

Proposta de Projeto PIBIC

“Entendendo os mecanismos moleculares de descarboxilases para produção de químicos renováveis e biocombustíveis *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/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 enzimas 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. Nosso 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. Como resultados desses esforços, várias patentes geradas pelo grupo foram depositadas nos últimos dois anos (BR10202001600, BR10202002353, BR10202102467, BR10202200488).

1. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

1.1. Potencial aplicação biotecnológica das enzimas citocromos P450

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_{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 os mecanismos moleculares da atividade de descarboxilação. 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.
- 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.
- 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.
- Herman, N.A.; Zhang, W. Enzymes for fatty acid-based hydrocarbon biosynthesis. **Curr Opin Chem Biol.** v.35:22-28. Review. 2016.
- 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.
- 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/>
- 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.A.; Zaphorlin, 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.
- 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.
- 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_{II} 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.
- Zaphorlin, L.M.; de Morais, 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.
- Zaphorlin, 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.
- Zaphorlin, 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.
- Zaphorlin, 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.
- Zaphorlin, L.M.; Alves, F.R.; Ramos, C.H. The effect of celastrol, a triterpene with antitumor 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.
- Zaphorlin, 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.