

Investigação da especificidade e versatilidade catalítica da enzima XAC3477 envolvida na detoxificação de aldeídos aromáticos em *Xanthomonas citri*

Damaris Batistão Martim – LNBR

Introdução

A degradação de compostos aromáticos derivados da lignina, uma fonte abundante e renovável de carbono, é um processo de crescente interesse biotecnológico, uma vez que microrganismos capazes de metabolizar esses compostos podem ser explorados na conversão de resíduos lignocelulósicos em moléculas de valor agregado [1]. No entanto, durante esse processo, a formação de intermediários reativos, como os aldeídos aromáticos, representa um desafio metabólico, pois sua elevada reatividade pode comprometer processos celulares, exigindo mecanismos eficientes de detoxificação. Nesse contexto, sua conversão em moléculas menos reativas, como álcoois ou ácidos, constitui uma estratégia importante para a adaptação microbiana a ambientes ricos em compostos fenólicos [2].

Estudos recentes demonstraram que a bactéria *Xanthomonas citri* (*X. citri*) é capaz de metabolizar compostos aromáticos relacionados a lignina por meio de vias completas para o catabolismo de monolignóis [3]. Nesse contexto, foi demonstrado que aldeídos aromáticos podem ser convertidos em seus respectivos álcoois por enzimas redutases dependentes de NADPH, entre as quais se destaca a XAC3477, pertencente à família das Aldo/Keto redutases (AKR), com atividade sobre diferentes substratos aromáticos e induzida na presença de alguns desses compostos [3].

No entanto, aspectos relacionados à especificidade catalítica e ao comportamento bioquímico dessa proteína ainda permanecem pouco explorados. Considerando sua baixa identidade com enzimas previamente descritas e seu potencial papel em processos de detoxificação, o estudo da XAC3477 pode ampliar a compreensão dos mecanismos enzimáticos envolvidos na transformação de aldeídos aromáticos, além de contribuir para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas baseadas na conversão de compostos aromáticos em químicos de valor agregado.

Estado da arte

Enzimas pertencentes a família AKR constituem uma ampla superfamília de oxidoreduções envolvidas em diversos processos biológicos e amplamente estudadas em diferentes contextos, incluindo metabolismo de xenobióticos, processos fisiológicos e aplicações biomédicas [4]. No entanto, sua participação na transformação e detoxificação de aldeídos aromáticos em sistemas bacterianos ainda é pouco compreendida.

Estudos recentes demonstraram que a enzima XAC3477 apresenta atividade NADPH-dependente na redução de aldeídos aromáticos a seus respectivos álcoois [3]. Além da formação de álcoois aromáticos previamente descrita, análises cromatográficas preliminares indicaram a formação de um produto adicional catalisado por essa enzima, cuja identidade e relevância catalítica ainda não foram determinadas. Esses resultados sugerem que a XAC3477 pode apresentar maior versatilidade funcional do que inicialmente proposto, levantando questões sobre sua especificidade por substratos e possíveis rotas catalíticas alternativas.

Diante disso, torna-se relevante investigar a especificidade e o comportamento catalítico da XAC3477, visando compreender sua atuação na transformação de aldeídos aromáticos.

Objetivo geral

Caracterizar bioquimicamente a enzima XAC3477 de *X. citri*, investigando sua especificidade e versatilidade catalítica.

Objetivos específicos

1. Expressar e purificar a proteína recombinante
2. Realizar a triagem de possíveis substratos
3. Determinar condições ótimas de atividade
4. Determinar parâmetros cinéticos para substratos selecionados.
5. Identificar o coproduto formado na reação enzimática por LC-MS
6. Investigar a influência das condições reacionais na formação de produtos.

Metodologia

Expressão e Purificação

A proteína recombinante XAC3477 será expressa em *E. coli* BL21(DE3)- Δ SlyD-pRARE2 a partir do gene previamente clonado no vetor pET28a(+), com cultivo em LB contendo canamicina (50 μ g/mL) a 37 °C até DO₆₀₀ \approx 0,8, seguido de indução com 0,5 mM IPTG e incubação a 20 °C por 16 h. As células serão então coletadas por centrifugação (6.000 \times g, 4 °C, 30 min), ressuspensas em tampão de lise (20 mM HEPES pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF e 30 μ g/mL DNase) e lisadas por sonicação (pulsos de 15 s com intervalos de 30 s, por 15 min, amplitude de 30%). O extrato celular será clarificado por centrifugação (16.000 \times g, 4 °C, 30 min), e a fração solúvel será submetida à purificação por cromatografia de afinidade utilizando sistema FPLC acoplado a coluna HisTrap (Cytiva). A eluição será realizada em tampão contendo 20 mM Bicina pH 7,8, 300 mM NaCl e gradiente de imidazol (10–500 mM). As frações contendo a proteína de interesse serão concentradas, dialisadas em 20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl por 16 h e submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (Cytiva), para obtenção de amostra homogênea. A concentração proteica será determinada por absorbância a 280 nm, utilizando coeficiente de extinção calculado a partir da sequência de aminoácidos (ProtParam).

Triagem de substratos utilizando HPLC

A triagem de substratos da XAC3477 será realizada utilizando compostos previamente identificados em ensaios iniciais [3], visando reavaliar sua atividade por um método analítico mais preciso. As reações serão realizadas em 1 mL de tampão HEPES 36 mM, pH 7,5, contendo 0,25 mM de substrato e 2 mM de NADPH, a 30 °C por 10 min. As reações serão interrompidas por aquecimento (100 °C por 2 min), seguidas de centrifugação. O sobrenadante será utilizado para quantificação do consumo de NADPH por HPLC, com controles sem enzima. Todos os ensaios serão realizados em triplicata.

Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica da XAC3477 será realizada por monitoramento da variação de absorbância a 340 nm, associada ao consumo de NADPH após 10 min de reação, em um leitor de microplacas Infinite® 200 PRO (Tecan). Serão determinadas as condições ótimas de pH e temperatura, bem como a estabilidade térmica da enzima por meio da avaliação da atividade residual após incubação em diferentes temperaturas. Adicionalmente, será avaliado o efeito de aditivos (como DTT, EDTA, íons e glicerol) sobre a atividade enzimática. Todos os ensaios serão realizados em triplicata.

Cinética enzimática

Para a determinação dos parâmetros cinéticos, serão selecionados os substratos de maior atividade previamente identificados. As reações serão conduzidas em diferentes concentrações de substrato, e consumo de NADPH será quantificado por HPLC. Os parâmetros cinéticos (K_M e V_{max}) serão determinados a partir do ajuste das velocidades iniciais em função da concentração de substrato.

Avaliação do perfil de produtos e identificação de coprodutos por HPLC e LC-MS

Com base nos ensaios espectrofotométricos, serão selecionados substratos e condições representativas (maior, intermediária e menor atividade) para análise cromatográfica. A formação de produtos será inicialmente monitorada por HPLC, permitindo a detecção e quantificação do produto principal e de possíveis coprodutos. Amostras selecionadas serão posteriormente analisadas por LC-MS, visando a identificação do coproduto formado. Essa abordagem permitirá correlacionar as condições reacionais com o perfil de produtos gerados pela enzima.

Tabela 1. Cronograma de Execução do Projeto

Atividades	1° Trim.	2° Trim.	3° Trim.	4° Trim.
Expressão e purificação de XAC3477	x			
Padronização dos ensaios de atividade	x	x		
Triagem de potenciais substratos	x			
Caracterização Bioquímica (pH, temperatura...)		x	x	
Análise do perfil de produtos por HPLC e LC-MS			x	x
Determinação de parâmetros cinéticos por HPLC			x	x
Preparação e entrega do relatório parcial		x		
Análise de dados e redação do relatório final				x
Preparação e submissão de resumo (CEC)				x

Referências

- [1] Lee, Siseon, et al. "Bacterial valorization of lignin: strains, enzymes, conversion pathways, biosensors, and perspectives." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 7 (2019): 209.
- [2] Klinke, Helene Bendstrup, A. B. Thomsen, and Birgitte Kiær Ahring. "Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass." *Applied microbiology and biotechnology* 66.1 (2004): 10-26.
- [3] Martim, Damaris B., et al. "Resolving the metabolism of monolignols and other lignin-related aromatic compounds in *Xanthomonas citri*." *Nature Communications* 15.1 (2024): 7994.
- [4] Huacachino, Andrea Andress, et al. "Aldo-keto reductase (AKR) superfamily website and database: An update." *Chemico-biological interactions* 398 (2024): 111111.