem ferramentas de biologia molecular, bioquímica, biofísica molecular e estrutural (Zanphorlin *et al.*, 2010; Zanphorlin *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2014; Zanphorlin *et al.*, 2014; Zanphorlin *et al.*, 2016a; Zanphorlin *et al.*, 2016b; Santos & Zanphorlin, 2016; Ramos *et al.*, 2016; Adão e Zanphorlin *et al.*, 2019; Zanphorlin *et al.*, 2019).

4.1. Testes de expressão heteróloga das enzimas em linhagens de *E. coli* BL21

Os genes sintéticos das peroxigenases P450 serão adquiridos comercialmente da empresa GenScript. As enzimas serão produzidas individualmente, utilizando o vetor pET28a seguindo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001), metodologia bem estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa. Os genes serão transformados em células de *E. coli* competentes BL21, o crescimento individual dos clones será feito em placas com meio líquido LB seletivo com 50 µg/mL de antibiótico canamicina. Assim, colônias resultantes serão ativadas

em 10mL de LB com o antibiótico seletivo, por 12 horas a 37 C e posteriormente, cultivados em 500 mL de meio líquido seletivo LB. Nessa etapa o crescimento bacteriano será acompanhado pela medida da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro (D.O.600nm) até 0,8 e então será induzida a expressão de proteína heteróloga com 0,5 mM de IPTG. Afim, de determina os níveis de expressão serão coletadas amostras a cada hora para análise de “time course” (entre 4-5 horas de expressão), para que seja avaliado níveis de expressão e solubilidade mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Ao final das 5 horas de expressão, as culturas serão centrifugadas individualmente e o sobrenadante será descartado. As células sedimentadas serão ressuspensas em 20 mL de tampão de lise (50 mM de fosfato de sódio pH 7,4; PMSF 1 mM; NaCl 0,5 M e lisozima 0,3 mg/mL) e incubado em temperatura ambiente por 30 minutos após isso, será realizada a lise celular por 6 ciclos de sonicação (Sonics®) com 50 % de amplitude por 10 segundos, intercalados com 1 minuto de intervalo. O lisado será então centrifugado (24.000 x g por 25 minutos) e o sobrenadante contendo as proteínas será submetido a análise eletroforética (SDS-PAGE) e testes de atividade contra substratos comerciais.

4.2. Purificação das enzimas recombinantes

O sistema de expressão utilizando os vetores pET28a possibilita um alto nível de expressão intra-celular do gene clonado, devido ao forte promotor do bacteriófago T7. As construções em pET28a, quando utilizadas em linhagens de BL21, possibilitam a expressão de enzimas recombinantes fusionadas a 6 histidinas na porção N terminal da proteína recombinante, facilitando as etapas subsequentes de purificação por afinidade utilizando resinas imobilizadas com níquel. Assim, as proteínas serão purificadas individualmente por cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sefarose (IMAC – Immobilized Metal Affinity Chromatography em ÄKTA FPLC, GE Healthcare®), a 0,3 MPa de pressão e 1,0 mL/min de fluxo. Um gradiente de imidazol (0-500 mM) contribuirá para a eluição. A pureza das amostras será verificada por SDS-PAGE, com isso, as amostras consideradas puras serão permeadas e concentradas por ultrafiltração (Amicon® Ultra-4 CentrifugalFilter, Millipore). O concentrado será submetido a cromatografia de exclusão molecular (ÄKTA FPLC, GE Healthcare®) usando coluna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare®). As amostras resultantes serão novamente submetidas a eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE para confirmação da pureza.

4.3. Caracterização espectroscópica heme-proteínas purificadas

As proteínas pertencentes ao clã de P450 tem propriedades peculiares e absorvem na faixa de 400 – 450 (pico de Soret), dependendo do estado conformacional em solução (Munro *et al.*, 2018). Sendo assim, métodos de espectrofotometria são de grande valia para investigar as enzimas desse projeto. As análises das propriedades espectroscópicas das peroxigenases purificadas serão realizadas em espectrofotômetros Molecular Devices, pertencentes ao Laboratório de Análises de Macromoléculas do CTBE – LAM, de acordo com metodologias descritas na literatura (Xu *et al.*, 2017, Matthews *et al.*, 2017). Os espectros serão recordados com aproximadamente 5 µM de enzima em diferentes condições de pH e força iônica, em uma varredura de 300-800 nm à temperatura ambiente. A forma ferrosa FeII-CO será produzida em condição anaeróbica usando o tampão de purificação degaseificado. Para obtenção da enzima na forma reduzida serão adicionados poucos grãos de ditionato de sódio sólido na enzima férrica. O complexo FeII-CO será então formado borbulhando vagarosamente gas CO na enzima reduzida até o espectro não ser mais deslocado (Xu *et al.*, 2017, Matthews *et al.*, 2017).

4.4. Titulação dos ligantes ácidos graxos e monitoração por UV/VIS

A ligação dos ácidos graxos nas peroxigenases será avaliada a 25oC em tampão de purificação. Os substratos serão solubilizados em 100% etanol e adições de 0.5 uL do substrato estoque () serão feitas até o espectro não ser mais deslocado. Os espectros serão adquiridos entre 300-800 nm utilizando espectrofotômetros Molecular Devices. Aos espectros obtidos serão subtraídos o espectro do ligante livre em cada concentração do espectro referente ao ligante ligado a enzima. Será feito um gráfico de delta Abs contra a concentração do substrato e os dados serão ajustados utilizando tanto uma função hipérbole como de Hill para determinar as constantes de dissociação (*Kd*) para a ligação do substrato ácido graxo (Matthews *et al.*, 2017).

5. REFERENCIAS

- Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 2, p. 213-21, 2010.
- Adão, R.; Zanphorlin, L.M.; Lima, T.B.; Sriranganadane, D.; Dahlström, K.M.; Pinheiro, G.M.S.; Gozzo, F.C.; Barbosa, L.R.S. Ramos, C.H.I. Revealing the interaction mode of the highly flexible Sorghum bicolor Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop): A conserved carboxylate clamp confers high affinity binding to Hsp90. **J Proteomics**, 2018.
- Agencia Nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis (ANP). Disponível em www.anp.gov.br.
- Albertolle, M.E. & Peter Guengerich. The relationships between cytochromes P450 and H₂O₂: Production, reaction, and inhibition. **J Inorg Biochem**. v.186, p. 228-234, 2018.
- Belcher, J., McLean, K.J., Matthews, S., Woodward, L.S., Fisher, K., Rigby, S.E., Nelson, D.R., Potts, D., Baynham, M.T., Parker, D.A., Leys, D., Munro, A.W. Structure and biochemical properties of the alkene producing cytochrome P450 OleT_{JE} (CYP152L1) from the Jeotgaliococcus sp. 8456 bacterium. **J Biol Chem**. v. 289(10), p. 6535-50, 2014.
- Beller, H. R., Goh, E. B., & Keasling, J. D. Genes involved in long-chain alkene biosynthesis in micrococcus luteus. **Applied and Environmental Microbiology**, 76(4), 1212–1223, 2010.
- Campos, B.M.; Liberato, M. V.; Alvarez, T.M.; Zanphorlin, L.M.; Ematsu, G.C.; Barud, H.; Polikarpov, I.; Ruller, R.; Gilbert, H. J.; Zeri, A.C. De Mattos; Squina, F.M. A novel carbohydrate-binding module from sugar cane soil metagenome featuring unique structural and carbohydrate affinity properties. **The Journal of Biological Chemistry** (Print), 2016.
- Chen, L.; Li, H.; Fu, J.; Miao, C.; Lv, P. Yuan Z., Catalytic hydroprocessing of fatty acid methyl esters to renewable alkane fuels over Ni/HZSM-5 catalyst. **Catal. Today**, v. 259, p.266–276, 2016.
- Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, 2004.
- Empresa de pesquisas energéticas. Disponível em www.epe.gov.br
- Fang, B.; Xu, H.; Liu, Y.; Qi, F.; Zhang, W.; Chen, H.; Wang, C.; Wang, Y.; Yang, W.; Li, S. Mutagenesis and redox partners analysis of the P450 fatty acid decarboxylase OleT_{JE}. **Sci Rep**. v.7:44258. 2017.
- Feigin, L. A. S., D. I. Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering. 1987. 335 ISBN 0-306-42629-3.
- Girvan, H.M.; Poddar, H.; McLean, K.J.; Nelson, D.R.; Hollywood, K.A.; Levy, C.W.; Leys, D.; Munro, A.W. Structural and catalytic properties of the peroxygenase P450 enzyme CYP152K6 from *Bacillus methanolicus*. **J Inorg Biochem**. v. 188, p.18-28, 2018.
- Glatzer, O. K. Small angle x-ray scattering. ISBN 0122862805. 1982.
- Gosselink, R.W.; Hollak, S.A.W.; Chang, S.W.; Haveren, J.; de Jong, K. P.; Bitter, J.H. Reaction pathways for the deoxygenation of vegetable oils and related model compounds. **Chem Sus Chem**, p.1–20, 2013.
- Guimarães, B. G.; Sanfelici, L.; Neuenschwander, R. T.; Rodrigues, F.; Grizolli, W. C.; Raulik, M. A.; Piton, J. R.; Meyer, B. C.; Nascimento, A. S.; Polikarpov, I. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **J Synchrotron Radiat**, v. 16, n. Pt 1, p. 69-75, 2009.
- Herman, N.A.; Zhang, W. Enzymes for fatty acid-based hydrocarbon biosynthesis. **Curr Opin Chem Biol**. v.35:22-28. Review. 2016.
- Iata, 2009. Disponível em <https://www.iata.org/whatwedo/environment/Documents/aviation-climatechange-pathway-to2020.pdf>.
- Karatzos, S.; van Dyk, J.S.; McMillan, J.D.; Saddler, J. Drop-in biofuel production via conventional (lipid/fatty acid) and advanced (biomass) routes. Part I. **Biofuels. Bioprod Biorefin**, v.11, p.344–62, 2017.
- Kim, S.K.; Han, J.Y.; Lee, H.-s.; Yum, T.; Kim, Y.; Kim, J. Production of renewable diesel via catalytic deoxygenation of natural triglycerides: comprehensive understanding of reaction intermediates and hydrocarbons, **Appl. Energy**, v.116 p.199–205, 2014.
- Khan S.; Lup, A.N.K.; Qureshia, K.M.Q.; Abnisad, F.; Daud, W.M.A., Patah, M. A review on deoxygenation of triglycerides for jet fuel range hydrocarbons. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, In Press, 2019.
- Knoot, C.J.; Pakrasi, H.B. Diverse hydrocarbon biosynthetic enzymes can substitute for olefin synthase in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. **Sci Rep**. v.9(1), p.1360, 2019.
- Lee, J.W.; Niraula, N.P.; Trinh, C.T. Harnessing a P450 fatty acid decarboxylase from *Macrococcus caseolyticus* for microbial biosynthesis of odd chain terminal alkenes. **Metab Eng Commun**. 24:7;2018.
- Lin, F.M.; Neil, E.; Marsh, G.; Xia, X.; Lin, N. Recent progress in hydrocarbon biofuel synthesis: Pathways and enzymes. **Chinese Chemical Letters**. v. 26, p. 431-434, 2015.
- Liu, Y., Wang, C., Yan, J., Zhang, W., Guan, W., Lu, X., Li, S. Hydrogen peroxide-independent production of α -alkenes by OleT_{JE} P450 fatty acid decarboxylase. **Biotechnology for biofuels**, v.7(1), p. 28, 2014.
- Lup, A.N.K.; Abnisa, F.; Daud, W.M.A.W.; Aroua, M.K. A review on reaction mechanisms of metal-catalyzed deoxygenation process in bio-oil model compounds. **Appl. Catal. A General**. v. 541, p.87–106, 2017
- Matsunaga, I., Ueda, a, Fujiwara, N., Sumimoto, T., & Ichihara, K. Characterization of the ybdT gene product of *Bacillus subtilis*: novel fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450. **Lipids**, 34(8), 841–846, 1999.
- Matthews S., Belcher J.D.; Tee, K.L.; Hazel, M.; Girvan, Kirsty, J.; McLean, Rigby, S.E.J.; Levy, C.W.; Leys, D.; Parker, D.A.; Blankley, R.T.; Munro, A.W. Catalytic Determinants of Alkene Production by the Cytochrome P450 Peroxygenase OleT_{JE}. **J Biol Chem**. v.292(12): 5128–5143. 2017.
- McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. **J Appl Crystallogr**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, 2007.
- Mendez-Perez, D., Begemann, M. B., & Pfleger, B. F. Modular synthase-encoding gene involved in α -olefin biosynthesis in *Synechococcus* sp. strain pC 7002. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77(12), p. 4264–4267, 2011.

- Munro, A. W., McLean, K. J., Grant, J. L., & Makris, T. M. Structure and function of the cytochrome P450 peroxygenase enzymes. **Biochemical Society Transactions**, v. 46(1), p. 183–196, 2018.
- Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 53, p. 240–55, 1997.
- Naturel Fuel, 2017. Disponível em <http://naturalfuel.com.au/difference-biodiesel-green-diesel/>
- Otwinowski, Z.; Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: CHARLES W. CARTER, J. (Ed.). **Methods in Enzymology: Academic Press**, v. 276, p.307–326. ISBN 0076-6879, 1997.
- Pattanaik, B.P.; Misra, R.D. Effect of reaction pathway and operating parameters on the deoxygenation of vegetable oils to produce diesel range hydrocarbon fuels: a review. **Renew. Sustain. Energy Rev.** v. 73, p.545–557, 2017
- Phulara, S.C.; Chaturvedi, P.; Gupta, P. Isoprenoid-Based Biofuels: Homologous Expression and Heterologous Expression in Prokaryotes. **Appl Environ Microbiol.** v. 82(19), p.5730–40, 2016.
- Rahman, F. A., Aziz, M. M. A., Saidur, R., Bakar, W. A. W. A., Hainin, M. R., Putrajaya, R., & Hassan, N. A. Pollution to solution: Capture and sequestration of carbon dioxide (CO₂) and its utilization as a renewable energy source for a sustainable future. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 112–126, 2017.
- Rude, M. A.; Baron, T. S.; Brubaker, S.; Alibhai, M.; Del Cardayre, S. B.; Schirmer, A. Terminal olefin (1-alkene) biosynthesis by a novel p450 fatty acid decarboxylase from *Jeotgalicoccus* species. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 77, p. 1718–1727, 2011.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Terceira Edição: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- Santos, C. R.; Hoffmam, Z. B.; Martins, V. P. D. M.; Zanphorlin, L. M.; Assis, L. H. D. P.; Honorato, R. V.; OLIVEIRA, P. S. L. D.; Ruller, R.; Murakami, M. T. Molecular mechanisms associated with xylan degradation by *Xanthomonas* plant pathogens. The **Journal of Biological Chemistry (Print)**, v. 289, p. 32186–200, 2014.
- Santos, C.A.; Zanphorlin, L. M.; Crucello, A.; Tonoli, C.C. C.; Ruller, R.; Horta, M. A. C.; Murakami, M.T.; De Souza, A. P. Crystal structure and biochemical characterization of the recombinant ThBgl, a GH1 β -glucosidase overexpressed in *Trichoderma harzianum* under biomass degradation conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 1–11, 2016.
- Scaldaferri, C.A.; Pasa, V.M.D. Production of jet fuel and green diesel range biohydrocarbons by hydroprocessing of soybean oil over niobium phosphate catalyst. **Fuel**, v. 245, p. 458–466, 2019.
- Schirmer, A., Rude, M. A., Li, X., Popova, E., & D, S. B. Microbial Biosynthesis of Alkanes, **Science**, v. 327(5971), 1385–1389, 2010.
- Scrutton, N.S. Enzymes make light work of hydrocarbon production. **Science**, v. 357, p. 872–873, 2017.
- Sheldrick, G. M. Macromolecular phasing with SHELXE. **Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials**, v. 217, n. 12–2002, p. 644–650, 2002.
- Silva, L. N., Fortes, I. C. P., De Sousa, F. P., & Pasa, V. M. D. Biokerosene and green diesel from macauba oils via catalytic deoxygenation over Pd/C. **Fuel**, 164, 329–338, 2016.
- Svergun, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophys J**, v. 76, n. 6, p. 2879–86, 1999.
- Vagin, A.; Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 22–5, 2010.
- Verma, D.; Rana, B.S.; Kumar, R.; Sibi, M.G.; Sinha, A.K. Diesel and aviation kerosene with desired aromatics from hydroprocessing of jatropha oil over hydrogenation catalysts supported on hierarchical mesoporous SAPO-11. **Appl. Catal. A: General**. v. 490, p.108–116, 2015.
- Wang, Y.; Lan, D.; Durrani, R.; Hollmann, F. Peroxygenases *en route* to becoming dream catalysts. What are the opportunities and challenges? **Current Opinion in Chemical Biology**, v.37, 1–9, 2017.
- Wang JB1, Lonsdale R1, Reetz MT1. Exploring substrate scope and stereoselectivity of P450 peroxygenase OleT_{JE} in olefin-forming oxidative decarboxylation. **Chem Commun (Camb)**. v. 52(52), p.8131–3, 2016.
- Wise, C.E.; Grant, J.L.; Amaya, J.A.; Ratigan, S.C.; Hsieh, C.H1.; Manley, O.M.; Makris, T.M. Divergent mechanisms of iron-containing enzymes for hydrocarbon biosynthesis. **J Biol Inorg Chem**. v. 22(2–3), p.221–235, 2017.
- Xu, H.; Ning, L.; Yang, W.; Fang, B.; Wang, C.; Wang, Y.; Xu, J.; Collin, S.; Laeuffer, F.; Fourage, L.; Li, S. In vitro oxidative decarboxylation of free fatty acids to terminal alkenes by two new P450 peroxygenases. **Biotechnol Biofuels**. 10:208. 2017.
- Yan, J.; Liu, Y.; Wang, C. Han, B.; Li, S. Assembly of lipase and P450 fatty acid decarboxylase to constitute a novel biosynthetic pathway for production of 1-alkenes from renewable triacylglycerols and oils. **Biotechnol Biofuels**. v.8:34. 2015.
- Yu, D.2.; Wang, J.B.; Reetz, M.T. Exploiting Designed Oxidase-Peroxygenase Mutual Benefit System for Asymmetric Cascade Reactions. **J Am Chem Soc**. v.141(14), p. 5655–5658, 2019.
- Zargar, A.; Bailey, C.B.; Haushalter, R.W.; Eiben, C.B.2.; Katz, L.; Keasling, J.D. Leveraging microbial biosynthetic pathways for the generation of 'drop-in' biofuels. **Curr Opin Biotechnol**. v. 45, p.156–163, 2017.
- Zanphorlin, L.M.; de Moraes, M.A.B.; Diogo, J.A.; Domingues, M.N.; de Souza, F.H.M.; Ruller, R. Murakami, M.T. Structure-guided design combined with evolutionary diversity led to the discovery of the xylose-releasing exo-xylanase activity in the glycoside hydrolase family 43. **Biotechnol Bioeng**. v.116(4), p.734–744, 2019.
- Zanphorlin, L.M.; De Giuseppe, P. O.; Honorato, R. V.; Tonoli, C.C.C.; Fattori, J.; Crespim, E.; De Oliveira, Lopes, P.S.; Ruller, R.; Murakami, M.T. Oligomerization as a strategy for cold adaptation: Structure and dynamics of the GH1 β -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. **Scientific Reports**, v. 6, p. 23776, 2016.
- Zanphorlin, L.M.; Lima, T.B.; Wong, M.J.; Balbuena, T.S.; Minetti, C.A.; Remeta, D.P.; Young, J.C.; Barbosa, L.R.; Gozzo, F.C.; Ramos, C.H. Heat Shock Protein 90 kDa (Hsp90) Has a Second Functional Interaction Site with the Mitochondrial Import Receptor Tom70. **J Biol Chem**. v.291 (36), p.18620–31, 2016.

- Zanphorlin, L.M.; Facchini, F.D.; Vasconcelos, F.; Bonugli-Santos, R.C., Rodrigues, A.; Sette, L.D.; Gomes, E., Bonilla-Rodriguez, G.O. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* **J Microbiol.** v.48 (3), p.331-6, 2010.
- Zanphorlin, L.M.; Alves, F.R.; Ramos, C.H. The effect of celastrol, a triterpene with antitumorigenic activity, on conformational and functional aspects of the human 90kDa heat shock protein Hsp90 α , a chaperone implicated in the stabilization of the tumor phenotype. **Biochim Biophys Acta.**, v.1840 (10), p.3145-52, 2014.
- Zanphorlin, L.M.; Cabral, H.; Arantes, E.; Assis, D.; Juliano, L.; Juliano, M.A.; Da-Silva, R.; Gomes, E.; Bonilla-Rodriguez, G.O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* **Process Biochemistry** (1991), v. 46, p. 2137-2143, 2011.