

Proposta de Projeto PIBIC

“Entendendo os mecanismos moleculares de peroxigenases P450 não convencionais para a produção de compostos *drop-in*”

Orientadora: Leticia Zanphorlin (LNBR/CNPEM)

RESUMO

Os biocombustíveis *drop-in* são constituídos de biohidrocarbonetos (ou hidrocarbonetos renováveis), formados por cadeias médias e longas de alcenos/alcanos, 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 alkanos/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_{JE} 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 as 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. Nossa grupo é um dos pioneiros na elucidação dessa nova família de P450 e poderemos contribuir para gerar conhecimento inédito e relevante para a área de biotecnologia industrial.

1. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

1.1. *Potencial aplicação biotecnológica das enzimas citocromos P450*

Os citocromos P450 (P450s ou CYPs) são uma superfamília de enzimas monooxigenases 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 carcinogênicos, mutagênicos e outros contaminantes ambientais (Nebert & Gonzalez, 1987). Alguns exemplos de reações catalisadas pelas P450: oxidação alifática, desalogenação oxidativa/redutiva, 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). 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). Por outro lado, outras são conhecidas catalisar a oxidação do substrato por meio do mecanismo conhecido como “*peroxide shunt*”, no qual o H₂O₂ converte o substrato ligado diretamente. 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 (O₂), 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).

Até meados de 2011, as duas principais peroxigenases representantes da família CYP152 eram as: P450_{SPα} (CYP152A1) isolada de *Sphingomonas paucimobilis* (Matsunaga *et al.*, 1996; Matsunaga *et al.*, 1997) e a P450_{BSβ} (CYP152B1) oriunda de *Bacillus subtilis* (Matsunaga *et al.*, 1999), com identidade na sequência de aminoácido de 44% entre si. Tipicamente, a P450_{SPα} catalisa a reação específica de α-hidroxilação de ácidos graxos,

enquanto que a P450_{BSP} 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 sequencia primária com as outras peroxigenases P450_{BSP} e P450_{SPa}) 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 os mecanismos moleculares da atividade de descarboxilação de novas peroxigenases P450 da família 152, em diferentes cadeias de ácidos graxos. Sendo assim, os objetivos específicos contemplam:

- 2.1 Produção das enzimas em plataforma bacteriana
- 2.2 Purificação por cromatografia líquida para obtenção de enzimas solúveis com alta pureza;
- 2.3 Caracterização espectroscópica das heme-proteínas purificadas;
- 2.4 Ensaios de atividade enzimática para diferentes substratos ácidos graxos (C12-C20)

3 PLANO DE TRABALHO

Atividades	Objetivo Específico	Trimestre			
		Primeiro	Segundo	Terceiro	Quarto
Produção enzimática em diferentes cepas de bactéria, temperatura, tempo e concentração de indutor	1				
Ensaios cromatográficos para a purificação de enzimas em diferentes colunas de afinidade, troca iônica e exclusão molecular	2				
Caracterização espectroscópica	3				
Ensaios enzimáticos	4				

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).

5 REFERENCIAS

- 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 Jeotgalicoccus 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Bioref**, 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.
- Mendez-Perez, D., Begemann, M. B., & Pfleger, B. F. Modular synthase-encoding gene involved in α -olefin biosynthesis in *Synechococcus* sp. strain pcC 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.
- Naturel Fuel, 2017. Disponível em <http://naturalfuel.com.au/difference-biodiesel-green-diesel/>
- 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.
- Santos, C. R.; Hoffmann, 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.
- 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.; Tepliyakov, 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 *Mycelioiphthora 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 Hsp90α, 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 *Mycelioiphthora sp.* **Process Biochemistry** (1991), v. 46, p. 2137-2143, 2011.