



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Maitê Bernardo Correia dos Santos

Produção de ácido ferúlico usando descarboxilase heteróloga de
Klebsiella pneumoniae TD 4.7 e aplicação da enzima na produção de 4-
vinilguaiacol

Producción de descarboxilasa de ácido ferúlico heterólogo a partir de
Klebsiella pneumoniae TD 4.7 y aplicación de la enzima en la
producción de 4-vinilguayacol

São José do Rio Preto

2023

Maitê Bernardo Correia dos Santos

Produção de ácido ferúlico usando descarboxilase heteróloga de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 e aplicação da enzima na produção de 4-vinilguaiacol

Producción de descarboxilasa de ácido ferúlico heterólogo a partir de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 y aplicación de la enzima en la producción de 4-vinilguayacol

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto-SP, Brasil e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Castilla-La Mancha, Câmpus de Ciudad Real, Castilla-La Mancha, Espanha como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Microbiologia e Química, respectivamente.

Financiadoras: CNPq Proc.140035/2019-2, PDSE/CAPES Proc. 88881.622878/2021-01 e UCLM-2021-GRIN-31106

Orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

Orientador: Prof. Dr. Sergio Gómez Alonso

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ruller

Tutora: Profa. Dra. Ana Isabel Briones Pérez

São José do Rio Preto

2023

S237p	Santos, Maitê Bernardo Correia dos Produção de ácido ferúlico usando descarboxilase heteróloga de <i>Klebsiella pneumoniae</i> TD 4.7 e aplicação da enzima na produção de 4-vinilguaicol / Maitê Bernardo Correia dos Santos. -- São José do Rio Preto, 2023 155 p. : il. Tese (doutorado com dupla titulação) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto e Universidade de Castilla-La Mancha. Orientadora: Eleni Gomes Orientador: Sergio Gómez Alonso Coorientador: Roberto Ruller Tutora: Ana Isabel Briones Pérez 1. Ácido ferúlico. 2. Ácido p- umárico. 3. 4-vinilguaicol. 4. 4-vinilfenol. 5. Bagaço de cana de açúcar. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Maitê Bernardo Correia dos Santos

Produção de ácido ferúlico usando descarboxilase heteróloga de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 e aplicação da enzima na produção de 4-vinilguaiacol

Producción de descarboxilasa de ácido ferúlico heterólogo a partir de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 y aplicación de la enzima en la producción de 4-vinilguayacol

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto-SP, Brasil e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Castilla-La Mancha, Câmpus de Ciudad Real, Castilla-La Mancha, Espanha como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Microbiologia e Química, respectivamente.

Financiadoras: CNPq Proc.140035/2019-2, PDSE/CAPES Proc. 88881.622878/2021-01 e UCLM-2021-GRIN-31106

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Eleni Gomes

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Câmpus de São José do Rio Preto

Orientadora

Prof. Dr. Sergio Gómez Alonso

UCLM – Câmpus de Ciudad Real

Orientador

Prof. Dr. Henrique Ferreira

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Câmpus de Rio Claro-SP

Profa. Dra. Ellen Silva Lago Vanzela

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Câmpus de São José do Rio Preto-SP

Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Câmpus de Jaboticabal-SP

São José do Rio Preto-SP, Brasil

24 de março de 2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registrada toda minha gratidão às forças a que estiveram presentes durante a realização desta etapa, sendo a primeira e mais importante a Luz Divina que sempre me guiou e forneceu energia nos momentos necessários.

Demonstrar eterna gratidão aos meus orientadores Eleni Gomes e Sergio Gómez Alonso, ela que me aceitou e confiou que juntas poderíamos construir conhecimento e sempre esteve ao meu lado durante todo o desenvolvimento e ele que me recebeu de portas abertas em seu grupo de pesquisa na Espanha e me forneceu todos recursos necessários para o pleno desenvolvimento de uma importante etapa deste projeto que culminou numa bela parceria que veio a se tornar um Doutorado em regime de Cotutela. Mas acima de tudo, demonstrar que estive muito bem amparada em momentos imprescindíveis à conclusão deste trabalho. Bem como ao meu coorientador Roberto Ruller que foi imprescindível em etapas importantes deste trabalho, compartilhando seu conhecimento que permitiu a obtenção de bons resultados.

Ao meu amado esposo Jorge, o qual não mediu esforços para que fosse possível cada virgula aqui presente, sendo companheiro e sempre disposto a encarar todo e qualquer desafio para a plena conclusão deste trabalho. Gostaria de demonstrar gratidão e reconhecimentos especiais, pois sei o quão singular é a vida de um pós graduando e quanto isso pode modificar a rotina de quem se dispõe a vivenciar, e hoje olhando cada momento que compartilhamos sei o quão importante é ter um verdadeiro companheiro ao lado.

Aos meus pais Isabel e Edgar, irmão Edgar, irmãs Isabella e Pamella que sempre compreenderam minhas ausências e me acalentavam o coração compartilhando suas melhores energias.

Agradecimentos especiais a amiga Josiani de Cassia por todo auxílio e ação com as análises estatísticas e melhoria da discussão e ao amigo Jorge Hernandez com as análises computacionais, sem ambos estes trabalhos não se completariam. Aos colegas de laboratório pelas conversas, risos e compartilhamento de conhecimentos que muitas vezes deixavam leve um dia longo de experimentos, são eles: Eduardo Simioni, Roni, Cíntia, Vitória, Érike, Anas, Anna, Matheus, Jana, Ana,

Gustavo, José, Eduardo, Tania, Inés, Yara e Thiago. Aos professores Maurício Boscolo, Roberto da Silva, Arni, Gustavo Bonilla, Ricardo Mariutti, Roberto Ruller e Ellen Lago por todo suporte e auxílio nos momentos de dúvida ao longo do desenvolvimento do trabalho.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88881.622878/2021-01, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Proc.140035/2019-2, à qual agradeço. Também agradeço a Universidad de Castilla-La Mancha - UCLM -2021-GRIN-31106, mantenedora do laboratório onde realizei parte dos meus estudos.

RESUMO

Derivados vinílicos comercialmente importantes podem ser obtidos em bioprocessos por descarboxilação de ácidos fenólicos, como o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico, por enzima como a ácido ferúlico descarboxilase, resultando em compostos de valor agregado como 4-vinilguaiaicol e 4-vinilfenol, respectivamente. Neste estudo, o gene que codifica a ácido ferúlico descarboxilase em *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 foi isolado e identificado como um fragmento de 504 pb, que codifica um polipeptídeo de 167 resíduos de aminoácidos. O gene foi expresso em *Escherichia coli* BL21(DE3), e a enzima recombinante, purificada como uma proteína de 22 kDa, com maior atividade em pH 5,5 e a 40°C. A ácido ferúlico descarboxilase recombinante foi completamente inibida por Hg⁺², Zn⁺², Cu⁺² e Cd⁺² e apresentou aumento de atividade na presença de Co⁺² (aproximadamente +20%). Os valores de K_m e V_{max} foram estimados para o substrato ácido ferúlico em 2,95 mM e 102,10 μmol.min⁻¹.mg⁻¹. A enzima ácido ferúlico descarboxilase teve seu modelo predito gerado usando os programas de predição estrutural *AlphaFold Multimer* e *Swissmodel*, com um RMSD de apenas 0,7 Å, demonstrando a ausência de cisteína e pontes dissulfeto no homodímero, a presença de grandes quantidades de lisina, e os resíduos envolvidos no ciclo catalítico Tyr27, Glu134 e Asn23. A enzima foi testada para conversão dos ácidos ferúlico e *p*-cumarico obtidos por hidrólise de bagaço de cana de açúcar em método de extração sólido-líquido alcalina convencional. Nessa hidrólise, obteve-se 135,41 mg L⁻¹ de ácido ferúlico e 948,82 mg L⁻¹ de ácido *p*-cumárico, dos quais foram obtidos 53,58 mg L⁻¹ de 4-vinilguaiaicol e 437,89 mg L⁻¹ 4-vinilfenol, rendimentos de 43% e 55% respectivamente. Estes resultados indicaram a viabilidade do uso destes compostos obtidos de fonte renovável, para a produção de *flavours* naturais de valor comercial.

Palavras chave: Ácido ferúlico. Ácido *p*-cumárico. 4-vinilguaiaicol. 4-vinilfenol. Bagaço de cana de açúcar. *Flavours* naturais.

RESUMEN

Los derivados vinílicos comercialmente importantes se pueden obtener a través de bioprocesos por descarboxilación de sus ácidos fenólicos precursores, como el ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico, que, mediante enzimas como la ácido ferúlico descarboxilasa, dan como resultado compuestos de valor añadido como el 4-vinilguayacol y el 4-vinilfenol, respectivamente. En este estudio, el gen que codifica la ácido ferúlico descarboxilasa en *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 se aisló e identificó como un fragmento de 504 pb, que codifica un polipéptido de 167 residuos de aminoácidos. El gen se expresó en *Escherichia coli* BL21(DE3), y la enzima recombinante se purificó como una proteína de 22 kDa, con mayor actividad a pH 5,5 y a 40 °C. La ácido ferúlico descarboxilasa recombinante fue completamente inhibida por Hg⁺², Zn⁺², Cu⁺² y Cd⁺² y mostró una mayor actividad en presencia de Co⁺² (con un incremento de actividad cercano al 20%). Los valores de K_m y V_{max} encontrados para el sustrato ácido ferúlico fueron 2.95 mM y 102.10 µmol.min⁻¹.mg⁻¹, respectivamente. La estructura del enzima recombinante ácido ferúlico descarboxilasa se regeneró usando los programas de predicción estructural *AlphaFold Multimer* y *Swissmodel*, con un RMSD de solo 0.7 Å, demostrando la ausencia de enlaces de cisteína y disulfuro en el homodímero, la presencia de grandes cantidades de lisina, y residuos involucrados en el ciclo catalítico Tyr27, Glu134 y Asn23. La enzima se probó para la conversión de ácidos ferúlico y *p*-cumárico obtenidos por hidrólisis de bagazo de caña de azúcar en un método de extracción sólido-líquido alcalino convencional. En esta hidrólisis se obtuvieron 135,41 mg L⁻¹ de ácido ferúlico y 948,82 mg L⁻¹ de ácido *p*-cumárico, a partir de los cuales, por acción del enzima recombinante, se obtuvieron 53,58 mg L⁻¹ de 4-vinilguayacol y 437,89 mg L⁻¹ de 4-vinilfenol, lo que representa rendimientos de conversión del 43% y del 55% respectivamente. Estos resultados indicaron la factibilidad de usar ácidos hidroxicinámicos obtenidos de fuentes renovables, para la producción de aromatizantes naturales comercialmente valiosos.

Palabras clave: Ácido ferúlico. Ácido *p*-cumárico. 4-vinilguayacol. 4-vinilfenol. Bagazo de caña de azúcar. Sabores naturales.

ABSTRAT

Decarboxylation of phenolic acids in bioprocesses, like ferulic acid and p-coumaric acid, can provide commercially profitable vinyl derivatives by using enzymes, such as ferulic acid decarboxylase, which result in compounds with additional value like 4-vinylguaiacol and 4-vinylphenol, respectively. In this study, the gene encoding ferulic acid decarboxylase in *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 was isolated and identified as a 504 bp fragment, which encodes a polypeptide of 167 amino acid residues. The gene was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), and the recombinant enzyme was purified as a 22 kDa protein with higher activity at pH 5.5 and 40°C. Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , and Cd^{+2} completely inhibited recombinant ferulic acid decarboxylase, however Co^{+2} boosted activity (about +20%). The ferulic acid substrate's K_m and V_{max} values were estimated to be 2.95 mM and 102.10 $\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectively. The enzyme ferulic acid decarboxylase had its predicted model generated using the structural prediction programs *AlphaFold Multimer* and *Swissmodel*, with an RMSD of only 0.7 Å, demonstrating the absence of cysteine and disulfide bonds in the homodimer, the presence of large amounts of lysine, and residues involved in the catalytic cycle Tyr27, Glu134, and Asn23. In a conventional alkaline solid-liquid extraction approach, the enzyme was evaluated for the conversion of ferulic and p-coumaric acids derived from the hydrolysis of sugarcane bagasse. This hydrolysis produced 135.41 mg L^{-1} of ferulic acid and 948.82 mg L^{-1} of p-coumaric acid, from which 53.58 mg L^{-1} of 4-vinylguaiacol and 437.89 mg L^{-1} of 4-vinylphenol were produced, yielding 43% and 55%, respectively. These findings revealed the feasibility of employing these compounds derived from renewable sources to produce commercially valuable natural flavors.

Keywords: Ferulic acid. *P*-coumaric acid. 4-vinylguaiacol. 4-vinylphenol. Sugar cane bagasse. Natural flavors.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
OBJETIVOS	9
Geral	9
Específico	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
Biomassa lignocelulósica	10
Extração e fracionamento da lignina	15
Compostos Fenólicos	18
Ácido ferúlico	20
Ácido <i>p</i> -cumárico	22
Microrganismos e suas enzimas aplicados à bioprocessos	24
Produção enzimática de 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol por descarboxilação não oxidativa	31
REFERENCIAS	36
CAPÍTULO II	44
Expressão e caracterização bioquímica da enzima ácido ferúlico descarboxilase nativa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> TD 4.7	44
RESUMO	45
RESUMEN	46
CAPÍTULO III	58
Expressão heteróloga e caracterização da enzima ácido ferúlico descarboxilase de <i>Klebsiella pneumoniae</i> TD 4.7 em <i>Escherichia coli</i>	58
RESUMO	59
RESUMEN	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	63
Expressão heteróloga	63
Linhagens de microrganismos e plasmídeos	63
Extração de DNA total e obtenção do gene da ácido ferúlico descarboxilase	65
Construção do sistema de expressão para <i>E.coli</i>	67
Sequenciamento e análise da sequência	68
Padronização da expressão da proteína recombinante	68
Produção da enzima heteróloga em <i>E. coli</i> BL21(DE3) e purificação	69

Determinação da atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase	70
Caracterização bioquímica da enzima heteróloga	71
Tempo de atividade enzimática	71
Efeitos do pH e da temperatura na atividade da enzima	71
Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima quando em ausência de substrato	71
Efeito de agentes químicos sobre a atividade da enzima	72
Caracterização dos parâmetros cinéticos e especificidade da ácido ferúlico descarboxilase	72
Estimativa da massa molar da enzima	73
Determinação de proteínas totais	73
Modelagem computacional	73
Métodos analíticos para análises de ácido ferúlico e 4-vinilguaiacol	74
RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
Produção da enzima heteróloga em <i>E. coli</i> BL21(DE3) e purificação	75
Caracterização bioquímica da enzima recombinante ácido ferúlico descarboxilase	77
Tempo de reação enzimática	77
Efeitos do pH e da temperatura na atividade da enzima heteróloga purificada	78
Efeitos do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima purificada	79
Efeito de cátions sobre a atividade da enzima	81
Parâmetros cinéticos e especificidade da ácido ferúlico descarboxilase	83
Modelagem computacional	84
Modelos estruturais da enzima ácido ferúlico descarboxilase	84
CONCLUSÃO	89
REFERENCIAS	90
CAPÍTULO IV	93
Extração e fracionamento de lignina para obtenção de ácido ferúlico e ácido <i>p</i> -cumárico a partir de bagaço de cana de açúcar e talos de uva	93
RESUMO	94
RESUMEN	96
INTRODUÇÃO	98
MATERIAL E MÉTODOS	101
Biomassa lignocelulósica de cana de açúcar	101
Biomassa lignocelulósica de talos de uva	101
Procedimentos de extração	102
Preparo de amostra e análise de parâmetros gerais	103
Análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	104

Produção enzimática de 4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico de bagaço de cana de açúcar	105
Análise estatística	106
RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
Parâmetros gerais e quantificação de açúcares, fenólicos totais, ácidos ferúlico e <i>p</i> -cumárico	107
Biomassa de bagaço de cana de açúcar	107
Talos de uva	117
Produção enzimática de 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol a partir de ácido ferúlico e ácido <i>p</i> -cumárico de bagaço de cana de açúcar	122
CONCLUSÃO	125
REFERENCIAS	126
CONCLUSÕES FINAIS	129
CONCLUSIONES FINALES	131
ANEXO 1	133
Sequências da enzima AFDase para o gênero <i>Klebsiella</i> e alinhamento	133
ANEXO 2	136
Extração de DNA total e obtenção do gene da ácido ferúlico descarboxilase para construção do plasmídeo de clonagem e plasmídeo de expressão	136
Análise da sequência	139
Transformação de diferentes linhagens de <i>Escherichia coli</i> para expressão	143
Otimização de expressão e extração da proteína recombinante	144
ANEXO 3	148
Gene da enzima ácido ferúlico descarboxilase	148

INTRODUÇÃO

A utilização de biomassa lignocelulósica como precursora de bioprodutos de valor agregado e biocombustíveis, por meio de processos biológicos fecha um ciclo de processos ambientalmente seguros e sustentáveis. Corroborando ao modelo de economia circular descrito por Ghisellini e colaboradores (2018), onde o desenvolvimento econômico promove o máximo aproveitamento, reaproveitamento/reciclagem de materiais, bens e componentes de forma a diminuir ao máximo a geração de resíduos; inovando a cadeia de produção, consumo, distribuição e recuperação de materiais e energia (NADDEO; TAHERZADEH, 2021).

Biocompostos, definidos como compostos de origem unicamente biológica, têm sido preferidos frente produtos de síntese química, dentro daquela perspectiva de consumo e entre eles, estão os aromatizantes para aplicação em alimentos e cosmética. Um desses aromatizantes de amplo uso é o 4-vinilguaiacol (2-metoxi-4-vinilfenol), produto da bioconversão do ácido ferúlico, com aroma de cravo e um alto poder aromatizante, frequentemente aplicado em bebidas, alimentos e cosméticos (BURANOV; MAZZA, 2009; LI; LONG; DING, 2020, SAUCEDO-CASTAÑEDA, 2010).

O ácido ferúlico é um composto encontrado na parede celular de células vegetais fazendo a ligação entre resíduos da lignina e a hemicelulose e liberado durante os processos químicos e/ou biológicos de desconstrução da biomassa lignocelulósica. O ácido ferúlico, assim como vários outros derivados da quebra da lignina, podem ser convertidos a outros compostos por atividade metabólica microbiana, garantindo característica de origem biológica dos produtos (BILAL; IQBAL, 2020).

Assim como o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico é um dos ácidos fenólicos encontrados em abundância na matéria lignocelulósica, existindo de forma livre ou ligada covalentemente à lignina (VIRKLUND et al., 2022; ZHAO et al., 2011). Estudos demonstram que o ácido *p*-cumárico apresenta valor em sua forma natural e/ou biotransformado em produtos como 4-vinilfenol, entretanto a fonte que tem sido explorada pela indústria na geração das moléculas oriundas é sintética originada da síntese química de derivados do petróleo (PAZ et al., 2019).

A utilização de derivados dos resíduos lignocelulosicos como substrato em bioprocessos é uma alternativa altamente promissora, propiciando economia circular e redução de custos dos processos industriais. Nesse sentido, o presente trabalho

foi desenvolvido com o objetivo de obter um composto aromatizante, o 4-vinilguaiacol, a partir de ácido ferúlico obtido de hidrólise de bagaço de cana de açúcar como substrato, por catalise enzimática utilizando a ácido ferúlico descarboxilase de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 em sua forma nativa e posteriormente clonada em *Escherichia coli*. Com o andamento das atividades desenvolvidas neste estudo foi verificada a presença de ácido *p*-cumárico, o qual foi convertido pela mesma via enzimática em 4-vinilfenol.

O texto aqui apresentado, foi organizado em capítulos:

- Capítulo I corresponde à revisão bibliográfica referente ao tema em estudo.
- Capítulos II e III contêm os dados sobre a produção e caracterização bioquímica da ácido ferúlico descarboxilase nativa de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7, clonagem e expressão da enzima em *E. coli* e caracterização da enzima recombinante.
- Capítulo IV adaptação de metodologias para fracionamento da lignina proveniente de biomassa renovável e obtenção de ácido ferúlico.

As pesquisas referentes aos capítulos II e III, bem como as conversões enzimáticas do capítulo IV, foram executadas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, na Universidade Estadual Paulista (UNESP/IBILCE), sob a orientação da Professora Eleni Gomes.

A parte de tratamento e extrações da biomassa lignocelulósica, referente ao capítulo IV, foi executada na Faculdade de Ciencias y Tecnologias Químicas, Universidade Castilla-La Mancha (IRICA), durante o estágio de co-tutela, no período de setembro/2021 a fevereiro 2022, sob a orientação do Professor Sergio Gómez Alonso.

OBJETIVOS

Geral

Produção da enzima ácido ferúlico descarboxilase nativa de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7, expressão heteróloga em *Escherichia coli*, e aplicação da enzima na bioconversão de ácido ferúlico.

Específico

Capítulo II:

- Caracterização bioquímica da enzima ácido ferúlico descarboxilase nativa de *K. pneumoniae* TD 4.7 em sua forma bruta e corresponde a um artigo já publicado.

Capítulo III:

- Isolamento e identificação do gene codificador da enzima;
- Construção de sistema de expressão heteróloga para *E. coli*;
- Expressão da enzima solúvel em *E. coli*;
- Purificação e caracterização bioquímica da enzima recombinante.

Capítulo IV:

- Extração e fracionamento de lignina para obtenção dos ácidos ferúlico a partir de biomassa lignocelulósica de cana de açúcar e talos de uva;
- Aplicação da enzima ácido ferúlico descarboxilase para produção de 4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico de biomassa lignocelulosa.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Biomassa lignocelulósica

Os resíduos agrícolas são materiais oriundos da atividade agrícola e do processamento de matérias agrícolas crus. Com base na porcentagem de celulose, esses compostos podem ser categorizados em lignocelulósicos (madeira, fibra de coco, bagaço de cana, casca de grãos, subprodutos de milho, arroz e café) e resíduos não lignocelulósicos (resíduos de frutas, hortaliças, sementes e derivados amiláceos) (SHERWOOD, 2020).

O resíduo lignocelulósico, ou biomassa lignocelulósica, é o material natural mais abundante e amplamente distribuído em nosso planeta e também gerado em grande quantidade nos diferentes setores de atividade humana. Composta basicamente por celulose (13 – 50 %), hemicelulose (0,2 – 40%) e lignina (16 – 45%), em proporções variando de acordo com características específicas e a fonte desta biomassa, pode também conter pequenas frações de lipídeos, proteínas e água (PEREIRA SCARPA et al., 2019). Seu armazenamento, utilização ou descarte são grandes desafios devido ao volume e à diversidade das fontes que atribuem características diferenciadas a cada resíduo (BILAL; IQBAL, 2020).

A celulose é um polissacarídeo linear não ramificado que consiste em várias centenas a milhares de monômeros de glicose ligados por ligações glicosídicas β -1-4. As cadeias de celulose estão associadas formando fibrilas, que são fracamente unidas por meio de forças de *van der Waals* e ligações de hidrogênio. Essas se agrupam em regiões cristalinas mais organizadas e regiões amorfas, que se apresentam menos organizadas. O entrelaçamento das regiões amorfa e cristalina resulta na formação da estrutura da celulose (ALMEIDA; LADISCH, 2020).

A hemicelulose está presente em todas as camadas da parede celular das plantas, principalmente como agente ligante entre a celulose e a lignina. A hemicelulose apresenta natureza heteropolissacarídica ramificada, formada por principalmente pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico). Considera-se a hemicelulose o maior polissacarídeo estrutural de células vegetais,

com características que resultam em materiais flexíveis e baixa interação química (ALMEIDA; LADISCH, 2020).

Celulose e hemicelulose são os principais constituintes glicídicos estruturais das paredes celulares das plantas e seus componentes se encontram arrançados de modo que as cadeias de celulose e hemicelulose estão afixadas pela lignina, como um meio de proteção aos ataques externos de insetos e microrganismos. Essa recalcitrância é atribuída à cristalinidade da celulose, à hidrofobicidade da lignina e aos arcahouços formados de redes lignina-celulose (ALMEIDA; LADISCH, 2020).

A lignina é um polímero aromático amorfo e tridimensional composto por monômeros de fenilpropano metoxilados, que se associa à hemicelulose por ligações covalentes e não covalentes. Esse polímero tem características importantes para a planta, uma vez que dificulta processos de infecções por microrganismos e aumenta a resistência física do material lignocelulósico. Ademais, sua característica hidrofóbica promove impermeabilidade dos vasos condutores do fluxo aquoso nas plantas (ALMEIDA; LADISCH, 2020; CHIO; SAIN; QIN, 2019).

A quebra da lignina gera uma grande diversidade de frações derivadas de precursores de fenilpropano, que diferem entre si pelo grau de substituição de metoxila no anel aromático, conforme demonstrado na Figura 1. A proporção dos três tipos de monômeros na lignina varia de acordo com a espécie da planta. De maneira geral a lignina de madeira macia consiste essencialmente na unidade G, a lignina de madeira dura é construída a partir de unidades G e S e a lignina gramínea é composta por todas as três unidades. Além das composições de unidades variadas, a diversidade nas ligações entre as unidades aumenta ainda mais a heterogeneidade estrutural da lignina. As ligações entre as unidades são principalmente ligação simples, ligações éter e C – C, e suas proporções também variam de acordo com a espécie da planta (DEL RÍO et al., 2009).

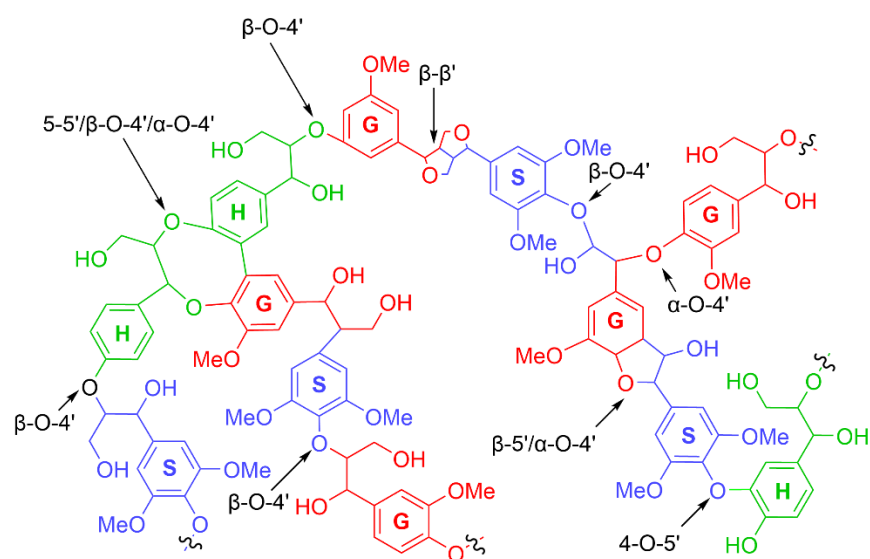
Figura 1 - Monômeros precursores da lignina.



Fonte: autor.

A estrutura da lignina é formada principalmente por um processo de polimerização radical de três monolignóis que é iniciada por enzimas específicas, cujo o acoplamento radical entre monômeros de lignina resulta na formação de uma variedade substancial de ligações entre unidades. Essas ligações entre unidades incluem principalmente ligações éter e C – C. A ligação β – O – 4 entre o carbono β de uma unidade e a hidroxila fenólica da outra é a ligação éter mais abundante, enquanto outros tipos de ligações éter, como α – O – 4 e 4 – O – 5 também estão presentes na estrutura. Ligações C – C, β – 1, β – 5 e β – β também são observadas, bem como estruturas mais complexas envolvendo três subunidades (dibenzodioxocina), como mostrado na Figura 2 (PANG et al., 2021).

Figura 2 - Estrutura da lignina e suas principais ligações moleculares.



Fonte: adaptado de Pang e colaboradores (2021).

Em sua composição, a lignina é um grande fornecedor de compostos aromáticos naturais renováveis, e muitos estudos têm sido direcionados ao aproveitamento de suas frações afim de convertê-las em produtos de maior valor agregado (CAO et al., 2018; RAGAUSKAS et al., 2014; WANG et al., 2020). O aumento gradual destes estudos está principalmente relacionado a busca por um processo racional e rentável do uso de biomassa lignocelulósica, que podem ser direcionados para a produção de biocombustíveis a partir dos polímeros de açúcar ou de outros bioprodutos utilizando derivados aromáticos da lignina (NASEEM et al., 2016; PANG et al., 2021). Atualmente, a lignina é utilizada como combustível em caldeiras de baixa combustão, embora seus derivados aromáticos sejam uma fonte riquíssima de bioprodutos de alto valor no mercado. Isso deve-se, principalmente, à dificuldade de fracionamento e caracterização dos derivados da lignina que são altamente heterogêneos.

Geralmente, a ligação éter é a ligação mais abundante na lignina, compreendendo a 77-85% de todas as ligações na lignina de gramíneas, 67-74% na lignina de madeira dura e 49-57% na lignina de madeira macia (DEL RÍO et al., 2009; ZAKZESKI et al., 2010).

A variedade dos diferentes tipos de monômeros e suas ligações são considerados fator determinante para a polidispersividade do peso molecular da lignina. E conforme o processo de pré-tratamento e isolamento pode-se agravar ainda mais esta heterogeneidade das frações da lignina, quando condições como altas temperaturas e adição de produtos químicos estão envolvidos.

Como mencionado anteriormente, quando da observação de seu processo constitutivo, a lignina tem sua estrutura primária formada a partir da polimerização de radicais de monômeros de fenilpropano e a variabilidade do grau de polimerização resulta em peso molecular polidisperso (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003; VANHOLME et al., 2010). Essa polimerização ocorre através de uma série de processos fisiológicos e bioquímicos desencadeados por peroxidases e lacases, que por sua vez, não interferem na forma com que os monômeros serão unidos, tornando o processo uma constante polimerização aleatória (ÖNNERUD et al., 2002).

Os processos de tratamento e isolamento desta fração do material lignocelulósico, gera uma ampla variedade de possibilidades de compostos os quais

podem proporcionar aumento nas características heterogêneas da lignina (PEREIRA SCARPA et al., 2019).

As reações de desconstrução da lignina por reações ácido/base são as principais razões para a geração de heterogeneidade na lignina extraída e em seus derivados em relação ao peso molecular e tipo químico. Os métodos industriais principais que são aplicados atualmente para a separação da lignina são o sulfito, álali, *Kraft* e *Organosolv*. Todos os métodos têm o mesmo propósito, que é degradar quimicamente a estrutura da lignina polimérica até que os fragmentos resultantes se tornem solúveis na solução extratora (UPTON; KASKO, 2016). Estes métodos de desconstrução da biomassa lignocelulósica apresentam efeitos físicos como a perturbação da estrutura magna, e químicos como a solubilização e despolimerização das frações com rompimento da reticulação entre macromoléculas (BAJPAI, 2016).

A lignina degradada difere em níveis de peso molecular devido ao grau variado de reações de despolimerização durante o processo de isolamento, bem como as reações de condensação de produtos despolimerizados. A polidispersão causada pelo processo de isolamento depende em grande parte das conexões químicas das unidades de lignina. Por exemplo, quando a lignina é extraída por cozimento alcalino, as ligações de éter β -arílico são mais propensas a rompimento, enquanto a ligação simples C – C, assim como a ligação simples β – 5, são bastante estáveis neste processo (PEREIRA SCARPA et al., 2019). Por outro lado, como a macromolécula de lignina é polimerizada aleatoriamente e com diferentes conexões, ela tende a ser degradada em fragmentos com pesos moleculares diferentes mesmo nas mesmas condições de isolamento, resultando na alta polidispersão da lignina extraída. Além disso, estudos sugeriram que o aquecimento prolongado leva ao aumento do peso molecular dos produtos de hidrólise da lignina obtidos, o que é uma consequência das reações de condensação progressivas que se dão neste processo (ALEKHINA et al., 2015).

As técnicas de fracionamento de lignina têm sido classificadas em três categorias: precipitação ácida gradiente, fracionamento por solvente em etapas e separação por membrana com diferentes pontos de corte. Após o fracionamento, as frações de lignina obtidas exibem propriedades dependentes da massa molecular e, portanto, usá-las como matérias-primas para aplicações subsequentes exige separação e identificação (PANG et al., 2021).

Extração e fracionamento da lignina

O tratamento alcalino é o método que leva à maior solubilização da lignina entre os processos de extração utilizados, pois as ligações éster entre a hemicelulose com a lignina são mais facilmente quebradas nessas condições e com pouca degradação da hemicelulose e celulose. Vários reagentes podem ser utilizados para este processo, como o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônia e hidróxido de cálcio. O hidróxido de sódio é o reagente mais usado uma vez que promove a extração da lignina e boa eliminação da hemicelulose (REN et al., 2016).

Os tratamentos de extração da lignina causam efeitos físicos e químicos na estrutura da biomassa lignocelulósica, sendo possíveis alterações como o aumento da área superficial e perturbação da estrutura magna, solubilização e despolimerização. Durante a extração da lignina com tratamentos alcalinos, diversas substâncias fenólicas podem ser liberadas, as quais dependem da planta de origem e da intensidade do processo (LARSSON et al., 1999). Em geral, a mistura resultante é composta de aldeídos, cetonas fenólicas, ácidos fenólicos e álcoois fenólicos, tais como, o 5-(Hidroximetil)furfural, o ácido 2-furóico, o 4-hidroxibenzaldeído, o ácido 4-hidroxibenzóico, a vanilina, o álcool coniferílico, o siringaldeído, o ácido siringico e o ácido ferúlico (SUN et al., 2016).

O fracionamento da lignina corresponde a sua subdivisão em frações cuja polidispersidade é diminuída em comparação com a lignina original e essas frações exibem obviamente distribuições de peso molecular diferentes umas das outras. Foi demonstrado que o peso molecular tem um impacto importante nas propriedades físico-químicas da lignina (GIGLI; CRESTINI, 2020). Sob essa premissa, é viável subdividir a lignina parental com base no peso molecular para obter frações de lignina com características diferentes para posterior aplicação na produção de diferentes materiais, como demonstrado na Figura 3 (HUANG et al., 2017).

Figura 3 - Possíveis aplicações da lignina de acordo com o peso molecular.



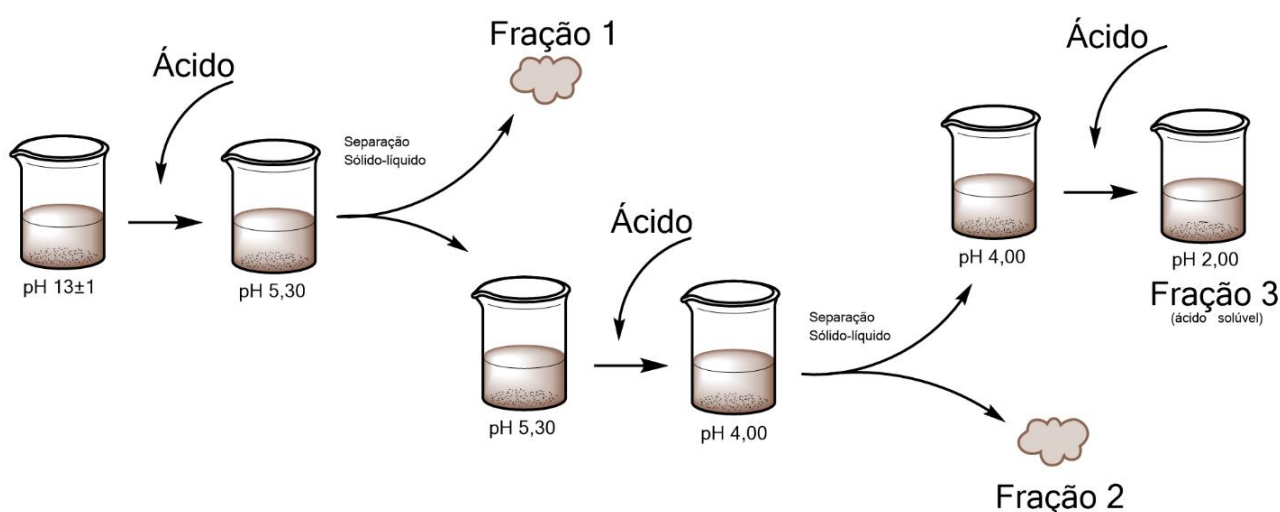
Fonte: autor.

Os métodos de fracionamento de lignina são classificados em três grandes categorias: precipitação ácida gradiente, fracionamento de solvente em etapas e separação por membrana com diferentes pontos de corte. O fracionamento da lignina tem duas finalidades: 1) análise da estrutura química da lignina; 2) obter subdivisões de lignina com propriedades melhoradas para promover a utilização industrial da lignina. Para o primeiro propósito, o fracionamento por meio de extração por solvente por etapas é o método mais comumente usado devido às vantagens, incluindo eficiência de fracionamento, fácil operação e alta aplicabilidade a diferentes fontes e tipos de lignina (GIGLI; CRESTINI, 2020; SADEGHIFAR et al., 2020). No entanto, todos os três métodos são aplicados quando o fracionamento de lignina é usado para melhorar as propriedades da lignina para valorização do material.

O fracionamento da lignina pelo método de precipitação ácida é favorecido pelo fato da mesma, quando em solução básica, apresentar estrutura colóide estável devido a carga negativa na superfície do colóide. Com a adição do ácido, o H^+ neutraliza a carga da superfície dos colóides promovendo a agregação dos mesmos que culmina na precipitação da lignina. Sabe-se que os colóides formados por lignina de baixo peso molecular contêm mais carga negativa devido ao conteúdo muito maior de grupos como OH fenólico e COOH, o que lhes oferece maior

estabilidade em relação a lignina de alto peso molecular. Sendo assim, quando do processo de precipitação de lignina heterogênea, a lignina de alto peso molecular é precipitada em valores de pH mais altos, enquanto que a lignina de baixo peso molecular é precipitada em valores de pH mais baixos e com isso é possível o fracionamento da lignina utilizando valores de pH decrescentes em gradiente, conforme demonstrado na Figura 4 (LOURENÇON et al., 2015; WANG; CHEN, 2013).

Figura 4 - Esquema demonstrativo do fracionamento da lignina pelo método de precipitação ácida



Fonte: autor, baseado nos dados de LOURENÇON et al., 2015.

A precipitação ácida gradiente, é principalmente usada para soluções de lignina obtidas a partir de processos de isolamento com soluções básicas. O método permite remover a grande maioria dos produtos químicos alcalinos adicionados no processo de isolamento da lignina e obter amostras sólidas de lignina relativamente pura com peso molecular diferente, o que é benéfico para a aplicação subsequente de lignina como a extração de compostos fenólicos de utilidade para a geração de bioprodutos (LOURENÇON et al., 2015).

Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos químicos que possuem em sua estrutura pelo menos um anel aromático, contendo um ou mais grupos hidroxila ligados. Atualmente, muitos compostos fenólicos foram isolados e classificados de acordo com suas propriedades químicas ou ocorrência natural, uma vez que estão distribuídos de forma variada na maioria dos tecidos vegetais, inclusive nos frutos onde atuam como antioxidantes naturais em resposta ao estresse biótico e abiótico (VERMERRIS; NICHOLSON, 2007).

Os compostos fenólicos são necessários nas plantas para uma variedade de tarefas que compreendem pigmentação, crescimento, reprodução e resistência a patógenos. Eles também são responsáveis pela proteção contra luz ultravioleta, servem como compostos sinalizadores e reguladores químicos internos, e atuam como defesa contra fungos patógenos e insetos fitófagos (MURKOVIC, 2016).

Estes compostos são sintetizados pelas plantas durante seu crescimento como metabolitos secundários por meio da via do fenilpropanol, de maneira simplificada, o metabolismo das plantas pode ser dividido em primário e secundário, o primeiro está envolvido na formação dos compostos essenciais encontrados em todas as células caracterizados por vias estruturais e de produção ou armazenamento de energia, esse metabolismo é fundamental para manutenção da vida celular. Por outro lado, o metabolismo secundário está envolvido com a formação dos compostos não vitais para célula, porém não menos importantes, por serem compostos que auxiliam na adaptação dos organismos e sobrevivência em condições variadas. Os metabólitos secundários apresentam uma gama de funções e têm uma variabilidade química maior que a dos metabólicos primários, desempenhando papéis relacionados ao desenvolvimento, defesa e crescimento das plantas (HERRERO et al., 2012; VERMERRIS; NICHOLSON, 2007).

Os compostos fenólicos mais comumente encontrados na natureza são os ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides, os quais tem sido amplamente estudado como combatentes de toxinas microbianas, antioxidantes em cosméticos e alimentos, antimicrobianos e anticancerígenos, dentre outras aplicações (ANDISHMAND et al., 2023; BONDAM et al., 2022; GIOXARI et al., 2016; SARICA OGLU et al., 2023).

Os ácidos hidroxicinâmicos/cinâmicos são um grupo de moléculas que possuem sua estrutura química formada por um esqueleto contendo um anel benzênico (C6) e uma unidade fenilpropanoíde (C3), possuindo ampla distribuição no Reino Vegetal. Os derivados do ácido cinâmico são encontrados na forma de ésteres do ácido quínico, ácido tártaro e outros ácidos orgânicos ou a carboidratos e derivados, raramente aparecendo na forma livre e frequentemente associados à parede celular (CHANDRASEKARA, 2019; ESCOBAR-AVELLO et al., 2021).

Os ácidos cinâmicos são produzidos na rota metabólica de síntese da lignina, na via fenilpropanoide que é responsável pela formação de vários outros compostos polifenólicos como flavonóides, isoflavonóides, cumarinas e taninos. A enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) catalisa a primeira etapa da via fenilpropanoide, ligando-se a L-fenilalanina e removendo o grupo amino da molécula para produzir ácido cinâmico, que é posteriormente biotransformado por outras enzimas gerando com isso uma série de compostos derivados (VERMERRIS; NICHOLSON, 2007). Os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes em quase todas as plantas; como é o caso dos ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico, geralmente encontrados em formas ligadas glicosiladas. E destes se encontra amplamente distribuídos dentre as diferentes espécies de gramíneas, como a cana de açúcar, o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico (MURKOVIC, 2016; SALGADO et al., 2012).

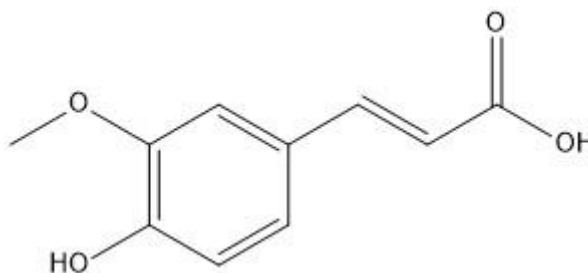
O conteúdo e a composição dos ácidos hidroxicinâmicos dependem da localização morfológica e do estágio de diferenciação em que as células vegetais se encontram. Foi relatado que o ácido ferúlico se deposita rapidamente nas paredes celulares no estágio inicial da lignificação, subseqüentemente, resíduos de ácido *p*-cumárico depositam-se continuamente ao longo da lignificação e se tornam um constituinte predominante dos ácidos hidroxicinâmicos (MORRISON et al., 1998).

Todas as paredes celulares da cana de açúcar possuem de 5 a 15% de ácidos hidroxicinâmicos. Antes da lignificação, durante o alongamento celular, polissacarídeos, proteínas e ácidos hidroxicinâmicos são incorporados na lamela média rica em pectina em desenvolvimento e na parede celular primária. Como moléculas bifuncionais com sítios de ligação carboxílicos e fenólicos, esses ácidos hidroxicinâmicos podem estar envolvidos em ligações éster e éter (HE; TERASHIMA, 1991).

Ácido ferúlico

O ácido ferúlico (Figura 5), nome IUPAC (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoico e fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$, pertence à família dos ácidos hidroxicinâmicos. Isolado pela primeira vez da planta *Ferula foetida*, o ácido ferúlico apresenta uma cadeia lateral não saturada e aparece nas formas isoméricas *cis* e *trans*, devido à ligação dupla presente na cadeia lateral que é submetida à isomerização *cis-trans* e o grupamento *fenoxi* estabilizado por ressonância é responsável por sua efetiva atividade antioxidante (GRAF, 1992; HLASIWETZ; BARTH, 1866).

Figura 5 - Formula estrutural do ácido ferúlico.



Fonte: autor.

O ácido ferúlico é um dos ácidos fenólicos mais abundantes na matéria lignocelulósica, existindo de forma livre ou ligada covalentemente à lignina e a outros polímeros da planta como a hemicelulose presente nos componentes da parede celular. Confere rigidez à parede celular fazendo a reticulação entre polissacarídeos e lignina (MATHEW; ABRAHAM, 2006b).

A síntese de ácido ferúlico nas plantas ocorre posterior à via metabólica do ácido chiquímico, que inicia com a produção de aminoácidos aromáticos L-fenilalanina e L-tirosina. Inicialmente, a fenilalanina e a tirosina são convertidas em ácido cinâmico e *p*-cumárico pelas enzimas fenilalanina amônia-liase e tirosina amônia-liase, respectivamente (GRAF, 1992). O ácido *p*-cumárico é convertido a ácido ferúlico por hidroxilação e reação de metilação. A oxidação e a metilação de ácido ferúlico e outros compostos aromáticos geram derivados de di e tri-hidroxi do ácido cinâmico, que participam da formação de lignina juntamente com ácido ferúlico (GOWRI et al., 1991; KUMAR; PRUTHI, 2014).

A extração de ácido ferúlico a partir de fontes naturais é um processo viável do ponto de vista ambiental e econômico em função de sua aplicabilidade em bioprocessos podendo ser usado para síntese de outros produtos de valor agregado ou composição de muitas drogas, alimentos funcionais e nutracêuticos. Embora se encontre amplamente presente na parede celular dos materiais lignocelulósicos, o ácido ferúlico não é diretamente disponível para a bioconversão, pois está ligado covalentemente com uma variedade de carboidratos. Em função disso, métodos alcalinos, ácidos e enzimáticos para a extração de ácido ferúlico de diferentes fontes de biomassa têm sido propostos (BURANOV; MAZZA, 2009; MATHEW; ABRAHAM, 2006a; TILAY et al., 2008).

Muitos mecanismos para a bioconversão do ácido ferúlico por ação de microrganismos já foram demonstrados. Estas rotas metabólicas estão divididas de acordo com a reação precursora da via, sendo: descarboxilação não oxidativa; β -oxidação; redução da cadeia lateral e desacetilação dependente ou não de coenzima-A (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1993).

Durante a descarboxilação não oxidativa, ocorre em formação de estirenos, tais como o 4-vinilguaiacol, bem como compostos quinoides como metabólitos intermediários. Esta rota foi observada em muitos microrganismos. Para rotas dependentes ou não de coenzima A, são mais ocorrentes as reações que necessitam da presença desta molécula no meio reacional. Neste caso, a reação inicia com a transformação do ácido ferúlico em feruloilCoA pela ação da enzima feruloil-CoA sintetase, sendo obrigatória a presença de coenzima A, adenosina trifosfato e $MgCl_2$ como cofatores nesta etapa. Em seguida, com a ação de outra enzima (4-hidroxicinamoil-CoA hidratase), um intermediário transiente é formado e pode ser então convertido em vanilina e acetil-CoA, ao final da reação. Este tipo de catabolismo do ácido ferúlico foi relatado primeiramente em *Pseudomonas fluorescens* (CIVOLANI et al., 2000).

A β -oxidação, também dependente de coenzima A, inicia com a conversão do ácido ferúlico em feruloil-CoA novamente pela ação da enzima feruloil-CoA sintetase e, a partir de reações sequenciais, é transformada em ácido vanílico. Neste caso, a presença de cofatores não é requerida. O mecanismo envolvido nesta reação é análogo ao envolvido no metabolismo de ácidos graxos, envolvendo a formação de um intermediário quinóide (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1993).

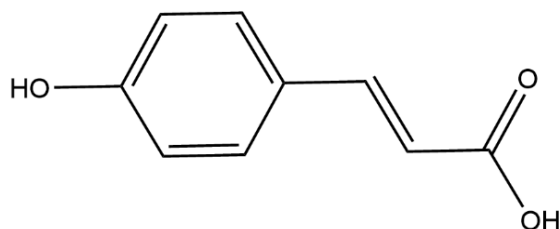
Para algumas cepas bacterianas, como por exemplo *K. pneumoniae*, *P. fluorescens* e *Bacillus pumilus*, o 4-vinilguaiacol foi o produto final da reação (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1994; LEE; VOLM; ROSAZZA, 1998) ou um intermediário do metabolismo para as cepas de *Streptomyces setonii*, *B. coagulans* e *Enterobacter* sp. (SALGADO et al., 2012, 2014). Karmakar e colaboradores (2000), propuseram que na rota metabólica utilizada pela cepa de *B. coagulans* o ácido ferúlico foi descarboxilado a 4-vinilguaiacol, e convertido em vanilina e, posteriormente oxidada a ácido vanílico, seguido da desmetilação a ácido protocatecóico e formação de catecol. O 4-vinilguaiacol foi o principal produto.

Li e colaboradores (2008), relataram, em trabalho com uma cepa de *Enterobacter* sp. Px6-4, a capacidade daquele microrganismo em formar primeiramente 4-vinilguaiacol dentre os metabólitos envolvidos na transformação de ácido ferúlico em vanilina. Hunter e colaboradores (2012), obtiveram a formação de 4-vinilguaiacol como principal produto com pequenas quantidades de vanilina, álcool vanílico e ácido vanílico por *E. soli* e *E. aerogenes* quando cultivados em meio com o ácido ferúlico.

Ácido *p*-cumárico

O *p*-cumárico (Figura 6), nome IUPAC (E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico e fórmula molecular $C_9H_8O_3$, pertence à família dos ácidos hidroxicinâmicos. Apresenta uma cadeia lateral não saturada e aparece nas formas isoméricas *cis* e *trans* e é relatado como um composto presente em altas concentrações na biomassa lignocelulósica de gramíneas principalmente nas espécies de clima quente como a cana de açúcar e o milho (BURANOV; MAZZA, 2008; FAULDS; WILLIAMSON, 1999).

Figura 6 - Formula estrutural do ácido *p*-cumárico.



Fonte: autor.

Assim como o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico é um dos ácidos fenólicos mais abundantes na matéria lignocelulósica, existindo de forma livre ou ligada covalentemente à lignina e a outros polímeros da planta como a hemicelulose presente nos componentes da parede celular. Confere rigidez à parede celular fazendo a reticulação entre polissacarídeos e lignina (VIRKLUND et al., 2022; ZHAO et al., 2011).

O ácido *p*-cumárico é formado no metabolismo secundário das plantas na via geral do fenilpropanoíde, iniciando-se com a biotransformação do L-fenilalanina a ácido cinâmico catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase. Subsequentemente, o ácido cinâmico é hidroxilado mediante a catalise da enzima 4-hidroxilase do ácido cinâmico, resultando na formação do ácido *p*-cumárico (FOSTON; RAGAUSKAS, 2012). Reações enzimáticas subsequentes são empregadas para a transformação dele nos outros compostos derivados tais como o ácido ferúlico, citado anteriormente.

Embora seja menos presente na parede celular das plantas lenhosas e herbáceas quando comparado as estruturas reprodutivas, o ácido *p*-cumárico é um dos principais componentes associados à parede celular covalentemente ligados aos carboidratos e a lignina, unidos por ligações éster e/ou éter (LOURENÇON et al., 2015; XU et al., 2005b).

Pesquisas têm mostrado que o ácido *p*-cumárico tem propriedades quimioprotetoras e antioxidantes (KILIÇ; YEŞİLOĞLU, 2013), bem como características antimicrobianas uma vez que conjugado a membrana plasmática interfere na permeabilidade seletiva causando a morte por lise osmótica e ligando-se diretamente ao ânion fosfato na dupla hélice de DNA provocando mutações que comprometem a replicação, transcrição e expressão normal da célula procariótica

(KILIÇ; YEŞİLOĞLU, 2013; LOU et al., 2012). O ácido *p*-cumárico apresenta valor em sua forma natural e biotransformado, entretanto a fonte que tem sido explorada pela indústria na geração das moléculas oriundas é sintética originada da síntese química de derivados do petróleo (PAZ et al., 2019).

Mecanismos para a bioconversão do ácido *p*-cumárico por ação de microrganismos foram demonstrados para cepas fúngicas e bacterianas, o transformando em metabolitos intermediários de interesse comercial (SARIASLANI, 2007). Os produtos da via são espécie específicos, variando em resposta ao microrganismo empregado, entre os compostos gerados mais relatados na literatura estão o 4-vinilfenol reportado para cepas de *Bacillus aryabhattai* e *Lactobacillus plantarum* (DEGRASSI; POLVERINO DE LAURETO; BRUSCHI, 1995; PAZ et al., 2019), ácido cafeíco produzido a partir de metabolismo de cepas de *Escherichia coli* e *Rhodotorula glutinis* (LIN; YAN, 2012; LIU; XU; XU, 2022; RODRIGUES et al., 2015), ácido *p*-hidroxibenzóico produzido com cepas de *Streptomyces caeruleus* MTCC 6638 e *Paecilomyces variotii* (JAIN et al., 2015; JYOTHI; JIMCY; MANOHAR, 2018) e ácido protocatecuico produzido com cepas de *Azotobacter* sp. SSB81, *Bacillus megaterium* e *Curvularia lunata* (GAURI et al., 2012; TORRES Y TORRES; ROSAZZA, 2001).

A produção biológica de metabólitos tem intuito de substituir a síntese química por meio de processos naturais economicamente viáveis, como exemplo das novas aplicações comerciais pode-se citar a utilização na composição de cosméticos, fármacos e até de produtos tecnológicos emergentes como o bioplástico.

Microrganismos e suas enzimas aplicados à bioprocessos

A ciência, mais especificamente a ciência de desenvolvimento biotecnológico visa a aplicação de ferramentas relacionadas a química verde e a utilização de compostos renováveis como matéria prima de produção, ou mesmo a utilização de biocatalizadores que permitem alternativas aos processos atualmente usados. Se destacam as biotransformações e bioconversões, e isso se justifica por dois principais motivos: 1) estas permitem a utilização de catalizadores produzidos por meio limpo e muitas vezes de baixo custo, e, 2) a matéria-prima utilizada nestes processos é totalmente de fonte renovável (KUNJAPUR; PRATHER, 2015).

Entretanto, se observamos de maneira mais ampla a relação humana com o uso de biotransformações, percebemos que não se trata de uma aplicação atual uma vez que os povos antigos já utilizavam da fermentação microbiana para a produção de vinho, vinagre, cerveja, pão e muitos outros produtos. E com o passar dos anos o uso do metabolismo microbiano foi se tornando cada vez mais útil e imprescindível à evolução biotecnológica, tendo como um dos muitos motivos para este destaque atual o desenvolvimento de metodologias que permitem uma melhor compreensão destes processos, com aumento da produtividade e estabilidade dos produtos obtidos por estes meios. Não menos importante, o desenvolvimento da engenharia genética que tem permitido uma gama de aplicações enzimáticas e microbianas desde temas relacionados a saúde até o desenvolvimento de alimentos, cosméticos e aditivos. Sejam enzimas livres ou imobilizadas, estas se apresentam como ferramentas catalíticas de fonte biodisponível e inesgotável, permitindo o uso de condições relativamente moderadas e limpas em relação a síntese química, e por vezes mais objetivas devido a pureza dos produtos obtidos (RIBEAUCOURT et al., 2021).

Neste sentido as biotransformações e bioconverções começam a ocupar um importante espaço, uma vez representada a infinidade de reações que podem ser realizadas produzindo compostos de grande interesse comercial. A produção biotecnológica de compostos pode ser abordada de duas formas, a primeira se trata da síntese *de novo*, que se baseia na metabolização de substratos simples (por exemplo, glicose) por organismos naturais ou modificados para produzir o produto final desejado e por biotransformação/bioconversão, que consiste na modificação química biocatalítica de um precursor estruturalmente relacionado ao produto por meio de uma ou várias etapas catalisadas por enzimas (FORTI et al., 2018; GOUNARIS, 2010). A biotransformação é uma modificação específica de um composto para um produto estruturalmente semelhante, e, é muitas vezes confundida com a bioconversão que se refere a atividade catalítica de organismos vivos onde do composto precursor ao produto principal leva-se várias etapas dentro de um processo metabólico (LILLY, 1994).

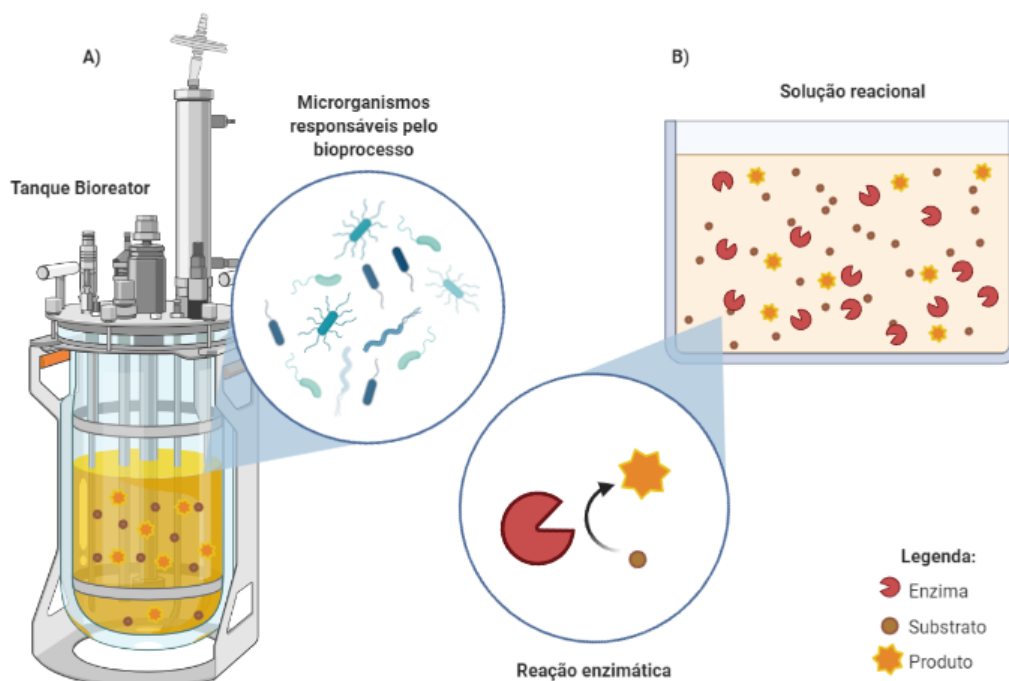
Apesar de diferentes, ambos os processos compartilham características, o biocatalisador, que é o componente chave de sistemas de biotransformação e de bioconversão. Os catalisadores biológicos são as enzimas, em grande parte proteínas que apresentam atividade catalítica; estas são caracterizadas por diminuir

a energia de ativação de uma reação, aumentando assim, a velocidade da reação e não são consumidos ou transformados por ela. As enzimas podem realizar diferentes tipos de atividade catalítica, por isso são organizadas em seis classes diferentes (pela Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular), sendo EC1 - oxidação/redução, oxidorreduases; EC2 - transferência de grupo funcional entre moléculas, transferases; EC3 - hidrólise, hidrolases; EC4 - clivagem de ligações por outros meios que não hidrólise e oxidação, liases; EC5 - isomerização dentro de uma única molécula, isomerases; e EC6 - formação de ligações com clivagem do trifosfato de adenosina (ATP), ligases (LEHNINGER et al., 2019).

Estes processos catalisados por enzimas podem ser observados isoladamente (enzima purificada) e em células inteiras onde há a expressão de uma enzima específica que promoverá a biotransformação ou bioconversão de um composto, alterando este em um meio de cultivo e não com o intuito de realizar o consumo deste produto como fonte de carbono e energia. Tais processos cabem em aplicações biotecnológicas, uma vez que determinadas cepas apresentam GRAS (Generally Regarded As Safe), e respeitando os princípios adequados ao consumo e aplicação posterior. Contudo existem muitas limitações, como a questão dos baixos níveis de produção de enzimática, uma vez que se trata de metabolismo secundário e a incompatibilidade das características do microrganismo com os padrões de qualidade exigidos (FASIM; MORE; MORE, 2021).

Como citado anteriormente os avanços atuais em engenharia genética têm permitido a identificação, produção, purificação e aplicação de enzimas isoladamente para promover a biotransformação com o objetivo de obter bioprodutos de interesse comercial uma vez que se realiza tal reação em um meio com condições controladas, por exemplo. Para isso, atualmente, existem ferramentas biomoleculares que permitem a produção de uma enzima heteróloga em um microrganismo de forma a destinar todo seu metabolismo à produção da enzima em questão, e que apresente GRAS; e, posteriormente esta pode ser purificada, imobilizada e aplicada como catalizador da reação de interesse (FASIM; MORE; MORE, 2021). Estas duas formas estão demonstradas na Figura 7.

Figura 7: A) Bioconversão com células inteiras; e, B) Bioconversão com enzimas.



Fonte: autor.

Como demonstrado na Figura 7, a enzima responsável por um determinado processo pode estar na forma isolada ou em uma célula inteira. Partindo deste princípio, os processos de produção utilizando células inteiras estarão diretamente relacionados ao cultivo das mesmas em conjunto com a biotransformação do composto de interesse (DE SOUZA et al., 2019). Portanto, desde que o substrato de cultivo suporte o crescimento microbiano e possua compostos que permitam que a biotransformação adicional ocorra, estes processos se tornam biotecnologicamente viáveis.

O potencial de biotransformação de microrganismos vem sendo testado e aplicado incluso em propostas de aproveitamento de subprodutos de outros setores industriais, como é o caso dos testes com cepas de basidiomicetos que foram capazes de transformar resíduos da indústria alimentícia em compostos de sabor. Este estudo foi apresentado por Bosse et al. (2013), onde foram testadas 30 cepas de diferentes basidiomicetos, em cultivos submersos com meio de cultura líquidos que possuíam sete subprodutos diferentes da indústria alimentícia como única fonte de carbono, e os resultados foram positivos para sete combinações de fungo/substrato com perfis de sabor interessantes. O estudo realizado por Bosse et

al. (2013), apresenta fatores a serem evidenciados como o fato de as cepas utilizadas serem de basidiomicetos comestíveis o que permite sua utilização direta em produtos de consumo humano, tais cepas apresentam um sistema enzimático extracelular (secretoma) em que é possível obter características de grande benefício industrial como relativa resistência destas enzimas as condições utilizadas durante os processos produtivos.

Já Li et al. (2019), relatam avanços para a bioprodução de 4-vinilguaiacol de alta concentração usando catálise de célula inteira abrigando uma descarboxilase de ácido fenólico (AFD) de *Bacillus atrophaeus* tolerante a solvente orgânico, o processo de produção foi realizado a partir de ácido ferúlico por descarboxilação não oxidativa e a enzima apresentou excelente atividade catalítica e estabilidade em vários solventes orgânicos permitindo a utilização de um sistema bifásico orgânico-aquoso (substrato/1-octanol).

Contudo, a cepa produtora não pode se tratar de uma cepa patogênica e sem GRAS, o que faz necessário a utilização de mecanismos de expressão heteróloga para produção da enzima de formas aceitas para consumo humano. Com base nisto foram propostos estudos relacionados a utilização de métodos biotecnológicos para produção de enzimas de maneira que possam ser utilizadas em produtos comerciais, superando limitações como microrganismo de procedência e mecanismos que permitam a reutilização destes biocatalizadores em mais de um ciclo reacional.

Na natureza há uma grande diversidade de condições e características ambientais como diferentes níveis de umidade, salinidade, pH e temperatura; e mesmo assim temos relatos da presença de microrganismos nos mais extremos ambientes. Se partirmos do princípio de que enzimas ocorrem naturalmente nestes indivíduos e que estas estão aptas a apresentar atividade catalítica nestas diferentes condições devido as adaptações que apresentam, temos então super ferramentas de trabalho que podem ser utilizadas pelo homem para desenvolvimento de produtos nas diversas condições a qual estariam sujeitas na indústria (FASIM; MORE; MORE, 2021).

Entretanto, a produção nativa de uma enzima utilizada para obter bioprodutos pode não ser vantajosa seja pelas baixas quantidades de expressão enzimática, pela dificuldade de cultivo especial e necessidades nutricionais do microrganismo nativo ou mesmo pela falta de certificação GRAS do mesmo. Temos ainda a relação

custo/benefício, tempo e grau de pureza da enzima a ser produzida para posteriores aplicações em processos de bioconversão, em que leva-se em conta também a velocidade e número de processos de purificação necessários (VOGEL; MAY, 2019).

Essas limitações tornaram-se temporárias, uma vez que com esforços científicos tem ficado claro que aplicar enzimas em processos industriais é apenas uma questão de tempo adaptativo. O desenvolvimento de metodologias e técnicas de triagem microbiana para novas atividades enzimáticas, clonagem para expressão heteróloga de enzimas e imobilização em suportes sólidos, têm permitido e viabilizado o uso de enzimas pela indústria como é o caso da biovanilina produzida a partir de bioprocessos, a qual já supera os meios de produção nativos. De acordo com a literatura disponível, os mais recentes avanços em biotransformações para produção de biovanilina focaram no aumento do rendimento e no combate aos altos custos produtivos, ou seja, manteve-se foco para uso de substratos renováveis e subprodutos de setores industriais como fonte de precursores (KHOYRATTY; KODJA; VERPOORTE, 2018; SALES et al., 2018; ZAMZURI; ABD-AZIZ, 2013).

Com a utilização de substratos renováveis, Chakraborty et al. (2017) relataram o uso de uma cepa recombinante de *Pediococcus acidilactici* BD16 para a produção de vanilina a partir de um resíduo de biomassa da agroindústria, o farelo de arroz. Neste estudo foram introduzidos dois genes que codificam duas enzimas, sendo feruloil-CoA sintetase e enoil-CoA hidratase na cepa nativa, que demonstrou um aumento de rendimento de vanilina. A clonagem e expressão heteróloga não somente viabiliza a produção de enzimas nativas em organismos hospedeiros que apresentem a certificação necessária para consumo, como também propicia maiores quantidades de enzima juntamente com processos que facilitam a purificação, o que torna o processo produtivo destes biocatalizadores mais ágil e com menor custo.

Outra referência atual do poder da manipulação genética para a obtenção de bioprodutos é o trabalho realizado com uma descarboxilase de ácido fenólico de *Bacillus atrophaeus* imobilizada por afinidade direta com um peptídeo ligante em zeólita para bioconversão de ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol. A ligação ao suporte com peptídeo se mostrou altamente estável, seletiva e reversível; e também a vantagem de realizar a purificação da enzima juntamente ao processo de imobilização diretamente no lisado bruto celular. O complexo enzima/suporte pôde ser usado repetidamente em um sistema bifásico orgânico/aquoso e reteve 73% de

sua atividade inicial após 10 ciclos de reutilização. Esses resultados obtidos por Li et al. (2020) destacaram o grande potencial do uso de peptídeos ligantes para imobilização de biocatalisadores usados em condições bifásicas de reação orgânica/aquosa.

Também recentemente, Lee et al. (2022) promoveram a edição do genoma de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para melhorar a qualidade, segurança e sabor de alimentos fermentados. Com edição baseada Cas9 obtiveram alterações genéticas precisas referentes a codificação RGT2 e SNF3, responsáveis pelos sensores de glicose permitindo o aumento da respiração que culminou em uma massa de pão com 18% mais volume devido à maior produção de dióxido de carbono. Também realizaram a superexpressão de ASP3 para asparaginase e a exclusão de codificação de URE2 para um fator de transcrição de repressão catabólica de nitrogênio para aumentar o consumo de asparagina, que quando aplicadas em batatas resultaram em batatas fritas com quantidades insignificantes de acrilamida. E por fim, URE2 foi utilizada para aumentar os níveis de aminoácidos que proporcionam um *flavour* agradável e saboroso durante a fermentação do vinho de arroz. Estas cepas de levedura editadas não continham DNA heterólogo, o que permite seu uso para melhorar os alimentos fermentados sem sujeição à regulamentação organismos geneticamente modificados (GM).

As enzimas microbianas e seus genes nem sempre são obtidas por busca direta em microrganismos como é o caso do estudo realizado por Zhao et al. (2018), em que a biotransformação eficiente de isoeugenol em vanilina em cepas recombinantes de *Escherichia coli* expressando isoeugenol monooxygenase (IEM) foi obtida a partir de metagenoma microbiano. A isoeugenol monooxygenase permite incorporar um grupo hidroxil ao isoeugenol, sendo a enzima chave para a biotransformação do isoeugenol em vanilina. Neste estudo foram utilizadas metodologias *in silico* para seleção de uma nova isoeugenol monooxygenase que por fim apresentou melhor capacidade catalítica do que a mesma enzima já relatada em outros microrganismos.

Estas são algumas das mais atuais metodologias para produção e aplicação de enzimas em processos industriais e produtos finais, fica claro que ainda há um longo caminho a ser percorrido, mas os avanços em engenharia metabólica e plataformas microbianas para uma indústria sustentável baseada em reaproveitamento vêm permitindo tal realidade e tornando possível vislumbrar um

momento industrial em que a utilização de enzimas para produção em larga escala de compostos de interesse comercial vai muito mais além do que é possuído atualmente.

Produção enzimática de 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol por descarboxilação não oxidativa

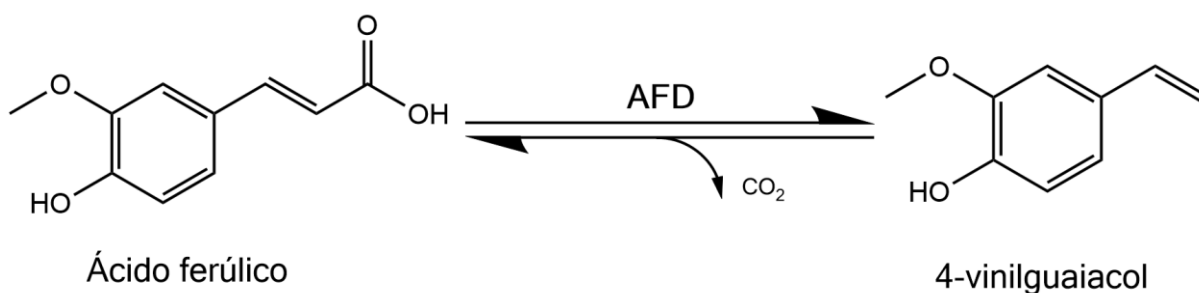
Uma vez que os ácidos ferúlico e *p*-cumárico estão presentes em grandes proporções em hidrolisados de materiais lignocelulósicos, constituem uma importante matéria-prima renovável para conversão biocatalítica em produtos químicos de alto valor agregado, tais como os compostos resultantes de sua descarboxilação, respectivamente: 4-vinilguaiacol (3-metoxi-4-hidroxiestireno) e 4-vinilfenol (4-etenilfenol), compostos os quais o custo comercial é consideravelmente maior comparado aos seus precursores.

O 4-vinilguaiacol, com um aroma picante de cravo é um componente importante para a indústria de alimentos e cosmética, particularmente como aromatizante em cervejas, vinhos, molhos de soja e na indústria cosmética na produção de fragrâncias que são componentes de uma ampla gama de produtos (SUN et al., 2018; WU et al., 2020). Este composto possui um limiar de detecção extremamente baixo, em torno de 0,30 ppm, o que resulta em um aroma fenólico bastante persistente mesmo em pequenas concentrações nos referidos produtos (MEILGAARD, 1975).

Na indústria alimentícia o 4-vinilguaiacol na também é utilizado como conservante de alimentos. Na indústria farmacêutica é utilizado devido a sua potencial atividade antiproliferativa, reduzindo carcinogênese, e à atividade antioxidante, no campo oftálmico, para a preparação de uma solução contendo agentes aromatizantes. Em indústrias cosmética e química e usado também como aromatizador e como matéria-prima para a fabricação de outros produtos, como a vanilina, (Patente US 20060292188) (GÜNTHER et al., 2021; HUNTER; MANTER; VAN DER LELIE, 2012; LI; LONG; DING, 2019; LUO et al., 2021; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 2010; TAŃSKA; MIKOŁAJCZAK; KONOPKA, 2018). Devido a essa ampla aplicação o composto possui alto valor econômico.

A demanda industrial de 4-vinilguaiaicol não é atendida por extração a partir de fontes naturais, bem como a sua síntese por vias químicas requer reagentes de alto custo, condições severas de processamento e o um rendimento entre 30% e 40% (BERNINI et al., 2007). Por outro lado, a síntese por descarboxilação biológica de ácidos cinâmicos, como o ácido ferúlico, pode ser realizada por microrganismos ou suas enzimas. Diferentes microrganismos, principalmente bactérias, são capazes de transformar ácido ferúlico em 4-vinilguaiaicol, onde a via de bioconversão microbiológica do ácido ferúlico a 4-vinilguaiaicol é a reação de descarboxilação não oxidativa por ação da enzima ácido ferúlico descarboxilase (EC 4.1.1.102) (Figura 8) (DEGRASSI; POLVERINO DE LAURETO; BRUSCHI, 1995; HUANG et al., 2012b).

Figura 8 - Reação de descaboxilação do ácido ferúlico promovida pela enzima ácido ferúlico descarboxilase (AFD).



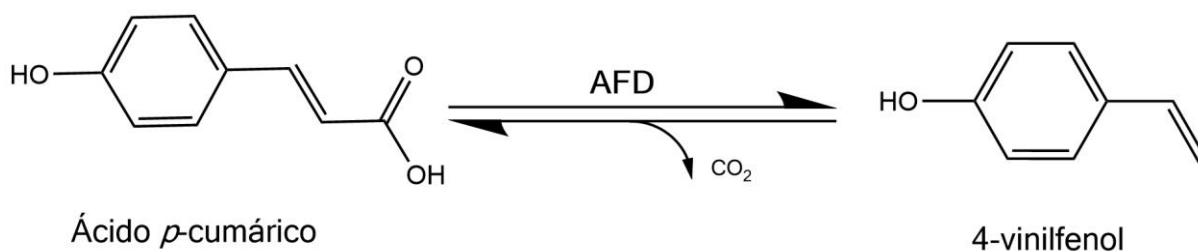
Fonte: autor.

Dividida em três subclasses, nomeadamente enzimas dependentes de prFMN, dependentes de metal divalente e independentes de cofator (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020b; GU et al., 2011a; HUNTER; MANTER; VAN DER LELIE, 2012). As descarboxilases independentes de cofator requerem um grupo hidroxila obrigatório na posição *para* do substrato e são promissoras na bioprodução de 4-vinilguaiaicol e derivados pela sua independência de cofatores externos (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020b). Em 2015 teve sua estrutura resolvida por meio de cristalografia de raios-X (PDB: 4S13), a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, evidenciando os detalhes de sua interação com 4-vinilguaiaicol em nível atômico (BHUIYA et al., 2015).

Isolada e caracterizada pela primeira vez a partir de *P. fluorescens* UI 670, a enzima ácido ferúlico descarboxilase não requer cofatores e não contém grupos

prostéticos. Esta enzima também descarboxila o ácido *p*-cumárico a 4-vinilfenol, por meio de uma descarboxilação não oxidativa (SALGADO et al., 2012) (Figura 9).

Figura 9 - Reação de descarboxilação do ácido *p*-cumárico promovida pela enzima ácido ferúlico descarboxilase (AFD).



Fonte: autor.

O 4-vinilfenol possui várias aplicações na forma de aromatizante natural ou como precursor de polímeros, utilizado principalmente na indústria de alimentos e bebidas na melhora das características organolépticas, propiciando um aroma similar ao de cravo-da-índia sendo aprovado pela EMA GRAS (Associação dos Fabricantes de Aromas e Extratos; Geral Considerado como Seguro), também usado na formulação de perfumes e cosméticos (AZADMANJIRI et al., 2014; LU et al., 2019).

A partir do monômero precursor 4-vinilfenol são sintetizados vários outros compostos bioativos e polímeros usados em revestimentos antimicrobianos (GUO; ZHU; LOH, 2017), adesivos resistentes a água (PESHKOVA; LI, 2003), associados também a construção de aparelhos eletrônicos presentes em transistores orgânicos (XING et al., 2018), baterias de lítio (KIM et al., 2017), ou em películas foto resistentes (NASRULLAH et al., 2000; XING et al., 2018). Além da utilização de forma isolada como antifúngico natural no combate aos patógenos vegetais (AYER; MUIR; CHAKRAVARTY, 1996).

Compostos aromatizantes produzidos por via biotecnológica são legalmente classificados como aditivos naturais e, por isso, apresentam-se mais atrativos do ponto de vista econômico em comparação aos flavorizantes sintéticos (BETTIO, 2020). Os insumos produzidos através da aplicação de bioprocessos possuem o status legal de produto natural e seguro e são também alternativas ecologicamente sustentáveis, pois podem ser obtidos a partir da utilização de resíduos e

subprodutos gerados pelo processamento de alimentos como bagaços, cascas e outros (BERGER, 2015).

Sabe-se que os processos para produção de materiais e compostos artificiais por meio de síntese química, muitas vezes representam uma sequência de processos prejudiciais ao ambiente e podem culminar na formação de misturas racêmicas indesejáveis, levando a necessidade de purificação e reduzindo a eficiência dos processos. Isso se dá pelas inúmeras limitações como a baixa seletividade e a formação de produtos indesejáveis (LI; LONG; DING, 2019). Movida por tais desvantagens e pelo crescente interesse em produtos advindos de fontes naturais e renováveis, as indústrias de produção têm buscado novas estratégias baseadas em biotecnologia que estão sendo cada dia mais aprimoradas com a construção de estudos e mecanismos que permitam a economia circular ser realmente efetiva (SHERWOOD, 2020).

Os métodos enzimáticos são mais adequados para a produção de compostos aplicáveis às indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética pois requerem condições de reação brandas, apresentam alta seletividade com relação ao substrato e não gera subprodutos, resultando em produto final química e enantiomericamente mais puros (FASIM; MORE; MORE, 2021).

De acordo com o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes, os aromatizantes podem ser classificados em: natural, artificial ou artificial idêntico ao natural. Embora a síntese química seja o método mais comum utilizado na obtenção de compostos de aroma, a denominação “natural” de aromas obtidos por extração direta ou via biotecnológica mostra-se cada vez mais atrativo para a indústria e para o mercado consumidor (BRASIL, 2007).

Estudos mostraram que os microrganismos podem seguir diferentes rotas metabólicas para os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, sendo gerados vários produtos com potencial de aplicação (LUBBERS et al., 2019; ROSAZZA et al., 1995). Quando da observação da atividade enzimática em seus meios naturais nota-se grande eficiência na realização reações químicas específicas com alta seletividade, o que é de grande interesse para indústrias e estudiosos em geral. A alta seletividade tem se mostrado uma grande vantagem a ser explorada em diversos processos industriais que vão desde a indústria farmacêutica para sintetizar produtos bioativos, de forma menos custosa e mais pura (DEVINE et al., 2018).

Sendo assim, a produção biotecnológica destes compostos representa uma alternativa promissora com maiores vantagens em comparação aos métodos tradicionais de síntese. Além de ser um produto natural, com impacto altamente positivo no mercado consumidor, a síntese de bioaromas envolve processos que apresentam alta enantioseletividade, o que permite a obtenção de produtos com elevada pureza ótica e com melhores características sensoriais; produção contínua e sem impacto ou interferência sazonal; maior controle e otimização de parâmetros, objetivando a diminuição de gastos energéticos e uso de reagentes nocivos ao meio ambiente (LI; LONG; DING, 2020).

REFERENCIAS

- ALEKHINA, M. et al. Softwood kraft lignin for value-added applications: Fractionation and structural characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 220–228, 1 abr. 2015.
- ALMEIDA, R. M. R. G.; LADISCH, M. R. Enzyme interactions on lignocellulosic biomass structure. **Recent Advances in Bioconversion of Lignocellulose to Biofuels and Value-Added Chemicals within the Biorefinery Concept**, p. 33–59, 1 jan. 2020.
- ANDISHMAND, H. et al. Nano-delivery systems for encapsulation of phenolic compounds from pomegranate peel. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 311, p. 102833, 1 jan. 2023.
- AYER, W. A.; MUIR, D. J.; CHAKRAVARTY, P. Phenolic and other metabolites of *Phellinus pini*, a fungus pathogenic to pine. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1321–1324, 1 jan. 1996.
- AZADMANJIRI, J. et al. A review on hybrid nanolaminate materials synthesized by deposition techniques for energy storage applications. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 11, p. 3695–3708, 18 fev. 2014.
- BAJPAI, P. **Structure of Lignocellulosic Biomass. In: Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production**. Singapore: Springer Singapore, 2016.
- BERGER, R. G. **Biotechnology as a source of natural volatile flavours** *Current Opinion in Food Science* Elsevier Ltd, , 1 fev. 2015.
- BERNINI, R. et al. Obtaining 4-vinylphenols by decarboxylation of natural 4-hydroxycinnamic acids under microwave irradiation. **Tetrahedron**, v. 63, n. 39, p. 9663–9667, set. 2007.
- BHUIYA, M. W. et al. Structure and Mechanism of Ferulic Acid Decarboxylase (FDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 12, p. 4216–23, 15 jun. 2015.
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Ligninolytic Enzymes Mediated Ligninolysis: An Untapped Biocatalytic Potential to Deconstruct Lignocellulosic Molecules in a Sustainable Manner. **Catalysis Letters**, v. 150, n. 2, p. 524–543, 1 fev. 2020.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. **Lignin Biosynthesis** *Annual Review of Plant Biology*, 2003.
- BONDAM, A. F. et al. Phenolic compounds from coffee by-products: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 123, p. 172–186, 1 maio 2022.
- BOSSE, A. K.; FRAATZ, M. A.; ZORN, H. Formation of complex natural flavours by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2952–2959, 1 dez. 2013.
- BRASIL. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007 - Ministério da Saúde**. Disponível em:

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/rdc0002_15_01_2007.html. Acesso em: 14 jan. 2023.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 3, p. 237–259, 1 nov. 2008.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1542–1548, ago. 2009.

CAO, L. et al. **Lignin valorization for the production of renewable chemicals: State-of-the-art review and future prospects** *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2018.

CHAKRABORTY, D. et al. Application of recombinant *Pediococcus acidilactici* BD16 (fcs +/ech +) for bioconversion of agrowaste to vanillin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 14, p. 5615–5626, 1 jul. 2017.

CHANDRASEKARA, A. Phenolic Acids. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 535–545, 1 jan. 2019.

CHIO, C.; SAIN, M.; QIN, W. **Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2019.

CIVOLANI, C. et al. Bioconversion of Ferulic Acid into Vanillic Acid by Means of a Vanillate-Negative Mutant of *Pseudomonas fluorescens* Strain BF13. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2311–2317, 1 jun. 2000.

DEGRASSI, G.; POLVERINO DE LAURETO, P.; BRUSCHI, C. V. Purification and characterization of ferulate and p-coumarate decarboxylase from *Bacillus pumilus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 1, p. 326–32, 1 jan. 1995.

DEL RÍO, J. C. et al. Structural characterization of the lignin from jute (*corchorus capsularis*) fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10271–10281, 11 nov. 2009.

DE SOUZA, E. L. et al. Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities—A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1645–1659, 31 maio 2019.

DETERING, T.; MUNDY, K.; BERGER, R. G. Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants. **PLOS ONE**, v. 15, n. 12, p. e0244290, 21 dez. 2020.

DEVINE, P. N. et al. **Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development** *Nature Reviews Chemistry* Nature Publishing Group, , 1 dez. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41570-018-0055-1>. Acesso em: 26 maio. 2021

ESCOBAR-AVELLO, D. et al. Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from grape canes: Comprehensive characterization by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. **Food Research International**, v. 143, p. 110265, 1 maio 2021.

FASIM, A.; MORE, V. S.; MORE, S. S. **Large-scale production of enzymes for**

biotechnology usesCurrent Opinion in BiotechnologyElsevier Ltd, , 1 jun. 2021.

FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 393–395, 1999.

FORTI, L. et al. Nonconventional Yeast-Promoted Biotransformation for the Production of Flavor Compounds. **Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes**, p. 165–187, 1 jan. 2018.

FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A. J. Biomass Characterization: Recent Progress in Understanding Biomass Recalcitrance. **Industrial Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 191–208, ago. 2012.

GAURI, S. S. et al. Biotransformation of p-coumaric acid and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid by *Azotobacter* sp. strain SSB81. **Bioresource technology**, v. 126, p. 350–353, 2012.

GIGLI, M.; CRESTINI, C. **Fractionation of industrial lignins: opportunities and challenges**Green ChemistryRoyal Society of Chemistry, , 7 ago. 2020. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/gc/d0gc01606c>>. Acesso em: 3 maio. 2021

GIOXARI, A. et al. Phenolic Compounds: Bioavailability and Health Effects. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 339–345, 1 jan. 2016.

GOUNARIS, Y. Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 367–386, set. 2010.

GOWRI, G. et al. Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.): X. Molecular Cloning and Expression of S-Adenosyl-L-Methionine:Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase, a Key Enzyme of Lignin Biosynthesis. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 97, n. 1, p. 7–14, 1 set. 1991.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 435–448, out. 1992.

GU, W. et al. Structural Basis of Enzymatic Activity for the Ferulic Acid Decarboxylase (FADase) from *Enterobacter* sp. Px6-4. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 16262, 2011.

GÜNTHER, T. et al. Alternative Routes for the Production of Natural 4-Vinylguaiacol from Sugar Beet Fiber Using Basidiomycetous Enzymes. **Catalysts 2021, Vol. 11, Page 631**, v. 11, n. 5, p. 631, 14 maio 2021.

GUO, S.; ZHU, X.; LOH, X. J. Controlling cell adhesion using layer-by-layer approaches for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 1163–1175, 1 jan. 2017.

HE, L.; TERASHIMA, N. Formation and Structure of Lignin in Monocotyledons. **Holzforschung**, v. 45, n. 3, p. 191–198, 1 jan. 1991.

HERRERO, M. et al. Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food. **Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists**, p. 159–180, 1 jan. 2012.

HLASIWETZ, H.; BARTH, L. Mittheilungen aus dem chemischen Laboratorium in Innsbruck I) Ueber einige Harze [Zersetzungsproducte derselben durch schmelzendes Kali]. **Annalen der Chemie und Pharmacie**, v. 138, n. 1, p. 61–76, 1 jan. 1866.

HUANG, C. et al. Characterization of Kraft Lignin Fractions Obtained by Sequential Ultrafiltration and Their Potential Application as a Biobased Component in Blends with Polyethylene. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 12, p. 11770–11779, 4 dez. 2017.

HUANG, H.-K. et al. Purification and properties of phenolic acid decarboxylase from *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 55–62, 17 jan. 2012.

HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 7, p. 2244–50, jul. 1993.

HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P. Purification and characterization of a ferulic acid decarboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 19, p. 5912–5918, out. 1994.

HUNTER, W. J.; MANTER, D. K.; VAN DER LELIE, D. Biotransformation of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiacol by *Enterobacter soli* and *E. aerogenes*. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 752–757, 18 dez. 2012.

JAIN, J. R. et al. Standardization of medium composition and agricultural waste in the production of p-hydroxybenzoic acid by *Paecilomyces variotii*. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 647–651, 22 out. 2015.

JYOTHI, R. J.; JIMCY, T. J.; MANOHAR, S. H. Production of p-hydroxybenzoic acid and caffeic acid from p-coumaric acid using *Streptomyces caeruleus* MTCC 6638. **IJB Vol.17(1) [January 2018]**, v. 17, p. 189–192, 2018.

KHOYRATTY, S.; KODJA, H.; VERPOORTE, R. Vanilla flavor production methods: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 433–442, 1 dez. 2018.

KILIÇ, I.; YEŞİLOĞLU, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 719–724, 1 nov. 2013.

KIM, H. S. et al. Post surface treatment of $\text{LiNi}_{0.6}\text{Co}_{0.1}\text{Mn}_{0.3}\text{O}_2$ electrode with poly(4-vinylphenol) for lithium ion batteries. **Electrochimica Acta**, v. 246, p. 51–58, 20 ago. 2017.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 86–93, dez. 2014.

KUNJAPUR, A. M.; PRATHER, K. L. J. Microbial engineering for aldehyde synthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 1892–1901, 2015.

LARSSON, S. et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3–4, p. 151–159, fev. 1999.

LEE, I.-Y.; VOLM, T. G.; ROSAZZA, J. P. N. Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 3–4, p. 261–266, 1 ago. 1998.

LEE, Y.-G. et al. Genome-edited *Saccharomyces cerevisiae* strains for improving quality, safety, and flavor of fermented foods. **Food Microbiology**, v. 104, p. 103971, 1 jun. 2022.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 7ª Edição, 2019. Ed. Artmed.

LI, L.; LONG, L.; DING, S. Bioproduction of High-Concentration 4-Vinylguaiacol Using Whole-Cell Catalysis Harboring an Organic Solvent-Tolerant Phenolic Acid Decarboxylase From *Bacillus atrophaeus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 0, n. AUG, p. 1798, 2019.

LI, L.; LONG, L.; DING, S. Direct Affinity-Immobilized Phenolic Acid Decarboxylase by a Linker Peptide on Zeolite for Efficient Bioconversion of Ferulic Acid into 4-Vinylguaiacol. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 39, p. 14732–14742, 5 out. 2020.

LIN, Y.; YAN, Y. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. **Microbial cell factories**, v. 11, n. 1, 2 jan. 2012.

LIU, Y.; XU, W.; XU, W. Production of Trans-Cinnamic and p-Coumaric Acids in Engineered *E. coli*. **Catalysts**, v. 12, n. 10, p. 1144, 1 out. 2022.

LOU, Z. et al. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 550–554, 1 jun. 2012.

LOURENÇON, T. V. et al. Hardwood and softwood kraft lignins fractionation by simple sequential acid precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 154, p. 82–88, 5 nov. 2015.

LU, Q. et al. Catalytic fast pyrolysis of alkali-pretreated bagasse for selective preparation of 4-vinylphenol. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 143, 1 out. 2019.

LUBBERS, R. J. M. et al. **A comparison between the homocyclic aromatic metabolic pathways from plant-derived compounds by bacteria and fungi** *Biotechnology Advances* Elsevier Inc., , 15 nov. 2019.

LUO, Y. et al. 4-Vinylguaiacol, an Active Metabolite of Ferulic Acid by Enteric Microbiota and Probiotics, Possesses Significant Activities against Drug-Resistant Human Colorectal Cancer Cells. **ACS Omega**, v. 6, n. 7, p. 4551–4561, 23 fev. 2021.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. **Critical reviews in microbiology**, v. 32, n. 3, p. 115–25, jan. 2006a.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Bioconversions of Ferulic Acid, an Hydroxycinnamic Acid. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 115–125, 11 jan. 2006b.

MEILGAARD, M. Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. **undefined**, 1975.

MORRISON, T. A. et al. Cell-wall composition of maize internodes of varying maturity. **Crop Science**, v. 38, n. 2, p. 455–460, 1998.

MURKOVIC, M. Phenolic Compounds: Occurrence, Classes, and Analysis. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 346–351, 1 jan. 2016.

NASEEM, A. et al. Lignin-derivatives based polymers, blends and composites: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 296–313, 1 dez. 2016.

NASRULLAH, J. M. et al. A Practical Route for the Preparation of Poly(4-hydroxystyrene), a Useful Photoresist Material. **J Polym Sci A: Polym Chem**, v. 38, p. 453–461, 2000.

ÖNNERUD, H. et al. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: A new model in lignin biosynthesis I. **Plant Cell**, v. 14, n. 8, p. 1953–1962, ago. 2002.

PANG, T. et al. Lignin fractionation: Effective strategy to reduce molecule weight dependent heterogeneity for upgraded lignin valorizationIndustrial. **Crops and Products**Elsevier B.V., , 1 jul. 2021.

PAZ, A. et al. Biotransformation of phenolic compounds by *Bacillus aryabhattai*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 42, n. 10, p. 1671–1679, 1 out. 2019.

PEREIRA SCARPA, J. DE C. et al. Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 141, p. 111795, 1 dez. 2019.

PESHKOVA, S.; LI, K. Investigation of Poly(4-Vinylphenol) As a Wood Adhesive. **Wood and Fiber Science**, p. 41–48, 2003.

RAGAUSKAS, A. J. et al. Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, 2014.

REN, N.-Q. et al. A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H₂: Key challenges and new insights. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 92–99, 2016.

RIBEAUCOURT, D. et al. Biocatalytic oxidation of fatty alcohols into aldehydes for the flavors and fragrances industry. **Biotechnology Advances**, p. 107787, 18 jun. 2021.

RODRIGUES, J. L. et al. Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli*. **Enzyme and microbial technology**, v. 71, p. 36–44, 1 abr. 2015.

ROSAZZA, J. P. N. et al. Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 472–479, 1995.

SADEGHIFAR, H. et al. Perspective on Technical Lignin Fractionation. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 22, p. 8086–8101, 8 jun. 2020.

SALES, A. et al. Biogenesis of aroma compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 77–84, 1 fev. 2018.

SALGADO, J. M. et al. Purification of ferulic acid solubilized from agroindustrial wastes and further conversion into 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii* using solid state fermentation. **Industrial Crops & Products**, v. 39, p. 52–61, 2012.

SALGADO, J. M. et al. Bioproduction of 4-vinylphenol from corn cob alkaline hydrolyzate in two-phase extractive fermentation using free or immobilized recombinant *E. coli* expressing pad gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58–59, p. 22–28, 10 maio 2014.

SARIASLANI, F. S. Development of a combined biological and chemical process for production of industrial aromatics from renewable resources. **Annual review of microbiology**, v. 61, p. 51–69, 2007.

SARICA OGLU, B. et al. Phenolic compounds as natural microbial toxin detoxifying agents. **Toxicon**, v. 222, p. 106989, 15 jan. 2023.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, I. B.-P. A G. R.-S. A E. G.-Z. B C. A. C O. L. A G. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4721–4724, 1 jun. 2010.

SHERWOOD, J. The significance of biomass in a circular economy. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122755, 1 mar. 2020.

SUN, L. H. et al. Biosynthesis of 4-vinylguaiacol from crude ferulic acid by *Bacillus licheniformis* DLF-17056. **Journal of Biotechnology**, v. 281, p. 144–149, 10 set. 2018.

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. 2016.

TAŃSKA, M.; MIKOŁAJCZAK, N.; KONOPKA, I. Comparison of the effect of sinapic and ferulic acids derivatives (4-vinylsyringol vs. 4-vinylguaiacol) as antioxidants of rapeseed, flaxseed, and extra virgin olive oils. **Food Chemistry**, v. 240, p. 679–685, 1 fev. 2018.

TILAY, A. et al. Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7644–7648, 10 set. 2008.

TORRES Y TORRES, J. L.; ROSAZZA, J. P. N. Microbial transformations of p-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. **Journal of natural products**, v. 64, n. 11, p. 1408–1414, 2001.

UPTON, B. M.; KASKO, A. M. Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: Review and perspective. **Chemical Reviews** American Chemical Society, , 14 dez. 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. Acesso em: 3 maio. 2021

VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant physiology**, v. 153, n. 3, p. 895–905, jul. 2010.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry. 2007.

VIRKLUND, A. et al. Combining genetic engineering and bioprocess concepts for improved phenylpropanoid production. **Biotechnology and Bioengineering**, 2022.

VOGEL, A.; MAY, O. Industrial enzyme applications. **Industrial Enzyme Applications**, p. 1–416, 3 jul. 2019.

WANG, G. et al. Fabrication of lignin nanospheres by emulsification in a binary γ -

valerolactone/glycerol system and their application as a bifunctional reducer and carrier for Pd nanoparticles with enhanced catalytic activity. **Green Chemistry**, v. 22, n. 24, p. 8594–8603, 21 dez. 2020.

WANG, G.; CHEN, H. Fractionation of alkali-extracted lignin from steam-exploded stalk by gradient acid precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 105, p. 98–105, 5 fev. 2013.

WU, C. et al. Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. **LWT**, v. 122, p. 109064, 1 mar. 2020.

XING, Z. et al. Highly flexible printed carbon nanotube thin film transistors using cross-linked poly(4-vinylphenol) as the gate dielectric and application for photosensitive light-emitting diode circuit. **Carbon**, v. 133, p. 390–397, 1 jul. 2018.

XU, F. et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 207–217, nov. 2005.

ZAKZESKI, J. et al. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3552–3599, 9 jun. 2010.

ZHAO, J. et al. Effect of activated charcoal treatment of alkaline hydrolysates from sugarcane bagasse on purification of *p*-coumaric acid. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 10, p. 2176–2181, 1 out. 2011.

ZAMZURI, N. A.; ABD-AZIZ, S. Biovanillin from agro wastes as an alternative food flavour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 3, p. 429–438, fev. 2013.

ZHAO, L. et al. Efficient biotransformation of isoeugenol to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli* by using engineered isoeugenol monooxygenase and sol-gel chitosan membrane. **Process Biochemistry**, v. 71, p. 76–81, 1 ago. 2018.

CAPÍTULO II

**Expressão e caracterização bioquímica da enzima ácido ferúlico
descarboxilase nativa de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7**

RESUMO

Compostos derivados da lignina têm sido utilizados como substratos para processos químicos e biológicos de obtenção de bioprodutos. O ácido ferúlico é um composto presente na biomassa lignocelulósica cuja biotransformação em compostos aromáticos foi descrita. O objetivo deste estudo foi a bioconversão do ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol por *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7. A biotransformação do ácido ferúlico comercial em 4-vinilguaiacol em meio líquido semissintético contendo o ácido ferúlico na concentração inicial de 1,5 mmol L⁻¹ atingiu 32,4%. O ácido ferúlico obtido da hidrólise alcalina do bagaço da cana-de-açúcar a 1,5 mmol L⁻¹ permitiu o rendimento de 1,3 mmol L⁻¹ de 4-vinilguaiacol, correspondendo a 81,7% do teor de ácido ferúlico. Os dados indicaram que a cepa bacteriana descarboxilou o ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol e a presença de uma célula ativa associada à descarboxilase do ácido ferúlico. A enzima apresentou atividade máxima em pH 5,5 e 40 °C e foi estável na faixa de pH 4,5 a 9,0 e temperatura de 20 a 45 °C.

Palavras chave: biomassa lignocelulósica, ácido ferúlico, 4-vinilguaiacol

RESUMEN

Los compuestos derivados de la lignina se han utilizado como sustratos en procesos químicos y biológicos para la obtención de bioproductos. El ácido ferúlico es un compuesto de la biomasa lignocelulósica cuya biotransformación en compuestos aromáticos ha sido descrita. El objetivo de este estudio fue la bioconversión de ácido ferúlico a 4-vinilguayacol por *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7. La biotransformación del ácido ferúlico comercial en 4-vinilguayacol en medio líquido semisintético que contenía ácido ferúlico a una concentración inicial de 1,5 mmol L⁻¹ alcanzó 32,4%. El ácido ferúlico obtenido de la hidrólisis alcalina del bagazo de caña de azúcar a 1,5 mmol L⁻¹ permitió obtener un rendimiento de 1,3 mmol L⁻¹ de 4-vinilguayacol, correspondiente al 81,7% del contenido de ácido ferúlico. Los datos indicaron que la cepa bacteriana descarboxiló el ácido ferúlico a 4-vinilguayacol y la presencia de una célula activa asociada con la descarboxilasa del ácido ferúlico. La enzima mostró máxima actividad a pH 5.5 y 40°C y fue estable en el rango de pH 4.5 a 9.0 y temperatura de 20 a 45°C.

Palabras clave: biomasa lignocelulósica, ácido ferúlico, bioconversión, 4-vinilguayacol



Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7

Maitê Bernardo Correia dos Santos¹ · Josiane Aniele Scarpassa¹ · Diego Alves Monteiro¹ · Guillermo Ladino-Orjuela¹ · Roberto Da Silva² · Mauricio Boscolo² · Eleni Gomes¹

Received: 17 July 2020 / Accepted: 23 February 2021
© Sociedade Brasileira de Microbiologia 2021

Abstract

Derived compounds from lignin have been used as substrates for chemical and biological processes for obtaining bioproducts. The ferulic acid is a lignocellulosic biomass whose biotransformation in flavor compounds was described. The objective of this study was the bioconversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7. The biotransformation of commercial ferulic acid into 4-vinylguaiacol in a semi synthetic liquid medium containing the ferulic acid at an initial concentration of 300 mg L⁻¹ reached 32.4%. The ferulic acid obtained from alkaline hydrolysis of the sugar cane bagasse at 300 mg L⁻¹ allowed the yield of 1.3 mmol L⁻¹ of 4-vinylguaiacol, corresponding to 81.7% of the ferulic acid content. The data indicated that the bacterial strain decarboxylated the ferulic acid to 4-vinylguaiacol and the presence of an active cell associated ferulic acid decarboxylase. The enzyme showed maximum activity at pH 5.5 and 40 °C and was stable at pH range 4.5 to 9.0 and temperature up to 45 °C. According to these biochemical properties and performance to bioconversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol, this enzyme could be viable for application in food industry.

Keywords Ferulic acid · 4-vinylguaiacol · Ferulic acid decarboxylase · *Klebsiella*

Introduction

The obtaining of sugar from polysaccharides present in lignocellulosic biomass such as cellulose and hemicellulose has been proposed aiming at several applications. However, the lignin, an aromatic heteropolymer, is usually underutilized in chemical processes due to the complexity of the fragments released by the breakdown of the molecule. The separation and identification of these fragments are both complex and costly and require the development of specific technology [1, 2].

The microbial bioconversion of phenolic acids has been studied to understand the metabolic pathway of these compounds in microorganisms, to elucidate the interaction between microorganisms and plants, and to know the components of flavor in fruits or produced them for use in fermented foods and beverages [3–5].

The biotransformation of ferulic acid may follow different pathways depending on the type of microorganism. However, in the most common metabolic pathway, 4-vinylguaiacol is the first product to be generated by the decarboxylation mechanism and converted to vanillin that is subsequently oxidized to vanillic acid, followed by a demethylation to protocatechuic acid and finally the formation of catechol [6, 7]. Isolated and characterized for the first time from *Pseudomonas fluorescens* UI 670, the key enzyme in this process is the ferulic acid decarboxylase, that is, phenacrylate decarboxylase EC 4.1.1.102, and this catalyzes the reactions 4-coumarate to 4-vinylphenol + CO₂, trans-cinnamate to styrene + CO₂, and ferulate to 4-vinylguaiacol + CO₂ (<https://enzyme.expasy.org/>) [8].

Genes expressing phenolic acid decarboxylases (PAD) were detected in filamentous fungi, yeasts, and bacteria [9–12]. The gene coding ferulic acid decarboxylase (fdc1)

Responsible Editor: Inês Conceição Roberto

✉ Maitê Bernardo Correia dos Santos
maite.bernardo@unesp.br

¹ Department of Biology, São Paulo State University-UNESP, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São José do Rio Preto, SP, Brazil

² Department of Chemistry and Environment Science, São Paulo State University-UNESP, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Jose do Rio Preto, SP, Brazil

from *Saccharomyces cerevisiae* was introduced in *Streptomyces lividans* for the conversion of trans-cinnamic acid to volatile styrene and a technological proposal for the bioconversion of ferulic acid (FA) to the value-added compound vanillin was presented [13, 14].

Around 20 million tons of sugar cane bagasse were produced in the 2019/2020 sugar cane season in Brazil. This material is made up of around 70% (w/w) of sugar polymers such as cellulose and hemicellulose and 27% of lignin [15]. The chemical hydrolysis of this material releases several phenolic compounds, mainly ferulic acid which is involved in an ester linkage between the carbon-5 atom of L-arabinose from hemicellulose and the carboxylic acid of the ferulic acid [16]. In this way, the large amount of ferulic acid available could be an important source of bioproducts with economic and technological importance.

The objectives of the present study were to define the levels of tolerance of *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 to ferulic acid, to study the bioconversion of ferulic acid from a synthetic medium and from the alkaline hydrolysis of sugarcane bagasse to 4-vinylguaiaicol, and to evaluate the ferulic acid decarboxylase activity.

Material and methods

Microorganism

The previously isolated bacteria from the working collection of the Biochemical and Applied Microbiology Laboratory, Ibilce, Unesp, São José do Rio Preto Campus, were used [17]. The identification was carried out by DNA extraction with the commercial AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, Union City, USA) from a colony obtained from cultivation on a Luria-Bertani agar medium (LB) for 12 h at 30 °C. The template DNA for amplification of the 16S rRNA gene was analyzed for purity and quantified by spectrophotometry (Nanodrop 2000c – Thermo Scientific) at 260 nm. For polymerase chain reaction (PCR) amplification of the 16S rRNA gene, primers (5'-GAGTTTGATCCTGG CTCAG-3' and 1500r (5' GTTACCTGTTACGACTT'-3) were used and Taq Phusion kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at 50 °C. The 16S rRNA 1500 pb was checked by electrophoresis on agarose 1% with 0.5 µg mL⁻¹ of ethidium bromide [18]. For the purification procedure, the illustra Gel Band Purification GFX PCR DNA kit (GE Healthcare, Chicago, USA) was used. Sequencing by the sanger method was carried out using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) with 16S rRNA sequencing primers: 20F, 1500R, 520F (5'-CAG-CAGCCGCGGTAATAC-3), 520R (5'-GTATTACGCGGCTG-63CTG-3), 920F (5'-AACTCAA ATGAATT-GACGG-3') e 920R (5'-CCGTC AATTCAT-

TTGAGTTT-3) using the ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

The sequences were analyzed with GENEIOUS 6.1.5 (Biomatters, Auckland, New Zealand) software using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database considering similarity and phylogenetic correlation. The sequences were aligned with the ClustalW tool [19]; a phylogenetic tree was constructed with the neighbor-joining algorithm [20] and the Kimura 2-P nucleotide substitution model [21], using bootstrap with 5000 repetitions, by the MEGA 6.0 software [22].

Culture media

A volume of 20 mL of the medium composed of 0.2% glucose, 0.1% NaCl, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, added to a mineral solution composed of 0.1% NH₄NO₃, 0.02% MgSO₄, 0.002% CaCl₂, 0.1% K₂HPO₃, 0.1% KH₂PO₃, and 0.005% (NH₄)₂ SO₄.H₂O, in 50-mL Erlenmeyer flasks, was used for cultivation until OD 600_{nm} = 0.8 [23, 24]. Aliquots of 0.2 mL of suspension of were used to inoculate the fermentation medium which was incubated at 30 °C, under shaking at 150 rpm.

To evaluate the effect of pH and temperature on the bacterial growth, the initial pH of the culture media was 5.5, 6.0, or 6.5 and incubation at 25, 28, or 30 °C. Every 2 h, an aliquot was taken to evaluate the bacterial biomass (OD at 600 nm) in a Molecular Devices SpectraMax spectrometer (Molecular Devices, San Jose, USA).

Tolerance of bacteria to ferulic acid and the biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiaicol

The tolerance of bacteria to ferulic acid was tested in the same cultivation conditions described above but with concentrations of 100, 200, 300, 400, and 500 mg L⁻¹, at 28 °C and at 150 rpm with sampling every 2 h for 24 h.

The biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiaicol was carried out using the methods described above and a medium containing 300 mg L⁻¹ of ferulic acid, in fermentation for 48 h. At the beginning of the assay, a sample of 1 mL was taken every 2 h and then every 8 h after 24 h. The microbial growth was determined by OD at 600nm and concentrations of glucose, ferulic acid, 4-vinylguaiaicol, and other metabolites were evaluated. The yield of products formed was calculated based on the initial concentration of ferulic acid (%).

The control consisted of the medium with ferulic acid (FA) but not inoculated (abiotic control) and the inoculated medium but without the addition of ferulic acid (biotic control).

Alkaline hydrolysis of sugar cane for obtain ferulic acid

Sugarcane bagasse supplied by Usina Itajobi Ltda – Açúcar e Alcool, (Destil, Itajobi, Brazil) was washed in tap water for 5

times to remove sugars, and dried by air circulation at $40 \pm 2^\circ\text{C}$ for 120 h until the moisture content was below 5% (w/v). The dried bagasse was crushed using a TRF 400 crusher and screened for particle size between 1.41 and 2.83 mm. This material was hydrolyzed according to the method described by Scarpa et al. [25] as follows: 5 g of material was suspended in 95 mL of 0.5 M NaOH (2 g de NaOH for 5 g of bagasse) in a 250 mL Erlenmeyer flask. The flask was sealed with foil and maintained at 120°C for 1 h at 1 atm. After cooling, the hydrolyzed solid was filtered, dried at 40°C , and then weighed and the pH corrected to pH 7.0 with 5 M HCl, followed by centrifugation at $15,000g$ for 15 min at 4°C . The supernatant was used as the culture medium. The quantification of the sugar and ferulic acid concentrations was carried out.

Determination of ferulic acid decarboxylase activity

The activity of the ferulic acid decarboxylase enzyme was determined in extracellular material (culture medium), intracellular material (broken cell extract), and cell wall fragments. The cellular biomass was cultured in 2000 mL of previously described medium containing 0.05% of glucose and 300 mg L^{-1} of ferulic acid, at 28°C , at 150 rpm, until $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.8$. A volume total of this cell suspension was used to obtain crude enzymatic solutions according to the following methodology:

- Extracellular crude enzyme: the cultured medium sample was centrifuged at $15,000g$ for 15 min and the supernatant filtered in a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ filter.
- Intracellular crude enzyme: the biomass, obtained above, was washed twice with 50-mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), the supernatant discarded, and the pellet resuspended in the abovementioned buffer (0.2 mL g^{-1} of wet biomass). This biomass suspension was sonicated 4 times for 30 s at 20 kHz with intervals of 15 s in an ice bath. The bacterial lysate was centrifuged at $15,000g$ at 4°C for 15 min and the supernatant used as the enzymatic solution.
- Cell wall extract: the pellet obtained above was resuspended in 50-mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) and centrifuged at $15,000g$ at 4°C for 15 min. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in a 50-mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) added at a concentration of 0.2 g mL^{-1} (wet weight).

The enzymatic activity assays were measured in a reaction mixture composed of 0.05 mL of the extracts ($10\% \text{ v v}^{-1}$) and 0.45 mL of a solution composed of 0.5 g L^{-1} of ferulic acid. The reaction mixture was incubated at 30°C for 15 min. The activity of the ferulic acid decarboxylase enzyme was measured by the reduction of ferulic acid and the formation of 4-vinylguaiacol (μmol). One unit of activity was defined as the production of $1\text{ }\mu\text{mol}$ of 4-vinylguaiacol per min.

For the determination of specific activity, the total enzyme unit (U) and the biomass weight (g) were considered as a reference for total cell used in the reaction. Additionally, the total protein was quantified according to the Bradford method, using bovine serum albumin as the standard [26].

Effect of pH and temperature on enzyme activity and stability

The effect of pH on enzyme activity was determined in the pH 4.0 to 9.0 range (0.1 M sodium acetate pH 4.0 to 5.0; MES pH 5.5 to 6.5; HEPES pH 7.0 to 8.0; BICINE pH 8.5 to 9.0) at 30°C and the effect of temperature was evaluated up to 20 to 60°C temperature range at pH 5.5, according to enzyme reaction described above. Enzyme stability was determined by incubating the enzyme, in absence of substrate. For pH stability determination, samples were incubated in buffers from pH 4.0 to pH 9.0, at 4 and 25°C for 60 min. For determination of thermal stability, the crude enzyme solution was incubated at 20 to 50°C range for 60 min. The remaining decarboxylase activity was assayed under standard conditions described above at 40°C and pH 5.5.

Effect of dithiothreitol and L-cysteine on enzyme activity

The influence of dithiothreitol and L-cysteine was evaluated by measuring enzymatic activity in the presence of 0.2, 0.5, and 1 mM of both compounds separately. As a control, reactions without the compounds were used.

Analytical methods

The supposed metabolites derived from ferulic acid such as catechol (benzene-1,2-diol), guaiacol (2-methoxyphenol), 4-vinylguaiacol (2-methoxy-4-vinylphenol), vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid), and vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) were searched for using HPLC and GC. Samples were filtered through a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ filter and $20\text{-}\mu\text{L}$ aliquots were injected into the 1220 Infinity liquid chromatograph (LC) (Agilent, Santa Clara, USA), equipped with a binary pump, automatic sampler, column oven, and a UV/VIS detector. The column used was a ZORBAX Eclipse Plus C18 ($4.6 \times 250\text{ mm}$) (Agilent, Santa Clara, USA), maintained at 25°C . Chromatographic separation was performed using a mobile phase of methanol:acetic acid:water ($10:2:88 \text{ v v}^{-1}$) as the solvent "A" and methanol:acetic acid:water ($90:2:8 \text{ v v}^{-1}$) as solvent "B" [26]. The retention times of each compound were determined and the calibration curves were performed at concentrations of 2.5 to 300 mg L^{-1} for ferulic acid and its metabolites, the correlation coefficient being 0.999 for the compounds studied. Confirmation of the metabolites was done against specific standard and the area of the peaks was initially calculated.

The confirmation of the metabolite 4-vinylguaicol was done by gas chromatography coupled to the mass spectrometer. Ten milliliters of sample was packed with a SampliQ C18 cartridge (Agilent, Santa Clara, USA) in 1 mL of dichloromethane in a vacuum pump. A Clarus 680 gas chromatograph coupled to a Clarus 600T mass spectrometer was used, using the proprietary TurboMass software (Perkin Elmer, Waltham, USA). An Elite-WAX chromatographic column ($30 \times 0.25\text{mm}$, $1\text{ }\mu\text{m}$) was used (Perkin Elmer, Waltham, USA) with an oven temperature set at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (maintained for 1 min), an increase of $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, an increase of $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ up to $170\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by an increase from $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ (maintained for 10 min), an injector temperature at $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, a transfer liner temperature of $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, and an ionization source temperature $180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Helium was used as the carrier gas, 6 psi/min, splitless injection mode, and the volume of samples injected was $1\text{ }\mu\text{L}$. The samples were analyzed in scan mode (40 to 350 m/z).

The quantification of the sugars was performed using ion exchange chromatography using a Dionex ICS-5000 HPAEC-PAD (Thermo Scientific, Waltham, USA) with a CarboPac® PA-1 anion exchange column at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, with eluents prepared with ultrapure deionized $18\text{ M}\Omega$ water and degassed with N_2 . The flow used was 1 mL min^{-1} with the solvent "A" (ultrapure water) and solvent "B" (500 mM NaOH), using isocratic elution with 4% B and 96% A for 25 min. The lint sample was centrifuged at $15,000\text{g}$ for 15 min, then the supernatant was filtered onto a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ membrane, diluted 50-fold, and injected into the chromatograph.

Results

Bacterium identification

Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences demonstrating the position of strain TD 4.7 (deposited on GenBank with accession MH888217) is in the clade of strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Yersinia enterocolitica* strain ATCC 9610 was used as an external group. The sequences were aligned with the CLUSTAL W program and were constructed with the neighbor-joining algorithm and the 2-parameter Kimura model integrated in the MEGA 5.2 program. The bootstrap values are shown on the nodes. GenBank accession numbers are given prior to the name of the strains (Fig. 1).

Growth of bacteria in different temperatures and pH and evaluation of tolerance and biodegradation of ferulic acid

The *K. pneumoniae* TD 4.7 showed higher growth at 28 and $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ but no difference was seen in relation to the initial pH of the medium (Fig. 2a, b, and c). For the experiments that followed, a pH of 6.5 and a temperature of $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ were used.

The comparison of the bacterial growth in different concentrations of ferulic acid with biotic control showed that there was no significant difference until a concentration of 300 mg L^{-1} but after which, there was a significant effect on the bacterial growth. With ferulic acid concentration of 400 mg L^{-1} , there was an increase in the lag phase period from 2 to 6 h, although there was no decrease in the maximum growth in 24 h. The growth curve model in the media with 400 mg L^{-1} shows that the bacterium must trigger adaptive mechanisms to reduce the toxicity of the medium, retarding the acceleration of growth. In the medium with 500 mg L^{-1} of ferulic acid, there was no bacterial growth, indicating that this is the level of toxicity of ferulic acid at which the bacteria could not detoxify the medium (Fig. 3).

Evaluation of FA degradation and conversion to 4-vinylguaicol

After the tolerance assay, the cultivation of bacteria in a medium with 300 mg L^{-1} of ferulic acid and 500 mg L^{-1} of glucose was carried out. Ninety-five percent of the ferulic acid was dissipated from the medium after 20 h of cultivation following an increase in the pH (6.0 to 6.8). The curves (Fig. 3) show synchronization among glucose and ferulic acid consumption but the biomass production reached the maximum between 8 and 12h of cultivation indicating the biomass continue to metabolizing the FA. The maximum accumulation of 4-vinylguaicol (76.7 mg L^{-1}) was reached after 32 h of cultivation, as well as the reduction of ferulic acid by 290 mg L^{-1} , a yield of 0.5 mmol L^{-1} of 4-vinylguaicol. Low concentrations of vanillin (2.31 mg L^{-1}), vanillic acid (3.29 mg L^{-1}), and catechol (2.15 mg L^{-1}) were detected (Fig. 4).

Conversion of ferulic acid from alkaline hydrolyzed sugar cane bagasse to 4-vinylguaicol

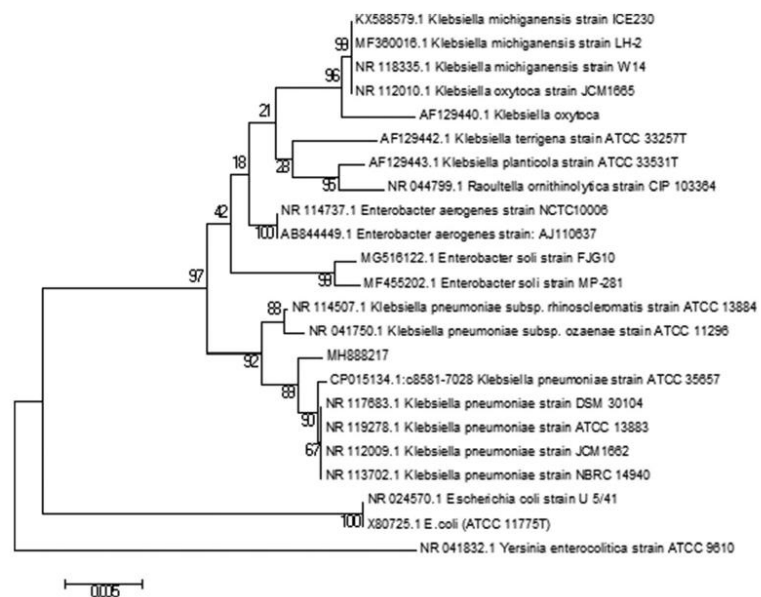
In the liquor obtained from the alkaline hydrolysis of sugar cane bagasse, there was no glucose neither xylose. The ferulic acid content was 310 mg L^{-1} , similar to that found by Salgado et al. [27]. Other phenolic compounds were not detected.

The *K. pneumoniae* TD 4.7 was able to convert 72.5% of the ferulic acid from the hydrolyzed bagasse after 24 h of cultivation. The growth occurred until 12 h of cultivation and the maximum conversion of the ferulic acid to 4-vinylguaicol peaked at 24 h with 208.1 mg L^{-1} (Fig. 5).

Evaluation of the presence of ferulic acid decarboxylase activity

The decarboxylase activity was mainly associated with the cell wall since it converted much of the substrate ferulic acid

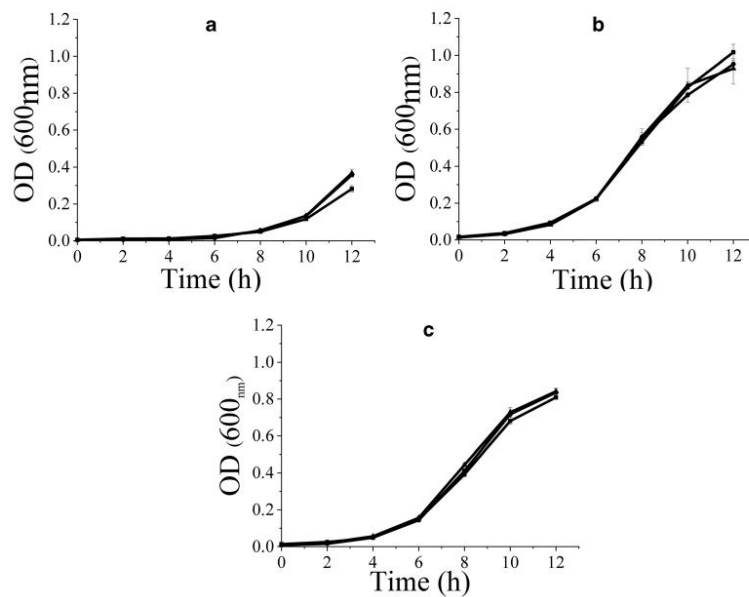
Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences demonstrating the position of strain TD 4.7 as *K. pneumoniae*



from the reaction medium in 15 min, followed by intracellular content. These data showed that bacteria did not secrete the enzyme (Fig. 6).

Higher activity was obtained in the fragmented wall sample, whose specific activity was 61.06 U mg^{-1} , followed by suspension of whole cell (54.85 U mg^{-1}) and intracellular cells extract

Fig. 2 Growth of *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 in media with different initial pH and incubated at different temperatures. **a** 25 °C, **b** 28 °C, **c** 30 °C. ▲=pH 5.5; ●=pH 6.0; ■=pH 6.5



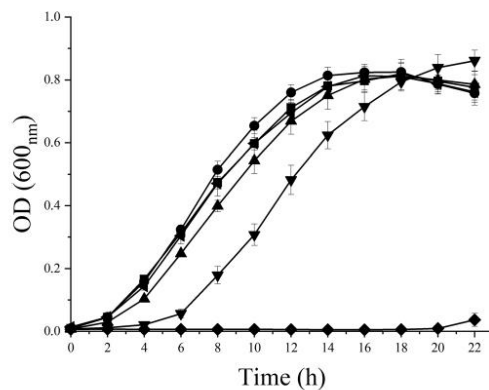


Fig. 3 Growth of *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 in media with different concentrations of ferulic acid, at 28 °C, pH 6.5. ▲=biotic control; ■=100 mg L⁻¹; ●=200 mg L⁻¹; ▲=300 mg L⁻¹; ▼=400 mg L⁻¹; ◆=500 mg L⁻¹

(44.21 U mg⁻¹). The protein concentration of the cell wall extract presented of 0.19 mg g⁻¹, culture medium of 0.01 mg mL⁻¹, and catholic material with protein concentration of 0.25 mg mL⁻¹.

Effect of pH and temperature on enzyme activity

The maximum enzyme activity was observed at pH 5.5. However, enzymatic activity decreased drastically in alkaline pH. The enzyme showed higher activity at 40 °C but no substantial difference in activity was observed from 30 to 45 °C. There was a complete loss of activity at temperatures above 60 °C (Fig. 7).

According to the stability curves, the enzyme was stable in temperatures from 20 to 45 °C, but was denatured in temperature above 50 °C. The ferulic acid decarboxylase was stable in the basic pH range, exhibiting almost 100% of the total activity between pH 5.5 and 9.0 (Fig. 7).

Effect of DTT and L-cysteine enzyme activity

The activity tests on DTT and L-cysteine showed that enzyme was not affected by these compounds, although there is

Fig. 4 Bacteria growth and profile of pH, consumption of glucose and ferulic acid (a), ●=OD, ■=pH, ◆=glucose, ▲=ferulic acid; and metabolites released during the cultivation (b), ◆=4-vinylguaiacol; ▼=vanillin, ▲=vanillic acid, ●=catechol

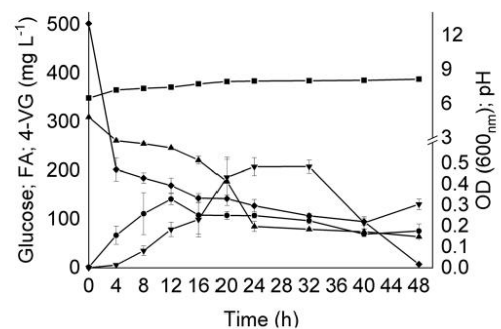
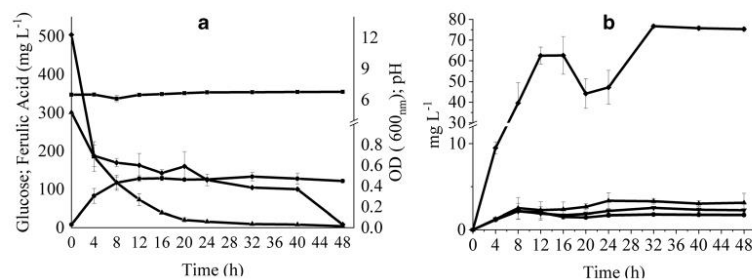


Fig. 5 Bacteria growth, consumption of glucose and ferulic acid, profile of pH, and generation of 4-vinylguaiacol released during the cultivation in alkaline hydrolyzed sugar cane bagasse; ●=OD, ■=pH, ◆=glucose, ▲=ferulic acid, ▼=4-vinylguaiacol

literature that demonstrates the importance of DTT mainly to increase the activity of the respective enzyme (Table 1).

Discussion

The bacteria *K. pneumoniae* TD 4.7 was able to grow in the presence of up to 400 mg L⁻¹ of ferulic acid but was inhibited by 500 mg L⁻¹. The same concentration was determined as inhibitory for the growth of *Bacillus cereus* and *P. fluorescens* and *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052, although a higher tolerance level was reported for *Butyrivibrio fibrisolvens* B834 whose growth was only inhibited by 1.94 g L⁻¹ of ferulic acid [28–30]. The proposed mechanism for bacterial inhibition by FA is related to ATP synthesis by inhibition in the oxidized products and consequent disruption of energy production [31, 32]. The promoting enzyme inhibition is possibly through a reaction with sulfhydryl groups or through nonspecific interactions of quinonic compounds with amino acids (reversible or irreversible reaction) [33]. The FA inhibition of biofilm formation has been proposed but it depends on the bacterial species [28, 32]. FA can reduce bacterial swimming motility, increase the surface charge value, and promote changes in the physicochemical surface properties of both

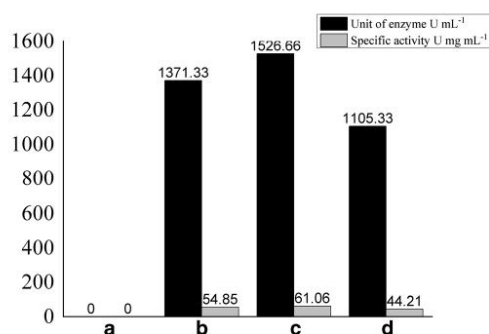


Fig. 6 Activities of ferulic acid decarboxylase in the culture medium. A extracellular enzyme activity, B cell wall-associated enzyme, C cell wall-associated enzyme (fragmented cell), and D intracellular enzyme activity

B. cereus and *P. fluorescens* [28]. The tolerance of *C. beijerinckii* strain M11 to FA involves the Cbei 4693 gene encoding a protein predicted to be a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent flavin mononucleotide (FMN) reductase (FMN + NADPH + H⁺ = FMNH₂ + NADP⁺). An alkyl hydroperoxide reductase subunit C (ahpC) encoded by Cbei 2134 and an alkyl hydroperoxide reductase subunit F (ahpF) encoded by Cbei 2135 were identified as two factors involved in FA tolerance [34]. According to Liu et al. [34], efflux systems and heat shock proteins have been expressed by bacteria in presence of FA.

However, the detoxication of the media through mechanisms of biodegradation and biotransformation of FA seem

Table 1 Effect of DTT and L-cysteine on activity of ferulic acid decarboxylase. The parameter 100% was assumed as the value obtained without the presence of the compounds

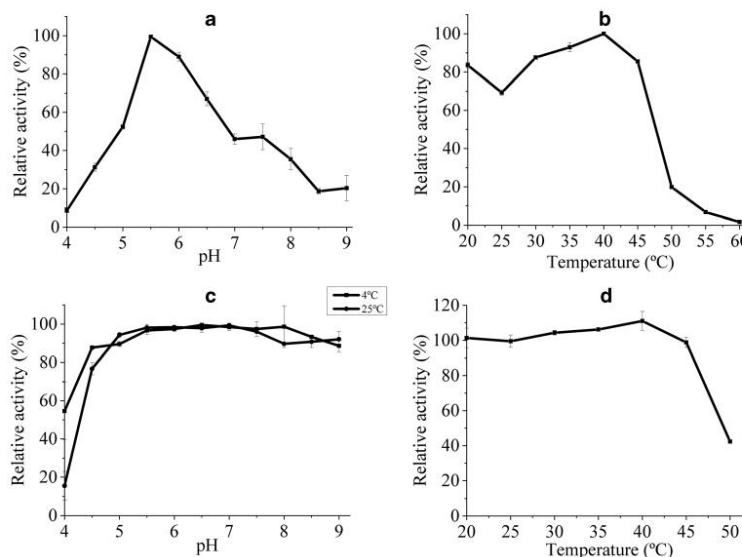
Compounds	Relative activity (%)			
	0 mM	0.2 mM	0.5 mM	1 mM
DTT ^a	98.23 ± 2.50	97.24 ± 1.75	97.19 ± 3.70	96.59 ± 2.17
L-Cysteine	98.87 ± 1.60	92.75 ± 7.16	93.51 ± 2.55	93.07 ± 0.77

^a 1,4-Dithiothreitol

to be an effective cause of tolerance. Several species within the Enterobacteriaceae family, such as *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*, decarboxylate p-coumaric acid and ferulic acid [35–38]. This decarboxylation reaction is non-oxidative and is catalyzed by the enzyme ferulic acid decarboxylase (EC 4.1.1.102) [39–41]. Vanillin can also be generated from ferulic acid by a two-step process, which involves a coenzyme A (CoA) ligase followed by cleavage of the side chain, a phenomenon observed in *Pseudomonas* spp. [8, 42]. This study showed that the FA was 100% dissipated from the culture in 48 h of bacteria cultivation and the 4-vinylguaiaacol appears after 4 h indicating the decarboxylation mechanisms.

According to several authors, the biotransformation of ferulic acid may follow different pathways depending on the type of microorganism involved. However, in the most common metabolic pathway, 4-vinylguaiaacol is the first product to be generated by the decarboxylation mechanism which is then converted to vanillin. The latter is subsequently oxidized to

Fig. 7 Effect of pH on activity (a) and stability (c) and of the temperature on activity (b) and stability (d) of ferulic acid decarboxylase. The parameter 100% was assumed as the highest value obtained among the experimental units



vanillic acid, followed by demethylation to protocatechuic acid and, finally, the formation of catechol [6, 7, 39, 41].

However, the data obtained in this study does not show the sequence of the appearance of the metabolites since after 4 h of culture of the bacterium, 4-vinylguaiacol, vanillin, and catechol had already been detected in the medium. It is clear that the bacterium rapidly biotransforms the ferulic acid as a process of detoxification of the medium. The preservation of the metabolites for 48 h in the culture medium and the stabilization of the biomass after 12 h without evidence of diauxic suggest that the ferulic acid derivatives were not used as a carbon source. The results corroborate the data of Borneman et al. [43], who demonstrate that, although cinamic acid had had a stimulatory effect on growth of ruminal bacteria, it did not support microbial growth in the absence of carbohydrates. According to Mathew et al. [6], phenolic monomers, when not used as a source of carbon, are transformed into cells by decarboxylation, in order to reduce levels of toxicity.

The activity of ferulic acid decarboxylase, associated with the cell wall of *K. pneumoniae* TD 4.7, seems to be a key point in these processes. According to Maeda et al. [10] and Degraasi et al. [44], studying ferulic acid decarboxylase from *Aspergillus luchensis* and *B. pumilus* PS213, respectively, the production of the enzyme is induced by the presence of ferulic acid in the culture medium. This implies that this decarboxylase function represents a step in the secondary metabolism that could have evolved in response to its toxicity [45]. It is also shown that because it is an acid-sensitive enzyme, it is not expressed in the extracellular medium due to pH changes that cause it to reduce its activity [10].

The ferulic acid decarboxylase from *K. pneumoniae* TD 4.7 presented properties similar to other bacterial enzyme like *B. pumilus* PS213 and *Bacillus* sp. BP-7 exhibited highest activity around pH 5.5 [44, 46]. The optimal temperature at 40 °C was similar described for Huang et al. [8], Maeda et al. [10], and Prim et al. [46].

Studies by Huang et al. [41] showed that the presence of DTT (0.2–1 mM) and L-cysteine (1 mM) causes an acceleration in the decarboxylation of ferulic acid from a recombinant enzyme of *Candida guilliermondii*; tests carried out with the decarboxylase of the ferulic acid of *K. pneumoniae* TD 4.7 demonstrated that this did not occur, emphasizing that possible structural differences between the enzymes of microorganisms of different genera may or may not be affected by reducing agents.

This non-oxidizing decarboxylation activity of aromatic acids is of interest for bioprocessing and metabolic engineering. The non-use of the derivatives as carbon source guarantees the accumulation in the medium and the yield of the biotransformation process. However, the various steps of the biotransformation may not be of interest, which leads to the search for the isolation of the enzyme that catalyzes the step of interest.

The hydrolysis of the sugarcane bagasse provides a concentration of ferulic acid compatible with the tolerability to FA and its bioconversion to 4-vinylguaiacol by the bacterium, without additional steps in the process. The high yield of 82% shows the efficiency of the enzyme decarboxylase and stimulates the research for a process that uses sugarcane bagasse for the production of 4-vinylguaiacol, a product of high-added value.

Although the bacterium has a mild pathogenic profile, the sequence of the enzyme gene for heterologous expression can be obtained since the preparation of the target product requires only one decarboxylation step.

Conclusion

The strain of *K. pneumoniae* TD 4.7 showed tolerance and growth in the presence of ferulic acid at a concentration of 300 mg L⁻¹, as well as the ability to bioconvert ferulic acid into 4-vinylguaiacol. An active ferulic acid decarboxylase enzyme was detected as a participant in this bioconversion step. The growth of the strain in alkaline hydrolyzate of sugarcane bagasse and the bioconversion of ferulic acid present in this material to 4-vinylguaiacol indicates another possible biotechnological use of this material.

Funding This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (grant numbers 1587465).

References

- Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK et al (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* (80-) 315(5813):804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- Chundawat SPS, Beckham GT, Himmel ME, Dale BE (2011) Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2(1):121–145. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205>
- Huang Z, Dostal L, Rosazza JP (1993) Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol.* 59(7):2244–2250. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395165>. Accessed 20 Sept 2017
- Barthelmebs L, Lecomte B, Davies C, Cavin JF (2000) Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator. *J Bacteriol.* 182(23):6724–6731. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6724-6731.2000>
- Cai Y, Agmon N, Choi WJ, Ubide A, Stracquadanio G, Caravelli K, Hao H, Bader JS, Boeke JD (2015) Intrinsic biocontainment: multiplex genome safeguards combine transcriptional and recombinational control of essential yeast genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(6):1803–1808. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424704112>
- Mathew S, Abraham TE, Sudheesh S (2007) Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol and vanillin metabolites by

- Debaryomyces hansenii. J Mol Catal B Enzym. 44(2):48–52. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.09.001>
7. Karmakar B, Vohra RM, Nandanwar H, Sharma P, Gupta KG, Sobti RC (2000) Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. J Biotechnol. 80(3):195–202. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00248-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00248-0)
 8. Huang Z, Dostal L, Rosazza JP (1994) Purification and characterization of a ferulic acid decarboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. J Bacteriol. 176(19):5912–5918. <https://doi.org/10.1128/jb.176.19.5912-5918.1994>
 9. Cavin JF, Dartois V, Diviès C (1998) Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol. 64(4):1466–1471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546183>. Accessed 24 July 2018
 10. Maeda M, Tokashiki M, Tokashiki M, Uechi K, Ito S, Taira T (2018) Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*. J Biosci Bioeng. 126(2):162–168. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.009>
 11. Mukai N, Masaki K, Fujii T, Iefuji H (2014) Single nucleotide polymorphisms of PADI and FDC1 show a positive relationship with ferulic acid decarboxylation ability among industrial yeasts used in alcoholic beverage production. J Biosci Bioeng. 118(1):50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.017>
 12. Carrasco JA, Lucena-Padrós H, Brenes M, Ruiz-Barba JL (2018) Expression of genes involved in metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus pentosus* and its relevance for table-olive fermentations. Food Microbiol. 76:382–389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.020>
 13. Fujiwara R, Noda S, Tanaka T, Kondo A (2016) Styrene production from a biomass-derived carbon source using a coculture system of phenylalanine ammonia lyase and phenylacrylic acid decarboxylase-expressing *Streptomyces lividans* transformants. J Biosci Bioeng. 122(6):730–735. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.05.005>
 14. Brown ME, Walker MC, Nakashige TG, Iavarone AT, Chang MCY (2011) Discovery and characterization of heme enzymes from unsequenced bacteria: application to microbial lignin degradation. J Am Chem Soc. 133(45):18006–18009. <https://doi.org/10.1021/ja203972q>
 15. Moretti MMS, Bocchini-Martins DA, Nunes CCC et al (2014) Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. Appl Energy. 122:189–195. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.02.020>
 16. Rosazza JPN, Huang Z, Dostal L, Voim T, Rousseau B (1995) Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. J Ind Microbiol. 15(6):472–479. <https://doi.org/10.1007/BF01570017>
 17. Egea TC, da Silva R, Boscolo M, Rigonato J, Monteiro DA, Grünig D, da Silva H, van der Wielen F, Helmus R, Parsons JR, Gomes E (2017) Diuron degradation by bacteria from soil of sugarcane crops. Heliyon. 3(12):e00471. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00471>
 18. Tanasupawat S, Thawai C, Yukphan P, Moonmangmee D, Itoh T, Adachi O, Yamada Y (2004) *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the .ALPHA.-Proteobacteria. J Gen Appl Microbiol. 50(3):159–167. <https://doi.org/10.2323/jgam.50.159>
 19. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 23(21):2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
 20. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 4(4):406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
 21. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 16(2):111–120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7463489>. Accessed 31 Oct 2018
 22. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 30(12):2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
 23. Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol. 62(3):293–300. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=386127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 26 Oct 2014
 24. Bushnell LD, Haas HF (1941) the utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J Bacteriol. 41(5):653–673. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=374727&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 11 Jan 2016
 25. Pereira Scarpa JC, Paganini Marques N, Alves Monteiro D et al (2019) Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. Ind Crops Prod 141:111795. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111795>
 26. Rodríguez-Delgado MA, Malovaná S, Pérez JP, Borges T, García Montelongo FJ (2001) Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. J Chromatogr A. 912(2):249–257. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00598-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00598-2)
 27. Salgado JM, Max B, Rodríguez-Solana R, Domínguez JM (2012) Purification of ferulic acid solubilized from agroindustrial wastes and further conversion into 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii* using solid state fermentation. Ind Crop Prod. 39:52–61. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.014>
 28. Lemos M, Borges A, Teodósio J, Araújo P, Mergulhão F, Melo L, Simões M (2014) The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. Int Biodeterior Biodegrad. 86:42–51. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.011>
 29. Lee S, Lee JH, Mitchell RJ (2015) Analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052's transcriptional response to ferulic acid and its application to enhance the strain tolerance. Biotechnol Biofuels. 8(1):68. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0252-9>
 30. Chesson A, Stewart CS, Wallace RJ (1982) Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. Appl Environ Microbiol. 44(3):597–603. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16346090>. Accessed 10 Oct 2017
 31. Simões M, Bennett RN, Rosa EAS (2009) Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. Nat Prod Rep. 26(6):746–757. <https://doi.org/10.1039/b821648g>
 32. Borges A, Saavedra MJ, Simões M (2012) The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. Biofouling. 28(7):755–767. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.706751>
 33. Bittner S (2006) When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. Amino Acids. 30(3):205–224. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0298-2>
 34. Liu J, Guo T, Shen X, Xu J, Wang J, Wang Y, Liu D, Niu H, Liang L, Ying H (2016) Engineering *Clostridium beijerinckii* with the Cbei_4693 gene knockout for enhanced ferulic acid tolerance. J Biotechnol. 229:53–57. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.052>
 35. Hashidoko Y, Urashima M, Yoshida T, Mizutani J (1993) Decarboxylative conversion of hydroxycinnamic acids by

- Klebsiella oxytoca and Erwinia uredovora, epiphytic bacteria of Polymnia sonchifolia leaf, possibly associated with formation of microflora on the damaged leaves. Biosci Biotechnol Biochem. 57(2):215–219. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.215>
36. Li X, Yang J, Li X, Gu W, Huang J, Zhang K-Q (2008) The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by Enterobacter sp. Px6-4 isolated from Vanilla root. Process Biochem. 43(10):1132–1137. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.006>
 37. Kumar N, Pruthi V (2014) Potential applications of ferulic acid from natural sources. Biotechnol Reports. 4:86–93. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>
 38. Hunter WJ, Manter DK, van der Lelie D (2012) Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by Enterobacter soli and E. aerogenes. Curr Microbiol. 65(6):752–757. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0222-4>
 39. Zago A, Degrossi G, Bruschi C V (1995) Cloning, sequencing, and expression in Escherichia coli of the Bacillus pumilus gene for ferulic acid decarboxylase. Vol 61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167759/pdf/614484.pdf>. Accessed 27 July 2018
 40. Donaghy JA, Kelly PF, McKay A (1999) Conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice. J Sci Food Agric. 79(3):453–456. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3<453::AID-JSFA284>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<453::AID-JSFA284>3.0.CO;2-H)
 41. Huang H-K, Tokashiki M, Maeno S, Onaga S, Taira T, Ito S (2012) Purification and properties of phenolic acid decarboxylase from Candida guilliermondii. J Ind Microbiol Biotechnol. 39(1):55–62. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0998-4>
 42. Overhage J, Priefert H, Steinbüchel A (1999) Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in Pseudomonas sp. Strain HR199. Appl Environ Microbiol. 65(11):4837–4847 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10543794>. Accessed 31 Oct 2018
 43. Borneman WS, Akin DE (1986) Vaneseltine2 WP, Russell RB. Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. Appl Environ Microbiol. 52(6):1331–1339 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239230/pdf/aem00135-0109.pdf>. Accessed 29 Sept 2017
 44. Degrossi G, Polverino De Laureto P, Bruschi CV (1995) Purification and characterization of ferulate and p-coumarate decarboxylase from Bacillus pumilus. Appl Environ Microbiol. 61(1):326–332 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7887611>. Accessed 27 July 2018
 45. Bhuiya MW, Lee SG, Jez JM, Yu O (2015) Structure and mechanism of ferulic acid decarboxylase (FDC1) from Saccharomyces cerevisiae. Appl Environ Microbiol. 81(12):4216–4223. <https://doi.org/10.1128/AEM.00762-15>
 46. Prim N, Pastor FJJ, Diaz P (2003) Biochemical studies on cloned Bacillus sp. BP-7 phenolic acid decarboxylase PadA. Appl Microbiol Biotechnol. 63(1):51–56. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1371-y>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

CAPÍTULO III

**Expressão heteróloga e caracterização da enzima ácido ferúlico
descarboxilase de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 em *Escherichia coli***

RESUMO

Derivados vinílicos comercialmente importantes podem ser produzidos por descarboxilação enzimática de ácidos fenólicos como o ácido ferúlico. A ácido ferúlico descarboxilase é uma enzima que atua na descarboxilação desse ácido formando 4-vinilguaiacol. Neste estudo, o gene que codifica a ácido ferúlico descarboxilase em *Klasiella pneumoniae* TD 4.7 foi isolado utilizando *primers* baseados nas sequências depositadas para este gênero, as quais demonstraram alto grau de conservação. O gene da ácido ferúlico descarboxilase foi identificado como um fragmento de 504 pb, codificando um polipeptídeo de 167 resíduos de aminoácidos. A sequência peptídica deduzida da ácido ferúlico descarboxilase de *K. pneumoniae* TD 4.7 mostrou uma identidade de sequência de 98% para descarboxilases de outras bactérias do mesmo gênero. O gene foi expresso com sucesso em *Escherichia coli* BL21(DE3), e a enzima recombinante foi purificada como uma proteína de 22 kDa e maior atividade em pH 5,5 0 e a 40°C. A ácido ferúlico descarboxilase purificada catalisou a descarboxilação do ácido ferúlico de forma eficiente, e a modulação negativa da atividade enzimática foi observada na presença de Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} e Cd^{+2} , bem como aumento de atividade de 20% na presença de Co^{+2} . Os valores de K_m e V_{max} foram estimados em 2,95 mM e 102,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para a enzima recombinante. A estrutura da enzima ácido ferúlico descarboxilase foi modelada usando os programas de predição estrutural *AlphaFold* *Multimer* e *Swissmodel*, com um RMSD de apenas 0,7 Å, demonstrando a ausência de cisteína e pontes dissulfeto no homodímero, a presença de grandes quantidades de lisina, e os resíduos envolvidos no ciclo catalítico Tyr27, Glu134 e Asn23. Os resultados obtidos neste capítulo permitiram o prosseguimento dos estudos e produção de 4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico obtido de biomassa lignocelulósica.

Palavras chave: Ácidos fenólicos, Ácido ferúlico descarboxilase, 4-vivnilguaiacol, bagaço de cana de açúcar, *Klebsiella pneumoniae*

RESUMEN

Los derivados vinílicos comercialmente importantes se pueden producir mediante descarboxilación enzimática de ácidos fenólicos como el ácido ferúlico. La descarboxilasa del ácido ferúlico es una enzima que actúa en la descarboxilación de este ácido formando 4-vinilguayacol. En este estudio, el gen que codifica la descarboxilasa del ácido ferúlico en *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 se aisló utilizando cebadores basados en las secuencias depositadas para este género, que mostró un alto grado de conservación. El gen de la descarboxilasa del ácido ferúlico se identificó como un fragmento de 504 pb que codifica un polipéptido de 167 residuos de aminoácidos. La secuencia peptídica deducida de la descarboxilasa del ácido ferúlico de *K. pneumoniae* TD 4.7 mostró una identidad de secuencia del 98% con las descarboxilasas de otras bacterias del mismo género. El gen se expresó con éxito en *Escherichia coli* BL21 (DE3) y la enzima recombinante se purificó como una proteína de 22 kDa y la actividad más alta a pH 5,50 y 40°C. La descarboxilasa de ácido ferúlico purificado catalizó la descarboxilación del ácido ferúlico de manera eficiente y se observó una modulación negativa de la actividad enzimática en presencia de Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} y Cd^{+2} , así como un aumento de la actividad del 20% en presencia de Co^{+2} . Los valores de K_m y V_{max} se estimaron en 2,95 mM y 102,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para la enzima recombinante. La estructura de la enzima ácido ferúlico descarboxilasa se predijo utilizando los programas de predicción estructural *AlphaFold Multimer* y *Swissmodel*, con un RMSD de solo 0,7 Å, demostrando la ausencia de enlaces de cisteína y disulfuro en el homodímero, la presencia de grandes cantidades de lisina, y residuos involucrados en el ciclo catalítico Tyr27, Glu134 y Asn23. Los resultados obtenidos en este capítulo permitieron continuar con los estudios y la producción de 4-vinilguayacol a partir de ácido ferúlico obtenido a partir de biomasa lignocelulósica.

Palabras clave: Ácidos fenólicos, ácido ferúlico descarboxilasa, 4-vinilguayacol, bagazo de caña de azúcar, *Klebsiella pneumoniae*

INTRODUÇÃO

Compostos aromatizantes produzidos por via biotecnológica são legalmente classificados como aditivos naturais e, por isso, apresentam-se mais atrativos do ponto de vista econômico em comparação aos flavorizantes sintéticos (BETTIO, 2020).

Os insumos produzidos através da aplicação de bioprocessos possuem o *status* legal de produto natural e seguro, e são também alternativas ecologicamente sustentáveis, pois podem ser obtidos a partir da utilização de resíduos e subprodutos gerados pelo processamento de alimentos como bagaços, cascas e outros (BERGER, 2015). De acordo com o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes, os aromatizantes podem ser classificados em: natural, artificial ou artificial idêntico ao natural (BRASIL, 2007). Enzimas quando aplicadas a produção destes *flavours*, apresentam uma possibilidade baseada em menores impactos no meio ambiente e maior valorização de produto final devido a processos mais brandos e limpos.

O 4-vinilguaiaicol, com um aroma picante de cravo é um composto usado como aromatizante na produção de fragrâncias que são componentes de uma ampla gama de produtos na indústria de alimentos e cosmética (LI; LONG; DING, 2020; SUN et al., 2018). Também é utilizado como conservante de alimentos, agente antiproliferativo reduzindo carcinogênese, como antioxidante e como matéria-prima para a fabricação de produtos como a vanilina (GÜNTHER et al., 2021; HUNTER; MANTER; VAN DER LELIE, 2012; LI; LONG; DING, 2019; LUO et al., 2021; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 2010; TAŃSKA; MIKOŁAJCZAK; KONOPKA, 2018). Este composto possui um limiar de detecção extremamente baixo, em torno de 0,30 ppm, o que resulta em um aroma fenólico bastante persistente mesmo em pequenas concentrações nos referidos produtos (MEILGAARD, 1975).

Sua síntese por descarboxilação biológica de ácidos cinâmicos, como o ácido ferúlico, pode ser realizada por microrganismos ou por suas enzimas isoladamente. Diferentes microrganismos, principalmente bactérias, são capazes de transformar ácido ferúlico em 4-vinilguaiaicol, por reação de descarboxilação não oxidativa feita pela enzima ácido ferúlico descarboxilase (EC 4.1.1.102) (DEGRASSI; POLVERINO DE LAURETO; BRUSCHI, 1995; HUANG et al., 2012).

A enzima ácido ferúlico descarboxilase já foi relatada em bactérias, leveduras, fungos filamentosos e plantas, e são divididas em três subclasses: enzimas dependentes de prFMN, dependentes de metal divalente e enzimas independentes de cofatores (DETERING; MUNDY; BERGER, 2020a). Descarboxilases principalmente bacterianas e vegetais, requerem um grupo hidroxila obrigatório na posição *para* do substrato e por isso se tornam mais limitadas quanto ao substrato e não são capazes de produzir estirenos com características cancerígenas, o que faz com que sejam fortes candidatas a bioprocessos para produção de 4-vinilguaiaacol.

Este trabalho apresenta o isolamento, caracterização bioquímica, cinética e estrutural de uma ácido ferúlico descarboxilase heteróloga de origem em *Klebsiella pneumoniae*, com o objetivo de apresentar uma alternativa segura e limpa para a produção de 4-vinilguaiaacol a partir de ácido ferúlico.

MATERIAL E MÉTODOS

Expressão heteróloga

Linhagens de microrganismos e plasmídeos

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 foi isolada de solo de cana-de-açúcar e sua identificação foi realizada em trabalhos anteriores por métodos moleculares (DOS SANTOS et al., 2021; EGEA et al., 2017). As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho para clonagem e expressão da enzima ácido ferúlico descarboxilase de *K. pneumoniae* TD4.7 no sistema procarioto estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Linhagens de *E. coli* utilizadas no trabalho.

Linhagem	Descrição	Origem
<i>E. coli</i> DH5α	Cepa de clonagem	Gibco BRL
<i>E. coli</i> Origami (DE3) pLysS	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA P_{vuII} phoR$ $araD139 ahpC galE galk$ $rpsL F' [lac^+ lacI^q pro] (DE3) gor522::Tn10$ $trxB pLysS (Cam^R, Str^R, Tet^R)$	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta-gami 2(DE3) 2pLysS	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA P_{vuII} phoR$ $araD139 ahpC galE galk rpsL (DE3)$ $F' [lac^+ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB$ $pLysSRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R)$	Novagen
<i>E. coli</i> Artic Express (DE3)	<i>E. coli</i> B $F^- ompT hsdS(r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^R$ $gal \lambda(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent^R]$	Agilent Technologies
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	$F^- ompT hsdS_B (r_B^-, m_B^-) gal dcm (DE3)$	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	$F^- ompT hsdS_B (r_B^-, m_B^-) gal dcm rne131 (DE3)$	Novagen

Quanto aos vetores, para a etapa de clonagem foi utilizado o pJET1.2/blunt (Thermo Scientific), que é um vetor de seleção com uma inserção letal que permite a recuperação eficiente de produtos de PCR com ponta cega, e para etapa de expressão o vetor pET28a(+) (Novagen), descritos na Tabela 2 e Figuras 1 e 2.

Tabela 2: Vetores utilizados em *E. coli*

Vetor	Tipo	Tamanho	Característica	Origem
pJET 1.2/blunt	Vetor de clonagem	2974 pb	Resistencia a Ampicilina	Thermo Scientific
pET28a(+)	Vetor de expressão	5369 pb	Resistencia a Canamicina	Novagen

Figura 1: Diagrama esquemático do vetor pJET1.2/blunt (Thermo Scientific)

Created with SnapGene®

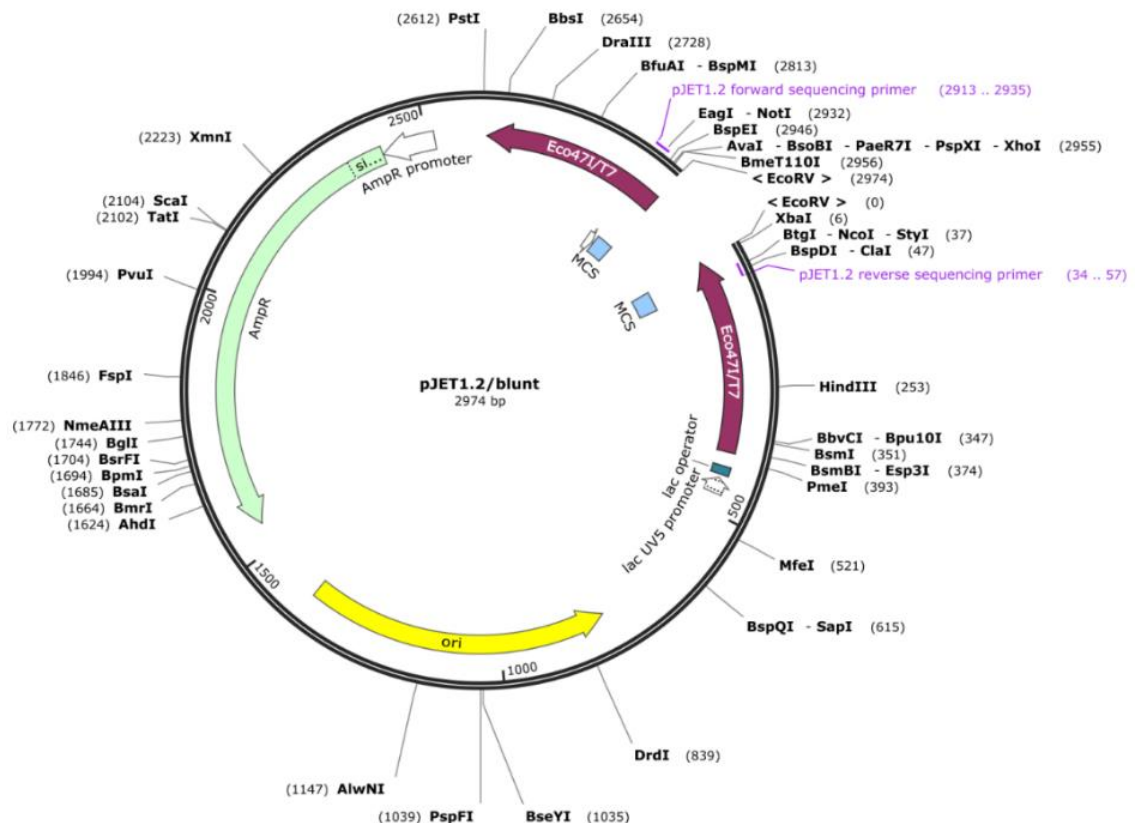
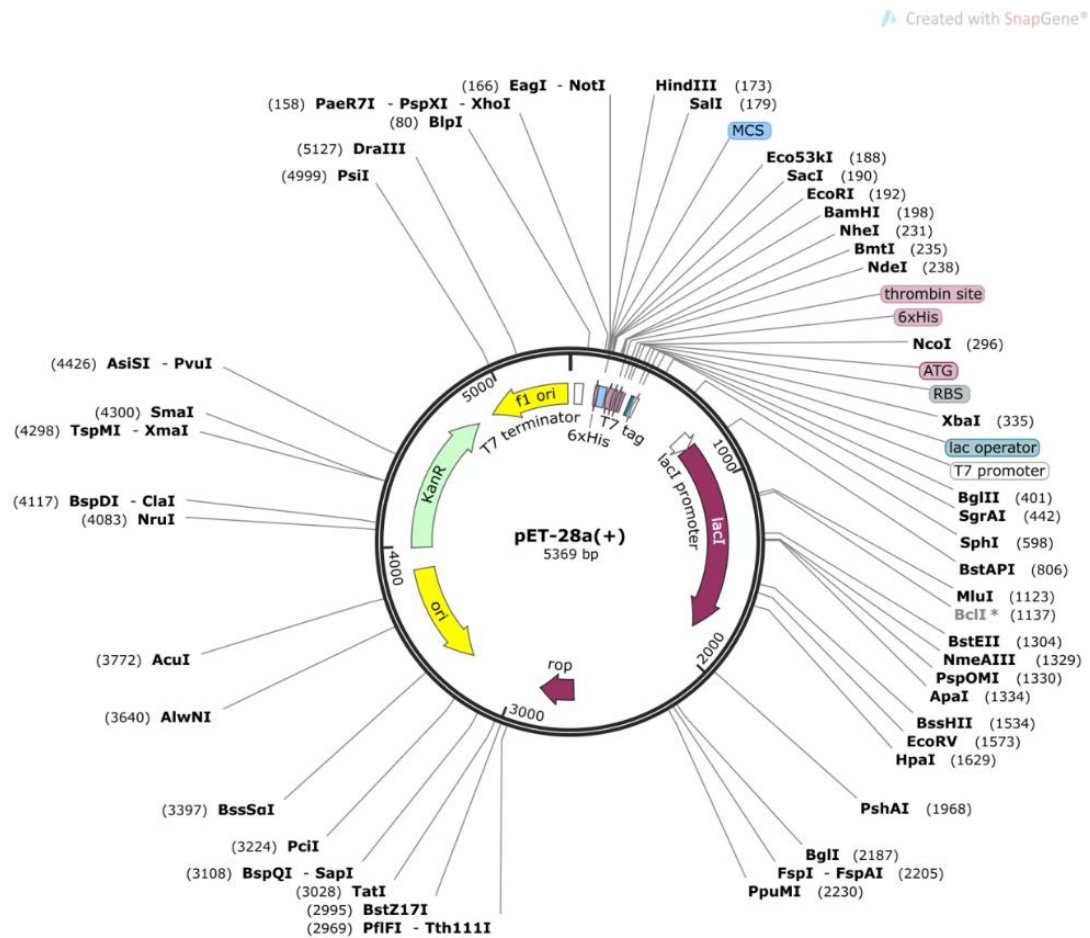


Figura 2: Diagrama esquemático do vetor pET28a(+) (Novagen).



Extração de DNA total e obtenção do gene da ácido ferúlico descarboxilase

Para extração do DNA total de *K. pneumoniae* TD 4.7 foi feito um cultivo por 12 horas em meio nutritivo LB, a 28°C e sob agitação de 220 rpm. O DNA total foi extraído com o uso do kit “EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit” (Trans Gen Biotech), de acordo com as recomendações dos fabricantes. O DNA total foi analisado em gel de agarose 1% (p/v) por eletroforese contendo brometo de etídeo (0,5 µg/µL). E quantificado em aparelho NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer Thermo Fischer Scientific (Wilmington, Delaware, Estados Unidos da América) de acordo com as instruções do fabricante.

Os oligonucleotídeos usados para a PCR foram baseados na sequência codificadora da ácido ferúlico descarboxilase do gênero *Klebsiella* depositadas no NCBI. De acordo com o alinhamento (Anexo 1), os 11 primeiros pares de base são

idênticos, exceto pelos BIDMC31, *K. oxytoca* e *quasipneumoniae*, que possui um ATG a mais no início, com isso foram desenhados três oligonucleotídeos iniciadores, sendo 2 *primers* para o início (*forward*), e 1 para o final (*reverse*), uma vez que os últimos 21 pares de base são idênticos para todos.

Foram incluídos sítios de restrição para as enzimas *NheI* e *BamHI*, adequados nas regiões inicial e final do gene para a clonagem direcional da ORF (Tabela 3).

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene da ácido ferúlico descarboxilase

Identificação	Sequência 5'-3'	Tm
<i>Pad1_For</i>	ATAGCTAGCATGAGCACTTT	54,0
	YG	
<i>Pad2_For</i>	ATAGCTAGCATGATGAGCAC	54,2
	TTT	
<i>Pad_Rev</i>	ATAGGATCCTTACAAATTTGC	55,3
	AGGG	

A amplificação do gene de interesse foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) com a enzima *Pfu* DNA Polimerase (Trans Gen Biotech), uma vez que esta enzima apresenta a menor taxa de erro conhecida nas amplificações de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de PCR foram constituídas de 1X tampão de reação, 0,2 mM de dNTP, 0,2 mM de oligonucleotídeos *forward* e de *reverse*, e 1,25 unidade de *Pfu* DNA polimerase. As condições utilizadas foram 95°C por 2 minutos, 95°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 1 minutos (35 ciclos). A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose a 1% (p/v) por eletroforese contendo brometo de etídeo (0,5 mg/μL). A imagem do gel foi foto documentada em Gel Doc 100 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos da América) através do software QuantityOne R (Bio- Rad).

O primer *foward* que apresentou melhor amplificação foi selecionado para posterior reação de PCR nas mesmas condições citadas acima e quantificado em aparelho NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer Thermo Fischer Scientific (Wilmington, Delaware, Estados Unidos da América) de acordo com as instruções do fabricante.

Construção do sistema de expressão para *E.coli*

A fração amplificada proveniente da reação de PCR que corresponde ao gene da ácido ferúlico descarboxilase, foi ligada ao vetor de clonagem *pJET 1.2/blunt* (Thermo Scientific), em reação de ligação conforme indicações do fabricante. Posteriormente transformado em células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Gibco BRL), cultivada durante 12 horas em meio LB-ágar (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) contendo ampicilina (100 μ g/mL) para isolamento dos clones positivos e identificação da presença do gene de ácido ferúlico por PCR de colônia nas condições citadas acima.

Tais clones foram isolados e cultivados em meio líquido LB (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) contendo ampicilina (100 μ g/mL), para isolamento do plasmídeo contendo o gene de interesse através da preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep), para tal etapa foi utilizado o kit “*EasyPure Plasmid MiniPrep*” (Trans Gen Biotech) e posteriormente foram quantificadas em aparelho NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer Thermo Fischer Scientific (Wilmington, Delaware, Estados Unidos da América) de acordo com as instruções do fabricante.

O inserto da ácido ferúlico descarboxilase que foi ligado ao *pJET 1.2/blunt* (Thermo Scientific), para processo de propagação. Posteriormente foi excisado utilizando as enzimas *NheI* e *BamHI* (Thermo Scientific), em digestão dupla; e em seguida separado em gel de agarose e a fração de interesse foi purificada com o kit “*EasyPure Quick Gel Extraction*”, segundo instruções do fabricante.

As ligações entre inserto e o vetor de expressão pET28a(+) foram promovidas utilizando a *T4 ligase* (Thermo Scientific), sob as condições do fabricante. O plasmídeo de expressão gerado foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5 α , numa reação composta por 2 μ L do DNA ligado (construção pET28a+ORF) e

50 µL de célula competente. A transformação foi feita por choque térmico e, para isso, a reação foi colocada por 10 minutos em banho de gelo e logo em seguida, submetida a 42°C, por 90 s, sendo recolocada imediatamente no banho de gelo por mais 2 minutos. Após a transformação, foram adicionados 200 µL de meio LB (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) para propiciar o crescimento das células transformadas. As células foram submetidas a agitação de 230 rpm a 37°C por 90 minutos. Após incubação das células transformadas, alíquotas de 100 µL da cultura foram distribuídas em placas de *petri* contendo o meio LB sólido com 50 µg/mL de canamicina. As células transformadas foram incubadas a 37°C por 16 h. A coleta dos clones foi realizada com alças plásticas estéreis, selecionando um total de 5 colônias de forma aleatória, que foram submetidas a PCR para confirmação da presença do inserto.

Sequenciamento e análise da sequência

O sequenciamento foi procedido no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), sediado na UNESP – Câmpus de Jaboticabal, onde para tal foi utilizado um sequenciador automático de primeira geração (Método de Sanger) com 96 capilares, ABI 3730 xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, CA). As corridas foram feitas em capilares de 50 cm utilizando o polímero POP7, o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e controle interno com DNA de pGEM™-3Zf(+) fornecidos pela Applied Biosystems.

A sequência do gene foi comparada com sequências disponíveis no GenBank usando os programas BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A sequência de aminoácidos foi analisada com ferramentas do EXPASY (<http://expasy.org/>). Os sítios de restrição presentes na sequência de nucleotídeos foram identificados através do NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Padronização da expressão da proteína recombinante

Foram utilizados diferentes *backgrounds* genéticos conforme Tabela 1.1, com a finalidade de verificar o mais adequado para a produção de proteínas na fase

solúvel.

Com intuito de expressar a proteína alvo previamente transformada em célula competente de *E. coli*, uma colônia foi inoculada em 50 mL de meio LB contendo canamicina a 50 µg/mL, e deixada sob agitação constante a 37 °C até atingir a fase logarítmica de crescimento, com D.O_{600nm} entre 0,4 e 0,6. Para o teste de indução a 37 °C a cultura foi mantida a mesma temperatura, onde foi induzida com isopropil-β-D- thiogalactopiranoside (IPTG) nas concentrações de 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM e 0.5 mM, foram coletadas amostras nos tempos de indução de 0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas. Para os testes de indução a 20 °C a respectiva cultura foi transferida esta temperatura no momento da indução.

Posteriormente, todas as amostras foram centrifugadas a 8000 *xg* por 10 minutos a 4 °C, a fim de analisar a expressão da enzima heteróloga em comparação às proteínas totais. A extração foi iniciada pela ressuspensão do material em tampão MES 0,1 M, pH 6,5, sob a concentração de 0,2 g mL⁻¹; e após fracionamento as amostras foram lisadas no aparelho BransonSonifier 250 (Branson, Connecticut, EUA) e centrifugadas por 20 minutos, a 4°C, 17000 *xg*, para separação de extratos solúveis e insolúveis.

A confirmação da expressão das proteínas foi realizada através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% - SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). A corrida foi realizada com o tampão Tris-Glicina [50 mM de Tris-HCl; 150 mM de Glicina e 0,1% de SDS (p/v)]. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue [40% de metanol (v/v); 10% de ácido acético glacial (v/v) e Coomassie R-250 a 0,1% (p/v)] e descorado em solução contendo 10% de ácido acético (v/v) e 10% de etanol (v/v).

A fração resultante de cada etapa, desde a extração até a purificação foi analisada por SDS-PAGE conforme descrito anteriormente. Uma vez determinada a melhor condição de expressão, ensaios de expressão em volumes maiores foram realizados.

Produção da enzima heteróloga em *E. coli* BL21(DE3) e purificação

O pré-inóculo foi preparado a partir do inóculo de uma colônia isolada em 25 mL de meio LB contendo canamicina a 50 µg/mL, e deixada sob agitação constante

a 37 °C até atingir a fase exponencial de crescimento, com D.O_{600nm} entre 0,4 e 0,6. Deste cultivo, 2 mL foram utilizados para inocular 1 L de meio LB contendo canamicina a 50 µg/mL, que permaneceu sob constante agitação e incubação a 37 °C até que a mesma atingisse fase logarítmica de crescimento para indução com isopropil-β-D- thiogalactopiranoside (IPTG) na concentração de 0.2 mM e mantida a 20 °C sob agitação constante por 24 horas.

Posteriormente, o volume total foi centrifugado a 8000 xg por 10 minutos a 4 °C, a fim de obter o *pellet* que foi pesado e ressuspendido em tampão fostato de sódio 0,05 M, pH 6,0, para a concentração de 0,2 g mL⁻¹ e submetido lise por sonda de ultrassom BransonSonifier 250 (Branson, Connecticut, EUA) em 4 ciclos de 30 segundos a com intervalos de 15 segundos e centrifugadas por 20 minutos, a 4°C, 17000 g, para separação da fração enzimática solúvel.

A confirmação da expressão das proteínas foi realizada através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% - SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). A corrida foi realizada com o tampão Tris-Glicina [50 mM de Tris-HCl; 150 mM de Glicina e 0,1% de SDS (p/v)]. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue [40% de metanol (v/v); 10% de ácido acético glacial (v/v) e Coomassie R-250 a 0,1% (p/v)] e descorado em solução contendo 10% de ácido acético (v/v) e 10% de etanol (v/v).

O sobrenadante então foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando uma coluna HisTrap HP™ 1mL, previamente equilibrada com tampão A (50 mM fosfato de sódio, pH 6,0, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 % Glicerol) em sistema FLPC AKTA (GE Healthcare®). A amostra, anteriormente ao momento de injeção, foi filtrada em filtro de membrana 0,22 µm. As proteínas recombinantes foram então eluídas em um gradiente linear com o mesmo tampão, porém adicionado de 500 mM de imidazol (tampão B). O gradiente de tampão B foi realizado de maneira que no início do processo de purificação utilizou-se 0% de tampão B e ao final 100%.

Determinação da atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase

A atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase foi determinada através de ensaios conduzidos em triplicata, adicionando-se 0,05 mL dos extratos (10% v/v)

a 0,45 mL de uma solução composta de 0,3 g L⁻¹ de ácido ferúlico. A mistura reacional foi incubada a temperatura de 30°C, durante 2 minutos. A atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase foi medida pela redução de ácido ferúlico e calculada pela formação de 4-vinilguaiacol. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produção de 1 µmol de 4-vinilguaiacol por minuto.

Caracterização bioquímica da enzima heteróloga

Tempo de atividade enzimática

O tempo de reação foi testado em um ensaio genérico, em banho de aquecimento com rotação a 30°C, em pH 6,0, nos seguintes tempos de reação: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.

Efeitos do pH e da temperatura na atividade da enzima

O efeito do pH na atividade de ácido ferúlico descarboxilase foi testado em banho de aquecimento com rotação a 30°C na faixa de pH de 4,0 a 9,0, tempo de reação de 5 minutos. Os tampões utilizados foram: Acetato (4,0 a 5,0), MES (5,5 a 6,5), HEPES (7,0 a 8,0) e BICINE (8,5 a 9,0).

O efeito da temperatura na atividade de ácido ferúlico descarboxilase foi avaliado com reações enzimáticas ocorrendo em temperaturas de 20 a 60 °C (com variação de 5 °C), em pH 5,5, tempo de reação de 5 minutos.

Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima quando em ausência de substrato

O efeito do pH sobre a estabilidade da enzima, quando em ausência de substrato, foi determinado pela diluição da solução enzimática bruta em solução tampão a 0,1 M (1:2): Acetato (4,0 a 5,0), MES (5,5 a 6,5), HEPES (7,0 a 8,0) e BICINE (8,5 a 9,0). A mistura foi incubada em dois lotes a 4 °C e 25 °C por 24 horas.

Após esse período, alíquotas das diferentes soluções de pH foram analisadas quanto à atividade de descarboxilação. O efeito do pH na atividade de ácido ferúlico descarboxilase foi avaliado com reações enzimáticas de 5 minutos, ocorrendo em temperaturas de 40 °C, pH 5,5.

Para a determinação termoestabilidade da enzima, o extrato enzimático foi incubado em banho de aquecimento em temperaturas entre 20 a 50 °C (com variação de 5 °C). Os períodos de incubação foram de 60, 360 e 720 minutos. Em seguida foi determinada a atividade com reações enzimáticas de 5 minutos, ocorrendo em temperaturas de 40 °C, pH 5,5.

Efeito de agentes químicos sobre a atividade da enzima

A influência de cátions foi avaliada realizando-se a medida de atividade enzimática em presença de: MgCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2 , FeCl_3 , CuCl_2 , CdCl_2 , HgCl_2 , AgNO_3 , CoCl_2 , LiCl , BaCl , ZnSO_4 , NiSO_4 , em concentrações equivalentes a 1 mM dos sais na mistura reacional.

Os efeitos de DTT (ditiotreitól) e L-cisteína na atividade da enzima também foram avaliados, ambos em concentrações de 0,2 mM, 0,5 mM e 1 mM.

Caracterização dos parâmetros cinéticos e especificidade da ácido ferúlico descarboxilase

Os parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , foram também determinados com tampão MES 0,2M (pH 5,5) contendo 100 – 1000 mg L^{-1} de ácido ferúlico à 40°C por 90 segundos. Os valores de K_m e V_{max} foram determinados utilizando regressão não linear de Michaelis-Menten.

Estimativa da massa molar da enzima

O gel poliacrilamida (SDS–PAGE) 10% (w/v) foi usado para detecção das bandas de proteína a partir da solução de enzimas de acordo com o método proposto por Laemmli (1970). A massa molar das isoformas, dentro das condições desnaturantes foi determinada usando proteínas padrões e as bandas de proteínas foram reveladas com solução de prata.

Determinação de proteínas totais

A estimativa da concentração de proteína foi testada pelo método de BRADFORD (1976), usando solução de albumina bovina como padrão em concentrações de 4,2 a 208,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e leitura de absorbância a 595 nm.

Modelagem computacional

Com a finalidade de investigar o mecanismo de ação da enzima e sua interação com os ligantes as serem testados no experimento foram criados modelos usando os programas de predição estrutural AlphaFold Multimer (https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=_sztQyz29DIC) e o programa Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Simulações de dinâmica molecular (DM) foram rodadas visando compreender o impacto de cátions na atividade da enzima. Para esse fim, a proteína foi colocada numa caixa de simulação octaédrica cujas faces foram posicionadas a uma distância mínima de 10 Å da superfície da proteína. Moléculas de água OPC foram adicionadas à caixa e íons foram adicionados até uma concentração de 0.15 M. No sistema empregado como controle negativo foram adicionados 15 íons de Na^+ e 8 de Cl^- , e, em um segundo de estudo, foram adicionados 15 íons de Hg^{2+} e 23 de Cl^- . A proteína foi parametrizada com o campo de força *ff19SB* e para os íons, foram selecionados os parâmetros de Li/Merz que reproduzem as energias livres de hidratação, distâncias íon-oxigênio e número de coordenação da primeira camada

de hidratação. O programa *tLeap* do Amber22 foi empregado para estes fins (Case et al.; 2022). A partir dos sistemas, foram rodadas simulações de DM de 400 ns no ensemble canônico e T=300 K após realizar os passos necessários de minimização de energia, aquecimento e equilíbrio da pressão, conforme explicado em detalhe em trabalhos anteriores (Hernandez Gonzalez et al.; 2017). Durante as simulações foi monitorada a presença de íons próximos ao sítio ativo usando o comando *nativecontacts* de *cpptraj* (Case et al.; 2022).

Métodos analíticos para análises de ácido ferúlico e 4-vinilguaiacol

Para acompanhar as variações da concentração do ácido ferúlico e do 4-vinilguaiacol foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Cada amostra foi centrifugada a $15000 \times g$ por 15 minutos, a 10 °C e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm, e 20 µL foram injetados em cromatógrafo Perkin Elmer modelo Flexar, com bomba binária, amostrador automático, forno de coluna e um detector UV/VIS. A coluna usada foi uma C18 Acclaim™ 120 Dionex (4.6 x 250 mm), mantida a temperatura de 25 °C. A separação cromatográfica foi realizada utilizando como fase móvel metanol:ácido acético:água (10:2:88) como solvente A e ácido metanol:água:ácido acético (90:2:8) como solvente B (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

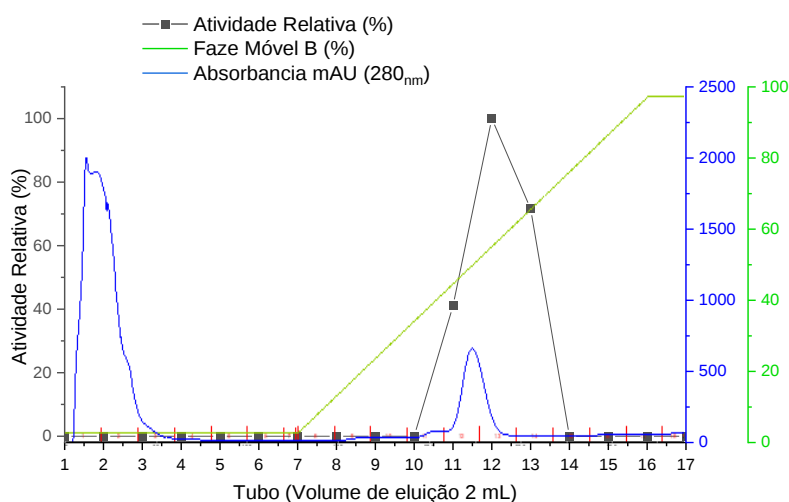
Produção da enzima heteróloga em *E. coli* BL21(DE3) e purificação

Os resultados obtidos durante o processo de clonagem e expressão estão demonstrados no Anexo 2.

Após seleção da cepa e das condições de expressão, foi realizado um ensaio para produção da enzima em maior escala, procedido com cultivo da cepa *E. coli* BL21(DE3), portadora do plasmídeo pET28a(+)_AFDKP. O período de incubação após a indução com 0,2 mM de IPTG foi de 24 horas a 20°C.

A biomassa celular obtida após este período foi submetida a processo de lise, conforme metodologia descrita, e o lisado intracelular resultante deste procedimento foi posteriormente purificado por cromatografia em coluna de afinidade HisTrap™ de 1 mL (GE Healthcare), como demonstrado na Figura 3. O rendimento da purificação foi de 236 µg mL⁻¹ de proteína.

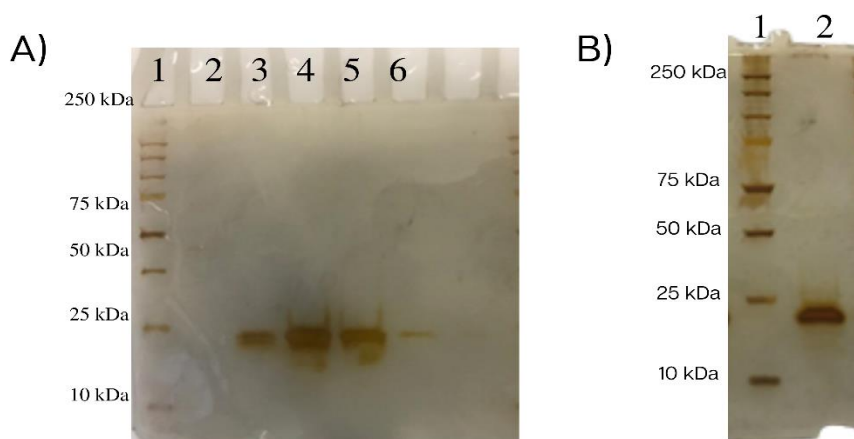
Figura 3: Cromatografia de purificação HisTrap™, onde tampão A (10 mM Imidazol) e B (500 mM Imidazol). Teste de atividade enzimática, o parâmetro 100% foi assumido como o maior valor de 4-vinilguaiacol obtido entre as unidades experimentais que foi 279,7 mg L⁻¹ de 4-vinilguaiacol (reação composta por 50 µL de extrato enzimático e 450 µL de uma solução de 0,3 g L⁻¹ de ácido ferúlico).



Na Figura 3 é possível observar que a proteína recombinante começa a ser removida da coluna em torno de 45% de fase móvel B, correspondendo a uma concentração de aproximadamente 250 mM de imidazol, com maior incidência de absorvância nos tubos 12 e 13, quando da coleta das alíquotas. Em sua totalidade, as alíquotas coletadas durante o processo de purificação foram submetidas a teste de atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase, os resultados destas reações estão demonstrados na mesma figura.

O material coletado foi submetido a análise em gel para verificação da qualidade das amostras purificadas, como demonstrado na Figura 4A. Após a mistura das alíquotas que continham a proteína recombinante purificada, foi realizada nova análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE para verificação do material e prosseguimento com a caracterização da enzima recombinante (Figura 4B).

Figura 4: A) Análise da purificação de enzima recombinante ácido ferúlico descarboxilase, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, sendo 1- Marcador de massa molar; 2- Amostra do tubo 10; 3- Amostra do tubo 11; 4- Amostra do tubo 12; 5- Amostra do tubo 13; 6 – Amostra do tubo 14 e 7 – Amostra do tubo 15 da cromatografia de purificação, e; B) Avaliação da pureza da enzima ácido ferúlico descarboxilase recombinante em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, sendo 1- Marcador de massa molar e 2- Mix das amostras que continham a proteína recombinante.

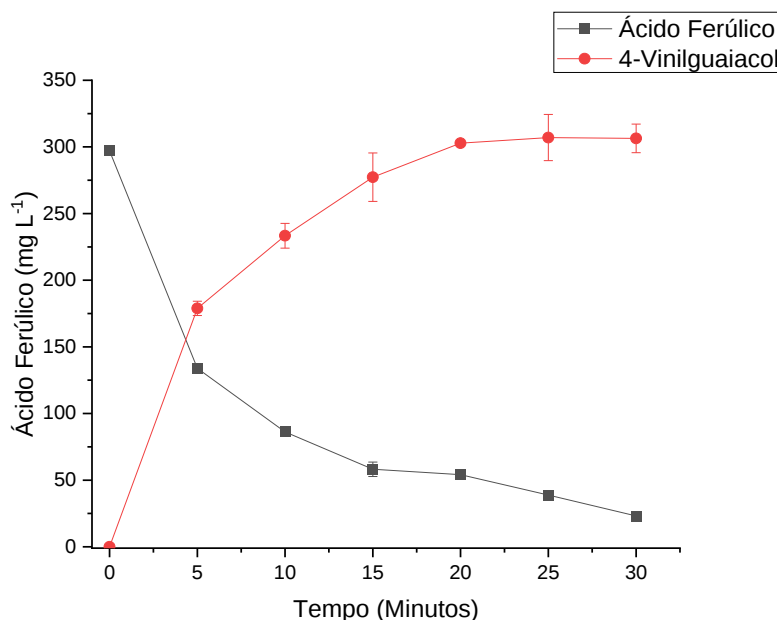


Caracterização bioquímica da enzima recombinante ácido ferúlico descarboxilase

Tempo de reação enzimática

Para o início da caracterização bioquímica do extrato purificado da enzima ácido ferúlico descarboxilase, foi procedido o teste de tempo de reação para determinação do melhor tempo de reação, dentro das condições de ensaio. O teste foi realizado em banho de aquecimento com rotação a 40°C, em pH 5,5, nos seguintes tempos de reação: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.

Figura 5: Avaliação do tempo reacional para a enzima recombinante ácido ferúlico descarboxilase nas condições de reação pré-determinadas, reação composta por 50 μL de extrato enzimático (enzima 59 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 450 μL de uma solução de 0,3 g L^{-1} de ácido ferúlico.



O resultado do teste indicou que o melhor tempo de reação para as atividades enzimáticas foi de 5 minutos (Figura 5), levando-se em consideração as concentrações de substrato e produto a serem quantificados para determinação da

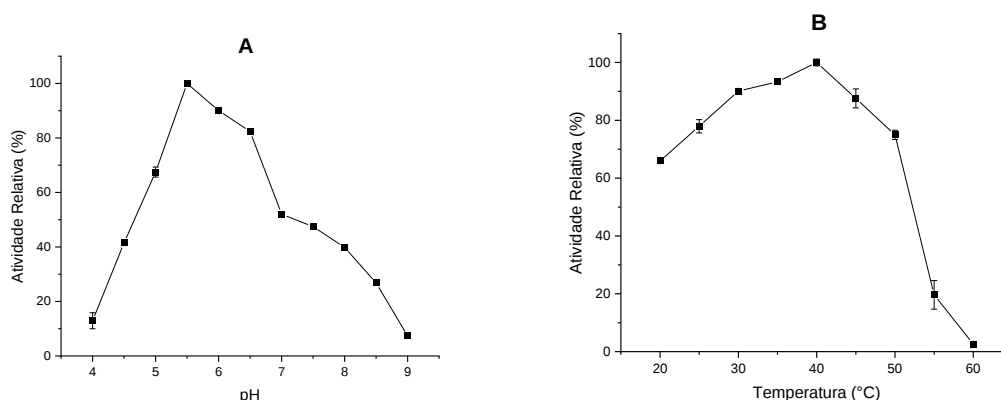
interferência de fatores externos nos passos seguintes do procedimento de caracterização bioquímica.

Efeitos do pH e da temperatura na atividade da enzima heteróloga purificada

O efeito do pH na atividade de ácido ferúlico descarboxilase foi testado em banho de aquecimento com rotação a 40°C na faixa de pH de 4,0 a 9,0, tempo de reação de 5 minutos. Os tampões utilizados foram: acetato (4,0 a 5,0), mes (5,5 a 6,5), hepes (7,0 a 8,0) e bicine (8,5 a 9,0).

O resultado da análise indicou que a enzima é ativa num amplo intervalo de pH, e em pH 5,5 obteve-se o máximo de atividade enzimática como demonstrado na Figura 6A. Tais resultados corroboram os testes realizados com a enzima produzida por sua cepa nativa, e testada em extrato bruto conforme o apresentado no Capítulo 1.

Figura 6: Efeito do pH (A) e temperatura (B) na atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase. O parâmetro 100% foi assumido como o maior valor de 4-vinilguaiacol obtido entre as unidades experimentais, sendo respectivamente 263,76 mg L⁻¹ e 287,89 mg L⁻¹. Reação composta por 50 µL de extrato enzimático (enzima 59 µg mL⁻¹) e 450 µL de uma solução de 0,3 g L⁻¹ de ácido ferúlico.



O efeito da temperatura na atividade da enzima recombinante ácido ferúlico descarboxilase foi avaliado com reações enzimáticas ocorrendo em temperaturas de 20 a 60 °C (com variação de 5°C), em pH 5,5, tempo de reação de 5 minutos. Os resultados indicaram que a enzima é ativa numa ampla faixa de temperatura,

apresentando atividade ótima em 40°C (Figura 6B), indicando permanência das características conforme o obtido em extrato bruto de produção com a cepa nativa (DOS SANTOS et al., 2021).

Pelos resultados apresentados, as características específicas com relação às condições de pH e temperatura ideais de reação, a enzima recombinante manteve as mesmas observadas para a atividade na forma nativa, demonstrando preservação de suas características na ocorrência do processo de clonagem e expressão heteróloga. Conforme o exposto por Cavin e colaboradores (1998), este tipo de estabilidade na permanência de características para as enzimas descarboxilases de ácido fenólicos, deve ser levado em consideração para processos biotecnológicos, uma vez que é comum as mesmas apresentarem alterações após o processo de clonagem e expressão.

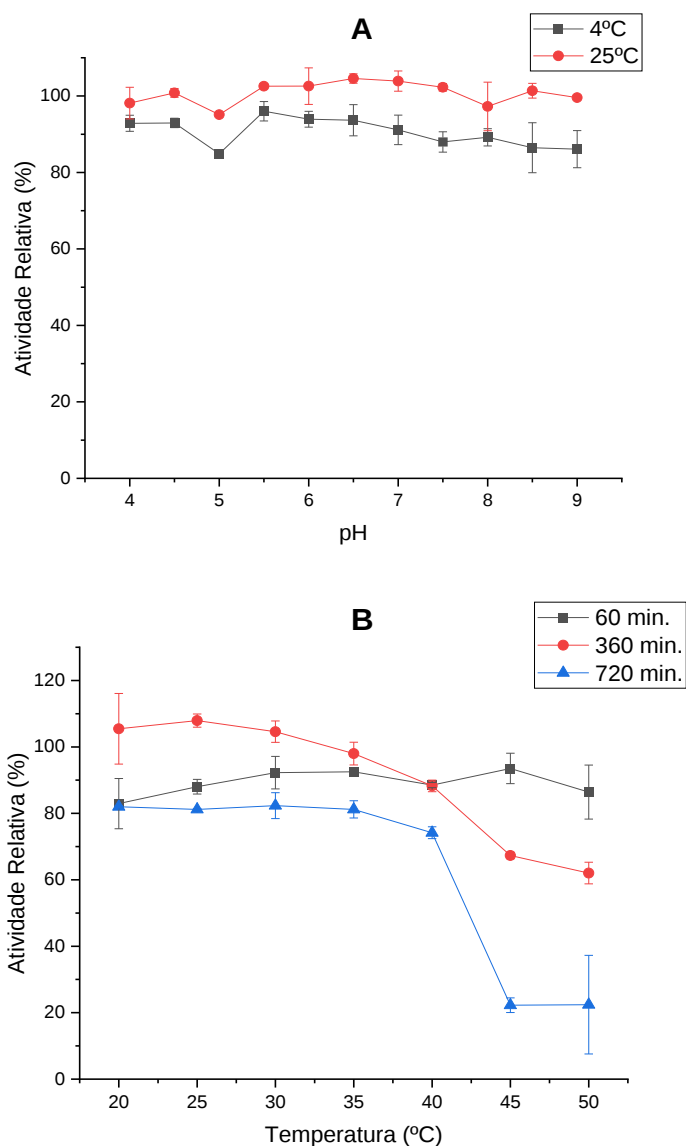
Efeitos do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima purificada

Devido as condições industriais de temperatura e pH serem um grande desafio para utilização de biocatalizadores, foram feitos testes para avaliar a estabilidade da enzima em diferentes temperaturas e pH. O efeito do pH sobre a estabilidade da enzima, quando em ausência de substrato, foi determinado pela diluição do extrato enzimático em solução tampão a 0,1 M (1:2): acetato (4,0 a 5,0), mes (5,5 a 6,5), hepes (7,0 a 8,0) e bicine (8,5 a 9,0). A mistura foi mantida sob incubação nas temperaturas 4°C e 25°C durante 24 horas. E posteriormente foi submetida a reação enzimática realizada em banho de aquecimento com rotação a 40°C, em pH 5,5, tempo de 5 minutos.

Os resultados obtidos revelaram baixa perda de atividade no armazenamento durante um período de 24 horas sob as temperaturas de 4 e 25°C. A enzima apresenta uma pequena redução de sua capacidade catalítica na faixa de pH de 4 a 9, mantendo aproximadamente 88% de atividade relativa quando incubada sob 4°C e 99% quando incubada a 25°C (Figura 7A). Conforme demonstrado por Sheldon e colaboradores (2005), é importante observar durante caracterização prévia de extrato enzimático purificado as características da estabilidade dos mesmos, uma vez que serão necessários processos de incubação e empacotamento em diferentes

momentos da construção dos agregados reticulados enzimáticos nos processos de imobilização enzimática para aplicações biotecnológicas.

Figura 7: Efeito da variação do pH (A) e temperatura (B) na estabilidade da enzima ácido ferúlico descarboxilase em ausência de substrato. O parâmetro 100% foi assumido como uma alíquota que não foi submetida ao processo de incubação, formando respectivamente 284,98 mg L⁻¹ e 287,29 mg L⁻¹ de 4-vinilguaiaicol. Reação composta por 50 µL de extrato enzimático (enzima 59 µg mL⁻¹) e 450 µL de uma solução de 0,3 g L⁻¹ de ácido ferúlico.



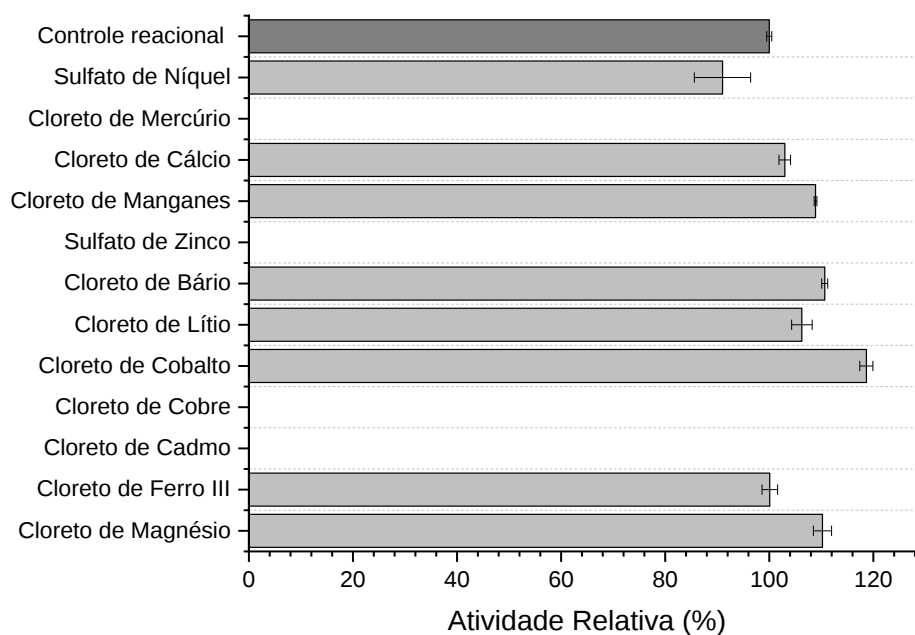
O efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima, quando em ausência de substrato, foi determinado pela incubação dos extratos em diferentes temperaturas (20-50°C), durante diferentes períodos de tempo (60, 360 e 720 minutos). E posteriormente foi submetida a reação enzimática realizada em banho de aquecimento com rotação a 40°C, em pH 5,5, tempo de 5 minutos.

Os resultados aqui obtidos demonstram que a enzima recombinante manteve aproximadamente 80% de sua atividade relativa, mesmo durante 720 minutos de incubação a 40°C (Figura 7B), estas características permitem propor que tal extrato enzimático apresentará bons índices de atividade catalítica durante ciclos contínuos de produção do composto de interesse. Os autores Gu et al. (2011a) e Detering et al. (2020a) também relatam a estabilidade da enzima em uma ampla faixa de temperatura (25 a 50°C), porem os resultados apresentados respectivamente para *Enterobacter* sp. Px6-4 e *Schizophyllum commune* são referentes a tempos de incubação de 60 minutos.

Efeito de cátions sobre a atividade da enzima

Os cátions podem interagir com aminoácidos em diferentes porções da proteína e no sitio catalítico, o que consequentemente pode causar modulação negativa ou positiva sobre a atividade enzimática. A influência de íons metálicos foi avaliada realizando-se a medida de atividade enzimática em presença de MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, FeCl₃, CuCl₂, CdCl₂, HgCl₂, AgNO₃, Cl₂Co, LiCl, BaCl, ZnSO₄, NiSO₄, em concentrações equivalentes a 1 mM dos sais na mistura reacional.

Figura 8: Efeito da presença de cátions metálicos na atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase. O parâmetro 100% foi assumido como uma alíquota que não foi submetida a presença dos sais, formando 262,70 mg L⁻¹ de 4-vinilguaiacol. Reação composta por 50 µL de extrato enzimático (enzima 59 µg mL⁻¹) e 450 µL de uma solução de 0,3 g L⁻¹ de ácido ferúlico.



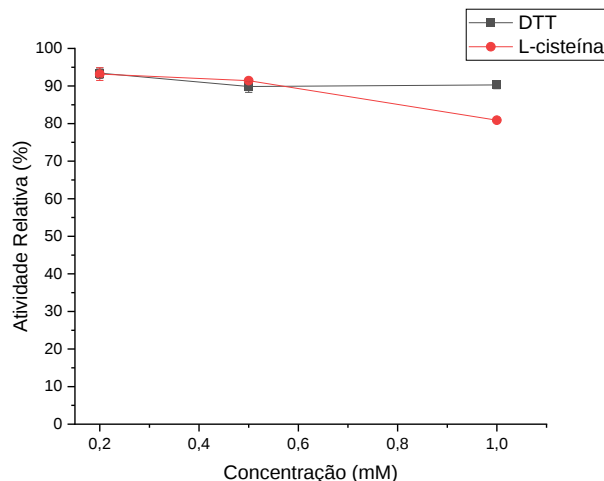
Como demonstrado na Figura 8, os efeitos de Mn⁺², Ba⁺² e Co⁺² foram de ativação da enzima recombinante, com destaque para Co⁺² que aumentou em aproximadamente 20% a atividade enzimática.

Por outro lado, Hg⁺², Zn⁺², Cu⁺² e Cd⁺² extinguiram por completo a atividade enzimática. Conforme demonstrado para uma ácido ferúlico descarboxilase de *Enterobacter sp.* expressa heterologicamente em *E. coli*, é característico que Hg⁺² e Cu⁺² promovam acentuada inibição da atividade destas enzimas reduzindo cerca de 99% da atividade enzimática (GU et al., 2011b), semelhante ao demonstrado para a descarboxilase de ácido ferúlico de *P. fluorescens* (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1994). Durante estudos de caracterização de uma ácido ferúlico descarboxilase de *B. pumillus*, Degrassi e colaboradores (1995), também demonstraram que a atividade de catalítica era inibida na presença de íons de cobre e que de íons de

zinco e ferro a mesma era drasticamente reduzida. Estes resultados são discutidos mais profundamente na etapa de estudos computacionais.

Os efeitos de DTT (ditiotreitól) e L-cisteína na atividade da enzima também foram avaliados, ambos em concentrações de 0,2 mM, 0,5 mM e 1 mM. Foi possível observar que 1 mM de DTT reduziu em 10% a capacidade catalítica da enzima recombinante, e a mesma concentração de L-cisteína reduziu aproximadamente 20% da atividade enzimática (Figura 9). Estes resultados, juntamente com a caracterização do extrato bruto produzido pela cepa nativa, demonstram que o apresentado por Huang e colaboradores (2012) não pode ser aplicado a todas enzimas da família de descarboxilases de ácido ferúlico.

Figura 9: Efeito da presença de DTT e L-cisteína na atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase. O parâmetro 100% foi assumido como uma alíquota que não foi submetida a presença dos compostos, formando 279,91 mg L⁻¹ de 4-vinilguaiacol. Reação composta por 50 µL de extrato enzimático (enzima 59 µg mL⁻¹) e 450 µL de uma solução de 0,3 g L⁻¹ de ácido ferúlico.

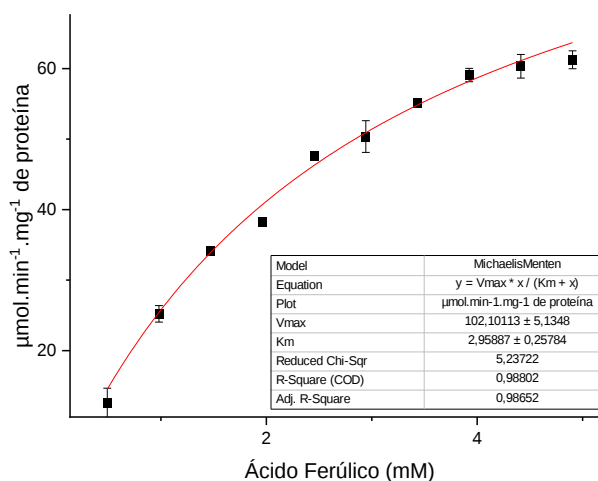


Parâmetros cinéticos e especificidade da ácido ferúlico descarboxilase

Os valores de K_m e V_{max} da enzima recombinante ácido ferúlico descarboxilase expressa em *E. coli* foram determinados utilizando ácido ferúlico como substrato entre 100-1000 mg L⁻¹. Os valores de K_m e V_{max} foram estimados

em 2,95 mM e 102,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para a enzima recombinante, como demonstrado na Figura 9.

Figura 9: Estudo de cinética enzimática.



Os dados apresentados na Figura 9 confirmam uma enzima de alta eficiência catalítica, com relação aos dados encontrados nas atividades enzimáticas dessa enzima nativa de outros microrganismos procariotos, expressa de forma heteróloga como no caso de Rodrigues e colaboradores (2008), que descreveram tal enzima proveniente de *Lactobacillus plantarum* com K_m de 0,08 mM e $V_{\max}$ 0,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ quando da atividade enzimática sobre ácido ferúlico. Bem como Degraassi e colaboradores (1995), durante estudos e caracterização de uma ácido ferúlico descarboxilase de *B. pumillus*, encontraram valores para K_m e $V_{\max}$, sendo 1.03 mM e 0,19 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ respectivamente.

Modelagem computacional

Modelos estruturais da enzima ácido ferúlico descarboxilase

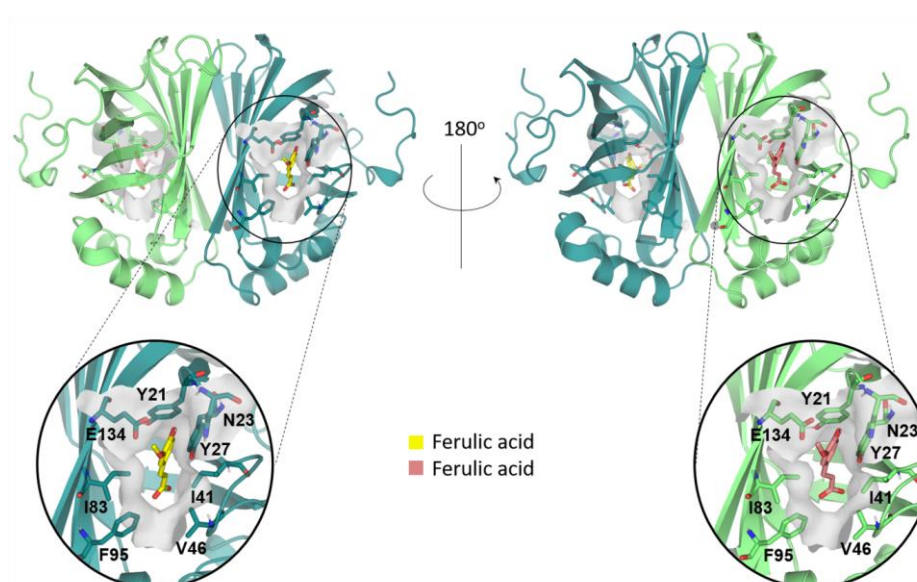
Neste estudo, o gene que codifica a ácido ferúlico descarboxilase em *K. pneumoniae* TD 4.7 foi isolado e identificado como um fragmento de 504 pb, codificando um polipeptídeo de 167 resíduos de aminoácidos. A sequência peptídica deduzida da ácido ferulico descarboxilase de *K. pneumoniae* TD 4.7 mostrou uma

identidade de sequência de 98% para descarboxilases de outras bactérias do mesmo gênero.

Com o intuito de entender o mecanismo de ação da enzima, estudos foram realizados com a sequência polipeptídica obtida a partir do gene sequenciado e nos ensaios foram criados modelos utilizando os programas de predição estrutural *AlphaFold Multimer* e *Swissmodel*. Os modelos gerados são apresentados no trabalho desenvolvido por Navarrete (2023), e os resultados demonstram ausência de pontes dissulfeto, corroborando a não presença de efeitos de DTT (ditiotretol) e L-cisteína sobre a capacidade catalítica da enzima, assim os resultados relativos ao aumento da promiscuidade enzimática na presença destes compostos não pode ser aplicado a todas enzimas da família (Huang et al.;2012).

Na Figura 10 é representado em *sticks* os resíduos catalíticos determinados a partir das proteínas da família com estruturas conhecidas, como descrito por Gu e colaboradores (2011) o sítio catalítico representado como um tambor de fundo semi-aberto que catalisa reações por meio de um mecanismo de “abre-fecha”, com abertura induzida por análogos do substrato (ROCHA, 2021).

Figura 10: Representação estrutural do sítio catalítico da AFD, em *sticks* os resíduos catalíticos e o substrato.



Fonte: autor.

A partir do modelo inicial gerado por homologia da estrutura PDB 3nx2 de Gu e colaboradores (2011a), foi demonstrado o complexo enzima substrato, onde o

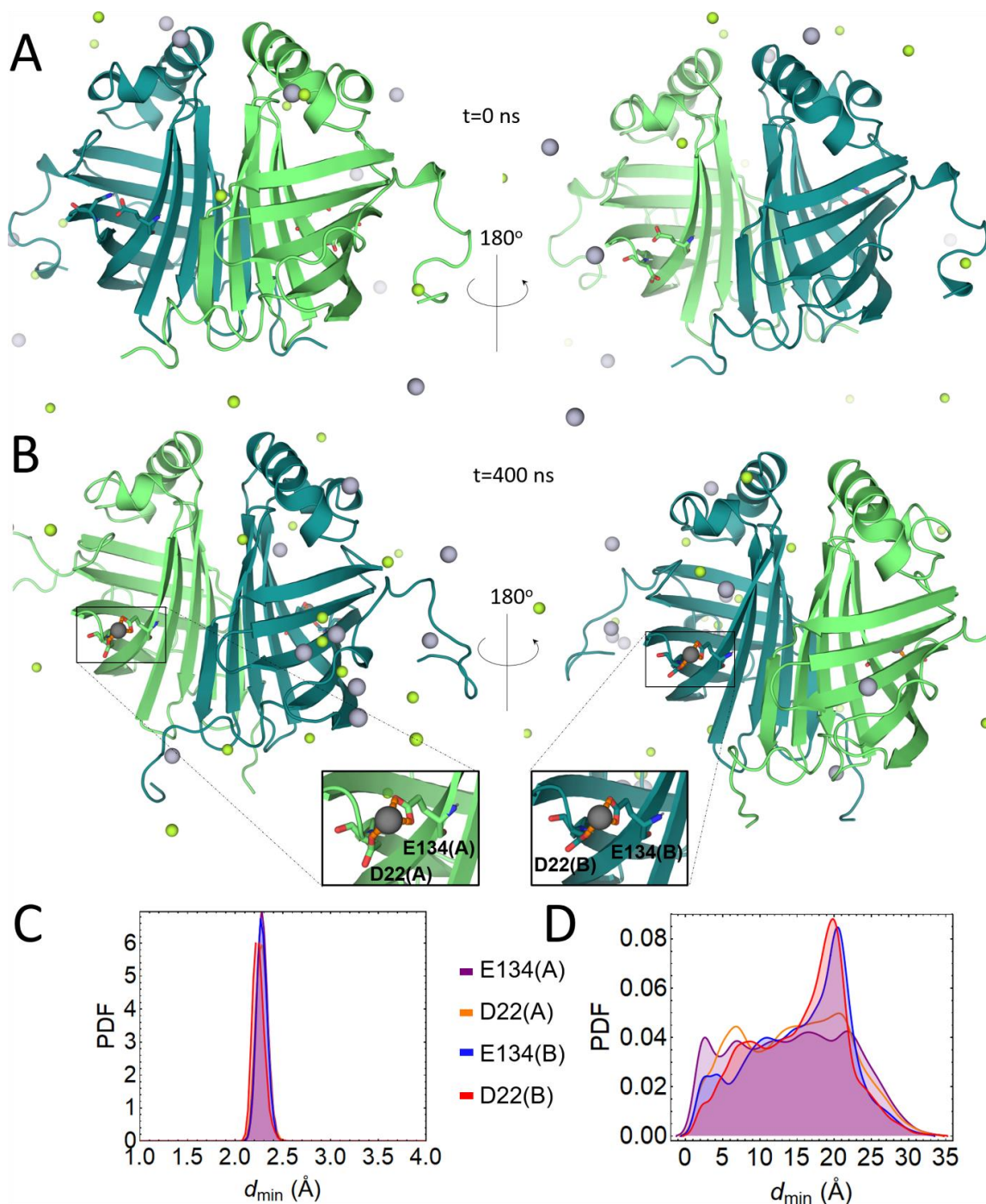
ácido ferúlico aparece em amarelo e laranja (Figura 10). Neste trabalho, bem como proposto por Gu e colaboradores (2011a), foram obtidos os mesmos resíduos envolvidos no ciclo catalítico sendo que os aminoácidos Trp25 e Tyr27 são necessários para a entrada e orientação adequada do substrato, enquanto Glu134 e Asn23 participam da transferência de prótons. Gu e colaboradores (2011a) através de análises de estrutura cristalina demonstram que Tyr27, Glu134 e Asn23 devem ser tidos como resíduos principais relacionados à ligação do substrato, onde Tyr27 e Glu134 ligaram diretamente os grupos carboxila e hidroxila do substrato por meio de ligações de hidrogênio e Asn23 ligou indiretamente ao grupo hidroxila do substrato na presença de uma molécula de água.

Os resultados relativos à influência de cátions metálicos na atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase nos ensaios realizados em bancada foram apresentados na Figura 8, demonstrando que enquanto os efeitos de Mn^{+2} , Ba^{+2} e Co^{+2} foram de ativação da enzima recombinante, os efeitos de Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} e Cd^{+2} extinguiram por completo a atividade enzimática. Tais resultados de inativação já haviam sido obtidos para esta mesma enzima proveniente de diferentes microrganismos como *Enterobacter sp.* expressa heterologicamente em *E. coli*, *P. fluorescens* e *B. pumillus* (DEGRASSI; POLVERINO DE LAURETO; BRUSCHI, 1995; GU et al., 2011b; HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1994; ZAGO; DEGRASSI; BRUSCHI, 1995).

Entretanto, neste trabalho foi possível realizar investigações baseados em dinâmicas moleculares computacionais com a finalidade de compreender os detalhes do prejuízo causado pela presença destes cátions metálicos, e os resultados relativos aos ensaios com Hg^{+2} , estão apresentados na Figura 11.

Este ensaio computacional ocorreu em duas etapas, a primeira etapa corresponde aos itens discriminados como A e B, onde A representa o início da atividade (0 nano segundos), na presença de íons Hg^{+2} (cinza) e Cl^- (verde) na caixa de solvatação antes de rodar a simulação de dinâmica molecular; e B representa o tempo final da atividade (após 400 nano segundos). Já a segunda etapa do ensaio computacional corresponde aos itens discriminados como C e D, é relativa à distribuição de distância mínima entre os oxigênios carboxílicos dos resíduos da proteína envolvidos na interação com íons Hg^{+2} e um ensaio controle apenas na presença de Na^+ ; respectivamente.

Figura 11: Dinâmica molecular computacional da enzima ácido ferúlico descarboxilase na presença de íons Hg^{+2} .



Fonte: autor.

Durante os ensaios de dinâmica molecular, demonstrada esquematicamente em A e B, é possível observar que no tempo inicial os íons Hg^{+2} em cinza na caixa

de solvatação não estão em interação com a proteína, contudo quando decorridos 400 nano segundos é visível que os íons Hg^{+2} interagem diretamente com E134 e D32. O resíduo E134 é importante para a ligação e catálise do ácido ferúlico como foi demonstrado na Figura 10.

Afim de validar o comportamento observado nos itens A e B da Figura 11, foi realizado um ensaio controle com resultados quantitativos apresentados nos itens C e D, demonstrando os valores de distribuição de distância mínima entre os oxigênios carboxílicos dos resíduos D22 e E134 de cada cadeia. É possível observar no item C, correspondente à dinâmica molecular na presença de 15 íons Hg^{+2} na caixa de solvatação, que a distribuição da distância entres os íons Hg^{+2} e os oxigênios carboxílicos de D22 e E134 é de 2,0 a 2,5 Å ao longo do ensaio de 400 nanosegundos, demonstrando ligação direta entre estes resíduos e os respectivos íons. Nos resultados apresentados no item D, ou seja, na presença de 15 íons Na^{+} é possível observar um comportamento contrário em que as distâncias entre os oxigênios carboxílicos de D22 e E134 são maiores correspondendo a 0 e 35,0 Å ao longo do ensaio de 400 nanosegundos, demonstrando que não há uma ligação contínua entre os resíduos e os íons Na^{+} .

Os resultados relativos aos ensaios computacionais na presença de íons Hg^{+2} , são parciais, além disso os mesmos ensaios serão realizados com os íons Zn^{+2} , Cu^{+2} e Cd^{+2} , uma vez que estes também extinguiram por completo a atividade enzimática durante a caracterização bioquímica da enzima.

CONCLUSÃO

A ácido ferúlico descarboxilase pôde ser clonada e expressa em *E. coli* com relativa facilidade e manteve as características originais da enzima nativa, ou seja, pH ótimo 5,5 e temperatura ótima de 40°C.

A enzima apresenta baixa perda de atividade nos testes de estabilidade em diferentes faixas de pH, onde após 24 horas sob temperatura de 25°C e faixa de pH de 4 a 9, manteve aproximadamente 99% de sua capacidade catalítica. Bem como após 720 minutos de incubação a 40°C e pH 5,5, mantendo aproximadamente 80% de sua capacidade catalítica.

As análises da sequência do gene da ácido ferúlico descarboxilase demonstrou um alto grau de conservação para as bactérias do gênero *Klebsiella* (identidade de sequência de 98%).

Os estudos computacionais sobre a estrutura da enzima mostraram ausência de cisteína e pontes dissulfeto, o que explica os resultados obtidos nos ensaios com DTT, justificando que o aumento de promiscuidade da enzima na presença deste composto não pode ser aplicado a todas as enzimas descarboxilases de ácido ferúlico.

Foram demonstrados os resíduos envolvidos no ciclo catalítico, sendo os aminoácidos Trp25 e Tyr27 necessários para a entrada e orientação adequada do substrato, e Glu134 e Asn23 participam da transferência de prótons.

Os ensaios computacionais demonstraram que a presença de íons Hg^{+2} interagem direta e continuamente com E134 e D22, inviabilizando a atividade enzimática.

REFERENCIAS

- BAQUEIRO-PEÑA, I. et al. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4721–4724, jun. 2010.
- BERGER, R. G. **Biotechnology as a source of natural volatile flavours** *Current Opinion in Food Science* Elsevier Ltd, , 1 fev. 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007 - Ministério da Saúde.** Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/rdc0002_15_01_2007.html. Acesso em: 14 jan. 2023.
- CAVIN, J. F.; DARTOIS, V.; DIVIÈS, C. Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1466–71, 1 abr. 1998.
- DEGRASSI, G.; POLVERINO DE LAURETO, P.; BRUSCHI, C. V. Purification and characterization of ferulate and p-coumarate decarboxylase from *Bacillus pumilus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 1, p. 326–32, 1 jan. 1995.
- DETERING, T.; MUNDRY, K.; BERGER, R. G. Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants. **PLOS ONE**, v. 15, n. 12, p. e0244290, 1 dez. 2020.
- DOS SANTOS, M. B. C. et al. Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 2, 2021.
- EGEA, T. C. et al. Diuron degradation by bacteria from soil of sugarcane crops. **Heliyon**, v. 3, n. 12, p. e00471, dez. 2017.
- GU, W. et al. Structural Basis of Enzymatic Activity for the Ferulic Acid Decarboxylase (FADase) from *Enterobacter* sp. Px6-4. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 16262, 2011a.
- GU, W. et al. Structural basis of enzymatic activity for the ferulic acid decarboxylase (FADase) from *Enterobacter* sp. Px6-4. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. e16262, 21 jan. 2011b.
- GU, W. et al. Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the *Enterobacter* sp. Px6-4 gene for ferulic acid decarboxylase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 1797–1805, mar. 2011c.
- GÜNTHER, T. et al. Alternative Routes for the Production of Natural 4-Vinylguaiacol from Sugar Beet Fiber Using Basidiomycetous Enzymes. **Catalysts** **2021, Vol. 11, Page 631**, v. 11, n. 5, p. 631, 14 maio 2021.

HUANG, H.-K. et al. An endogenous factor enhances ferulic acid decarboxylation catalyzed by phenolic acid decarboxylase from *Candida guilliermondii*. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 4, 4 jan. 2012.

HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P. Purification and characterization of a ferulic acid decarboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 19, p. 5912–5918, out. 1994.

HUNTER, W. J.; MANTER, D. K.; VAN DER LELIE, D. Biotransformation of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiacol by *Enterobacter soli* and *E. aerogenes*. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 752–757, 18 dez. 2012.

LI, L.; LONG, L.; DING, S. Bioproduction of High-Concentration 4-Vinylguaiacol Using Whole-Cell Catalysis Harboring an Organic Solvent-Tolerant Phenolic Acid Decarboxylase From *Bacillus atrophaeus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 0, n. AUG, p. 1798, 2019.

LI, L.; LONG, L.; DING, S. Direct Affinity-Immobilized Phenolic Acid Decarboxylase by a Linker Peptide on Zeolite for Efficient Bioconversion of Ferulic Acid into 4-Vinylguaiacol. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 39, p. 14732–14742, 5 out. 2020.

LUO, Y. et al. 4-Vinylguaiacol, an Active Metabolite of Ferulic Acid by Enteric Microbiota and Probiotics, Possesses Significant Activities against Drug-Resistant Human Colorectal Cancer Cells. **ACS Omega**, v. 6, n. 7, p. 4551–4561, 23 fev. 2021.

MEILGAARD, M. Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. **undefined**, 1975.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. et al. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 2, p. 249–257, abr. 2001.

RODRÍGUEZ, H. et al. Characterization of the p-Coumaric Acid Decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3068–3072, 14 maio 2008.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 467, nov. 2011.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 3–4, p. 141–147, maio 2005.

SUN, L. H. et al. Biosynthesis of 4-vinylguaiacol from crude ferulic acid by *Bacillus licheniformis* DLF-17056. **Journal of Biotechnology**, v. 281, p. 144–149, 10 set. 2018.

TAŃSKA, M.; MIKOŁAJCZAK, N.; KONOPKA, I. Comparison of the effect of sinapic and ferulic acids derivatives (4-vinylsyringol vs. 4-vinylguaiacol) as antioxidants of rapeseed, flaxseed, and extra virgin olive oils. **Food Chemistry**, v. 240, p. 679–685, 1 fev. 2018.

ZAGO, A.; DEGRASSI, G.; BRUSCHI, C. V. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus pumilus* gene for ferulic acid decarboxylase. **Applied**

and Environmental Microbiology, v. 61, n. 12, p. 4484–4486, 1995a.

ZAGO, A.; DEGRASSI, G.; BRUSCHI, C. V. Cloning, Sequencing, and Expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus pumilus* Gene for Ferulic Acid Decarboxylase. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167759/pdf/614484.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2018b.

CAPÍTULO IV

Extração e fracionamento de lignina para obtenção de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico a partir de bagaço de cana de açúcar e talos de uva

RESUMO

O baixo custo, não toxicidade e alta disponibilidade das fibras lignocelulósicas tornam esses materiais substrato adequados a bioprocessos, acrescentando vantagens econômica e ambiental aos mesmos. O setor sucroalcooleiro gerará aproximadamente 171,9 milhões de toneladas de bagaço na safra 2022/23 e, embora esse material tenha importância a geração de energia elétrica para a indústria, pode ser um excelente substrato para a produção de bioprodutos de valor agregado. Além do mais, toda a metodologia e processos desenvolvidos, para o aproveitamento biotecnológico do bagaço de cana pode ser adaptada para outros resíduos agrícolas e agroindustriais como os talos de uva produzidos em regiões vitivinícolas, que atualmente representam uma questão de gestão de resíduos e se apresentam como uma potencial fonte de componentes de materiais biodegradáveis e açúcares fermentescíveis como a xilose. Partindo deste princípio, o objetivo deste trabalho foi comparar e propor metodologias de extração aquosa de lignina, focando em obtenção de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico a partir de bagaço de cana de açúcar e talos de uva. A biomassa foi preparada por lavagem, secagem, trituração e peneiramento para padronização de tamanho das partículas e submetida a três técnicas conhecidas de extração sólido-líquido alcalina (convencional, autoclave e extração ultrassom). Os resultados demonstraram a presença de açúcares redutores em todos os extratos, a maior concentração obtida para o bagaço de cana de açúcar foi no procedimento de extração sólido-líquido com auto-clave no tempo de 60 minutos 120°C e 1 atm, com um total de 118,54 mg L⁻¹, enquanto para o talo de uva foram obtidos 136,54 mg L⁻¹ nas mesmas condições. Quanto ao conteúdo de polifenóis totais, no bagaço de cana de açúcar a maior liberação foi obtida com o método de extração sólido-líquido com autoclave com 60 minutos a 120°C e 1 atm., liberando um total de 1225,53 mg L⁻¹; enquanto que para o talo de uva nas mesmas condições extrativas foram obtidos 2189,67 mg L⁻¹. Contudo quando das análises cromatográficas dos extratos de talo de uva foi identificada a ausência dos ácidos *p*-cumárico e ácido ferúlico, obtendo-os apenas dos extratos de cana de açúcar. A extração convencional de bagaço de cana de açúcar a 90°C durante 60 minutos, apresentou os níveis de liberação mais altos para ácido *p*-cumárico (948,82 mg L⁻¹) e ácido ferúlico (135,41 mg L⁻¹), mostrando que tratamentos extrativos mais agressivos não propiciam maior obtenção desses compostos. Os ácidos ferúlico e *p*-

cumárico foram convertidos enzimaticamente a 4-vinilguaiaicol e 4-vinilfenol, respectivamente, com rendimentos de 43% para ácido ferúlico e 55% para ácido *p*-cumárico demonstrando a possibilidade de uso destes compostos para a produção de *flavours* naturais de grande interesse comercial.

Palavras chave: Bioprocessos, Compostos fenólicos, Biomassa lignocelulósica, Ácido ferúlico, Ácido *p*-cumárico

RESUMEN

El bajo costo, la no toxicidad y la alta disponibilidad de las fibras lignocelulósicas residuos agrícolas hacen que estos materiales sean sustratos aptos para bioprocesos, generando ventajas económicas y ambientales. El sector azucaralcoholero generará aproximadamente 171,9 millones de toneladas de bagazo en la zafra 2022/23 y, aunque este material es importante para la generación de energía eléctrica para la industria, puede ser un excelente sustrato para la producción de bioproductos con valor añadido. Además, toda la metodología y procesos desarrollados para el aprovechamiento biotecnológico del bagazo de caña de azúcar podrían ser adaptados a otros residuos agrícolas y agroindustriales como los raspones de uva producidos en regiones vitivinícolas, que actualmente representan un reto de gestión de residuos y se presentan como fuente potencial de sustratos para la producción de materiales biodegradables y azúcares fermentables como la xilosa. Basado en este principio, el objetivo de este trabajo fue comparar y proponer metodologías para la extracción acuosa de la lignina, enfocándose en la obtención de ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico a partir de bagazo de caña de azúcar y raspón de uva. La biomasa se preparó mediante lavado, secado, trituración y tamizado para estandarizar el tamaño de las partículas y se sometió a tres conocidas técnicas de extracción sólido-líquido alcalino (extracción convencional, autoclave y ultrasónica). Los resultados demostraron la presencia de azúcares reductores en todos los extractos, la mayor concentración obtenida para el bagazo de caña de azúcar fue en el procedimiento de extracción sólido-líquido con autoclave en un tiempo de 60 minutos a 120°C y 1 atm, con un total de 118,54 mg L⁻¹, mientras que para el raspón de uva se obtuvieron 136,54 mg L⁻¹ en las mismas condiciones. En cuanto al contenido de polifenoles totales, en bagazo de caña de azúcar la mayor liberación se obtuvo con el método de extracción sólido-líquido con autoclave durante 60 minutos a 120°C y 1 atm., liberando un total de 1225,53 mg L⁻¹; mientras que para el raspón de uva en las mismas condiciones extractivas se obtuvieron 2189.67 mg L⁻¹. Sin embargo, al realizar el análisis cromatográfico de los extractos de raspón de uva se identificó la ausencia de ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico, obteniéndose estos únicamente a partir de los extractos de caña de azúcar. La extracción convencional del bagazo de caña de azúcar a 90°C durante 60 minutos mostró los mayores niveles de liberación de ácido *p*-cumárico (948.82 mg L⁻¹).

¹) y ácido ferúlico (135.41 mg L⁻¹), demostrando que tratamientos extractivos más agresivos no conducen a mayores rendimientos de estos compuestos. Los ácidos ferúlico y *p*-cumárico se convirtieron enzimáticamente en 4-vinilguayacol y 4-vinilfenol, respectivamente, con rendimientos del 43 % para el ácido ferúlico y del 55 % para el ácido *p*-cumárico, lo que demuestra la posibilidad de utilizar estos compuestos para la producción de aromatizantes naturales de gran interés comercial.

Palabras clave: Bioprocesos, Compuestos fenólicos, Biomasa lignocelulósica, Ácido ferúlico, Ácido *p*-cumárico

INTRODUÇÃO

A ameaça de uma nova crise energética, traz outra vez à pauta internacional a necessidade de se viabilizar as formas de energia alternativas e não dependentes de combustíveis fósseis. O Brasil, há décadas já produz o etanol como combustível alternativo, sendo o segundo maior produtor mundial de etanol. Para a safra 2022/23, são previstas a produção de 572,9 milhões de toneladas de cana de açúcar com produção de 33,9 milhões de toneladas de açúcar, 30,35 bilhões de litros de etanol e 171,9 milhões de toneladas de bagaço (BRASILIA, 2021).

Além da cana de açúcar, outras culturas como a uva e seus derivados como os sucos, vinhos e geleias, apresentam uma grande importância econômica com produção anual de mais de 77 milhões de toneladas, sendo considerada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura uma das maiores safras de frutas do mundo (FAO, 2023; OIV, 2022). Estes meios produtivos, por sua vez, geram milhões de toneladas de resíduos como brotos, bagaço, cascas e talos de uva. Com isso, após os processos do período de vindima o que representa uma questão de gestão de resíduos, sendo este um grande desafio das regiões vitivinícolas como Espanha.

Estes setores produtivos se deparam com questões de acúmulo e destinação de subprodutos das diversas etapas da cadeia produtiva e tendo que desenvolver estratégias para reduzir o custo do processo, impacto socioeconômico e ambiental. O aperfeiçoamento dos processos e a criação de sistemas fechados aplicados numa economia circular oferecem opções economicamente importantes aos subprodutos, convertendo-os em matéria-prima secundária para produtos de alto valor comercial agregado (PARISI; NANNI; COLONNA, 2021).

Com a grande quantidade de biomassa gerada a partir do manejo agrícola, e tais manejos existem as questões de acúmulo e destinação de subprodutos presentes nos diversos ciclos da cadeia alimentar. Ao longo do tempo múltiplas aplicações para os resíduos de biomassa gerados no setor vitivinícola têm sido propostas, como é o caso dos estudos que propõem a reutilização de cascas e sementes de uva (SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2014), cujas têm toneladas produzidas todos os anos e consequentemente despertam interesse uma vez que aplicações

em química verde podem ser vantajosas econômica e ambientalmente (ESCOBAR-AVELLO et al., 2021).

Assim como as cascas e os brotos de videira, os talos também são biomassa que ainda não apresentam aplicações nobres, sendo tradicionalmente descartados ou usados como fertilizantes orgânicos (ABADÍA RETUERTA SA). Contudo, estudos recentes têm demonstrado a grande capacidade da biomassa lignocelulósica advinda da indústria vinícola com propostas de produção de aditivos alimentares (ESCOBAR-AVELLO et al., 2021), utilização na composição de biomateriais como o polibutileno succinato, substituinte de polipropileno e do polietileno (NANNI et al., 2021), e substrato para produção de ácido succínico a partir de biotransformação microbiana (FILIPPI et al., 2021).

Em particular, o gerenciamento do bagaço da cana de açúcar tem sido uma importante estratégia de geração de energia dentro da própria indústria e cada vez mais assume importância dentro da produção e rendimento econômico e energético. Contudo, ainda existem potencial de uso do bagaço para fins biotecnológicos como o etanol de segunda geração e outros produtos. A grande maioria dos processos busca o aproveitamento dos polissacarídeos das fibras do bagaço, porém, os compostos fenólicos na estrutura da biomassa lignocelulósica (lignina) são importantes substratos para obtenção de compostos com alto valor agregado. Compostos como os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, por exemplo, os ácidos ferúlico e *p*-cumárico possuem valor em sua forma natural ou biotransformado em 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol, respectivamente, uma vez que suas aplicações são vastas na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (CARVALHO et al., 2021; PAZ et al., 2016).

Entretanto, a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica, devido principalmente à lignina, oferece obstáculo às biotransformações microbianas, impedindo a conversão direta das fibras em produtos de alto valor agregado (PANG et al., 2021). O bagaço de cana de açúcar apresenta teores de lignina entre 23-32%, sendo esta composta por monômeros de álcool *p*-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, contendo unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S). A lignina do bagaço cana de açúcar é proporcionalmente rica destas três unidades precursoras (G, S e H), além disso as ligações entre as unidades são principalmente ligações éter e C–C, sendo a ligação de éter, a mais abundante compreendendo 77-85% de todas as ligações (DEL RÍO et al., 2009, 2012a, 2012b). Com base nessas

características, estabeleceu-se que para romper as estruturas deste material lignocelulósico e aumentar a digestibilidade da matriz antes das conversões, os tratamentos alcalinos são muito mais eficientes para tanto para extração quanto para a solubilização da lignina pois as ligações ésteres são mais facilmente quebradas nessas condições, além de promover com pouca degradação da hemicelulose e celulose (ASGHER et al., 2014; CAO et al., 2018; PEREIRA SCARPA et al., 2019).

Vários reagentes podem ser utilizados para este processo, como o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônia e hidróxido de cálcio. O hidróxido de sódio é o reagente mais usado para este pré-tratamento uma vez que promove a extração da lignina com boa eliminação da hemicelulose (REN et al., 2016). Atualmente estão disponíveis muitas técnicas usadas para a extração de compostos fenólicos de diferentes tipos de biomassa lignocelulosa, a maioria delas usando condições extremamente agressivas e de alto custo, gerando extratos altamente contaminados com produtos que prejudicam a posterior utilização (PANG et al., 2021).

Partindo deste princípio, o objetivo deste trabalho foi comparar e propor metodologias de extração aquosa baseadas no aproveitamento da biomassa lignocelulosa de bagaço de cana de açúcar e talos de uva para obtenção de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico. Dividido em três técnicas conhecidas de extração sólido-líquido (extração sólido-líquido convencional, extração sólido-líquido com autoclave e extração sólido-líquido com ultrassom), que serão procedidas em condições alcalinas afim de compreender as possíveis alterações da composição dos extratos obtidos e suas possíveis aplicações para extração de diferentes compostos.

MATERIAL E MÉTODOS

Biomassa lignocelulósica de cana de açúcar

O bagaço de cana de açúcar utilizado neste trabalho, apresentado na Figura 1, foi gentilmente doado pela Usina Vale Ltda. – Açúcar e Álcool, localizada no município de Onda Verde, Estado de São Paulo, Brasil.

Figura 1: Bagaço de cana de açúcar.



Fonte: autor.

O mesmo foi lavado em água da torneira por 5 vezes para remover os açúcares, e seco por circulação de ar a 40 ± 2 °C por 120 h até o teor de umidade ficar abaixo de 5% (p/v). O bagaço seco foi triturado em triturador TRF 400 e peneirado para tamanho de partícula entre 1,41 e 2,83 mm.

Biomassa lignocelulósica de talos de uva

Os talos de videira da variedade Airén (*Vitis vinífera*), apresentados na Figura 2 foram gentilmente doados pelo Instituto da Vinha e do Vinho de Castilla-La

Mancha (IVICAM), localizado na região espanhola de Castilla-La Mancha, por seleção aleatória na safra de 2021.

Figura 2: Talos de uva.



Fonte: autor.

A biomassa foi lavada três vezes com água e seca por 24 horas a 70°C em estufa. O material seco foi triturado a usando um moinho de mesa em lotes (A10 basic, IKA, Alemanha) para obter uma amostra homogênea (pó). A biomassa padronizada por moagem foi mantida, até o seu uso, sob vácuo e temperatura ambiente (25–27 °C).

Procedimentos de extração

As diferentes metodologias de extração foram realizadas paralelamente utilizando solução de hidróxido de sódio 0,5 M e biomassa numa proporção de 5% p/v, conforme descritas por Scarpa e colaboradores (2019). Todos os procedimentos de extração foram realizados em triplicata para as biomassas de bagaço de cana de açúcar e talos de uva, em cada uma das condições abaixo descritas.

Para os ensaios de extração sólido-líquido com autoclave, 1,25 g de biomassa de foi extraído com 25 mL de solução de extração, mantidos a 120°C e 1 atm durante 15, 30 e 60 minutos. Foi utilizada uma autoclave (Fabbe Vertical, modelo 103), dispositivo selado que atua através de calor úmido, ou seja, vapor saturado sob pressão.

Para os ensaios de extração sólido-líquido convencional, 1,25 g de biomassa de foi extraído com 25 mL de solução de extração, mantidos a 70 e 90°C com agitação constante de 300 rpm. O tempo de extração foi estabelecido em 15, 30 e 60 minutos. Para este método foi utilizado um agitador magnético de bancada com aquecimento (LBX Instruments, H03D Series, USA).

Para os ensaios de extração sólido-líquido dinâmica, foi utilizada uma sonda de ultrassom (QSONICA 5000 Sonicator, Cole Parmer, Vernon Hills, USA), e 1,25 g de biomassa foi extraído com 25 mL de solução de extração. A mistura foi submetida a pulsos de 80% de potência de 15 segundos, com intervalos de 5 segundos, este processo ocorreu em banho termostático a mantido a 4°C por 3 e 5 minutos.

Ao finalizar todos os processos de extração as misturas foram filtradas em lã de vidro para interromper possíveis processos de extração do resíduo sólido restante.

Preparo de amostra e análise de parâmetros gerais

Inicialmente, foi aferido o pH das amostras e ácido clorídrico concentrado (HCl) foi adicionado até as amostras atingirem pH de 2,5 aproximadamente, e então todos os extratos foram centrifugados a 15000 g por 5 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro PVDF Durapore de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA, EUA), e armazenado para análise.

Todos os extratos foram analisados quanto aos parâmetros de °Brix e a quantificação dos açúcares redutores foi realizada pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959), utilizando curva padrão de glicose.

Com a finalidade de realizar a separação dos compostos fenólicos que possuem caráter hidrofóbico de sólidos solúveis que podem interferir em análises e processos posteriores, foi realizada extração em fase sólida (SPE) com cartuchos

C18 (Sep Pak Plus, 820 mg de adsorvente, Millipore, Bedford, MA, EUA), afim de se obter o isolamento de derivados de ácidos hidroxicinâmicos. Para isso, 3 mL de extratos fenólicos foram aplicados à coluna e lavados com 5 mL de água e em seguida eluídos em 6 mL de etanol 96%. Os cartuchos usados foram previamente condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água.

Após este procedimento todas as amostras tiveram seu conteúdo polifenólico total mensurado pelo método de reagente de Folin-Ciocalteu (EVERETTE et al., 2010), utilizando curva padrão de ácido gálico. Para isso, em tubo de ensaio 100 µL de amostra foi adicionado a 6 mL de água e homogeneizados suavemente, em seguida foram adicionados 500 µL de reativo de Folin-Ciocalteu e novamente homogeneizados; no mesmo tubo foram adicionados 1,5 mL de uma solução de carbonato sódico a 20% e água até completar o volume total de 10 mL. A mistura foi deixada em descanso por 30 minutos a temperatura de 24 °C e em seguida teve sua absorbância determinada a 765nm em cubeta plástica utilizando um espectrofotômetro.

Análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A análise de derivados do ácido hidroxicinâmico foi realizada usando um sistema Agilent 1100 Series (Agilent, Waldbronn, Alemanha), equipado com DAD (G1315B) e um LC/MSD Trap VL (G2445C VL) sistema de espectrometria de massa por ionização por eletrospray (ESI-MS/MS). O sistema cromatográfico foi gerenciado por uma unidade de processamento de dados Agilent ChemStation (versão B.01.03). Os dados do espectro de massa foram processados usando o software Agilent LC/MS Trap 5.3 (versão 3.3).

A taxa de fluxo foi de 0,19 mL/min. O solvente A foi CH₃CN/H₂O/HCOOH (3:88,5:8,5 v/v/v), o solvente B foi CH₃CN/H₂O/HCOOH (50:41,5:8,5, v/v/v) e o solvente C foi CH₃OH/H₂O/ HCOOH (90:1,5:8,5, v/v/v). O gradiente de solvente para a análise de compostos fenólicos não antocianínicos foi: zero minutos (98% A e 2% B), 8 minutos (96% A e 4% B), 37 minutos (70% A, 17% B e 13 % C), 51 minutos (50% A, 30% B e 20% C), 51,5 minutos (30% A, 40% B e 30% C), 56 minutos (50% B e 50% C), 57 minutos (50% B e 50% C) e 64 minutos (98% A e 2% B). Para identificação, foi utilizado o ESI-MS/MS empregando os seguintes parâmetros: modo

de ionização negativo; gás seco, N₂, 8 L/min; temperatura de secagem, 350°C; nebulizador, 40 psi; capilar, 3500 V; escumadeira 1, -20 V; escumadeira 2, -60 V; e faixa de varredura, 100-1000 m/z. A identificação dos ácidos hidroxicinâmicos foi realizada utilizando os padrões demonstrados na Tabela 1, e seus espectros UV-Vis.

Resumidamente, antes da injeção no sistema de HPLC, o eluato de SPE foi seco em um evaporador rotativo a 35 °C e redissolvido em 1,5 mL de solução de metanol a 20% e 20 µL foi injetado em uma coluna de fase reversa ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2,1 x 150 mm; partícula de 3,5 µm, Agilent USA, Santa Clara-Califórnia), a 40 °C. Cromatogramas em 320 nm foram utilizados para a quantificação dos derivados do ácido hidroxicinâmico e seus produtos de descarboxilação não oxidativa, os padrões utilizados são informados na Tabela 1.

Tabela 1: Compostos analisados em HPLC.

Nomenclatura utilizada neste trabalho	Nome IUPAC
Ácido ferúlico	(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoico
Ácido <i>p</i> -cumárico	(E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico
4-vinilguaiaicol	4-Ethenyl-2-methoxyphenol
4-vinilfenol	4-Ethenylphenol

As curvas de calibração foram realizadas nas concentrações de 0,1 a 100 mg L⁻¹ para os compostos supracitados, o coeficiente de correlação foi de 0,999 para os compostos estudados.

Produção enzimática de 4-vinilguaiaicol a partir de ácido ferúlico de bagaço de cana de açúcar

Nesta etapa do estudo foi utilizado o extrato da enzima ácido ferúlico descarboxilase heteróloga produzida e purificada conforme descrição contida no Capítulo III deste documento.

Com base nos resultados obtidos a partir da quantificação de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, o extrato selecionado para os testes de atividade enzimática para

produção de 4-vinilguaiacol foi aquele obtido sob as condições de extração convencional a temperatura de 70°C e tempo de 15 minutos (nomeadamente BCA1-EC NaOH, 70°C, 15MIN).

Para preparo do substrato para a reação enzimática, inicialmente foi realizada extração em fase sólida (SPE) com cartucho C18, conforme mencionado anteriormente, contudo após a etapa de secagem em evaporador rotativo a 35°C o material foi redissolvido em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 5,5) e teve seu conteúdo de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Em seguida, a reação enzimática ocorreu adicionando-se 0,05 mL de extrato enzimático (10% v/v) a 0,45 mL da solução contendo o substrato enzimático, sendo $123,35 \pm 2,06 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido ferúlico e $785,29 \pm 13,88 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido *p*-cúmarico. A mistura reacional foi incubada a temperatura de 40 °C, durante 2 e 5 minutos. A atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase foi medida pela redução de ácido ferúlico e calculada pela formação de 4-vinilguaiacol. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produção de 1 μmol de 4-vinilguaiacol por minuto.

Análise estatística

Utilizando o software Statsoft STATISTICA® 7.0, os dados das extrações realizadas com bagaço de cana de açúcar foram submetidos à análise de variância (ANOVA) estabelecendo 5% ao nível de confiança. Além disso, foram realizados o teste de *Tukey* para comparar as médias entre as amostras, bem como ensaios de desejabilidade.

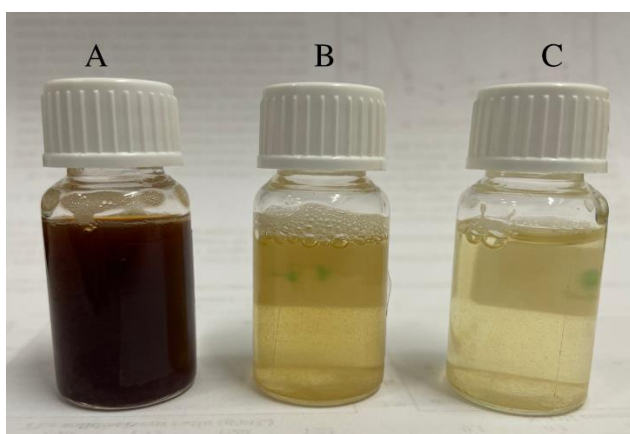
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros gerais e quantificação de açúcares, fenólicos totais, ácidos ferúlico e *p*-cumárico

Biomassa de bagaço de cana de açúcar

As biomassas de bagaço de cana de açúcar e talos de uva foram submetidas a três métodos de extração sólido-líquido alcalina (convencional, autoclave e ultrassom), em aspecto visual o bagaço de cana de açúcar demonstrava estar bem acessado pela solução extratante logo no início do processo. Ao realizar observação visual nota-se que os diferentes métodos de extração geram extratos com coloração diferente, que passa de transparente incolor a transparente amarelado/marrom escuro, a mudança de coloração é associada ao rompimento das estruturas da lignina e da hemicelulose, bem como a dispersão de fragmentos de lignina de baixa e alta massa molecular (EUGENIO et al., 2021). A Figura 3 mostra as mudanças de coloração para cada um dos tratamentos extrativos com bagaço de cana de açúcar.

Figura 3: Demonstração da coloração dos extratos após o procedimento extrativo do bagaço de cana de açúcar, onde A) Extração com autoclave, B) Extração convencional e C) Extração com ultrassom.

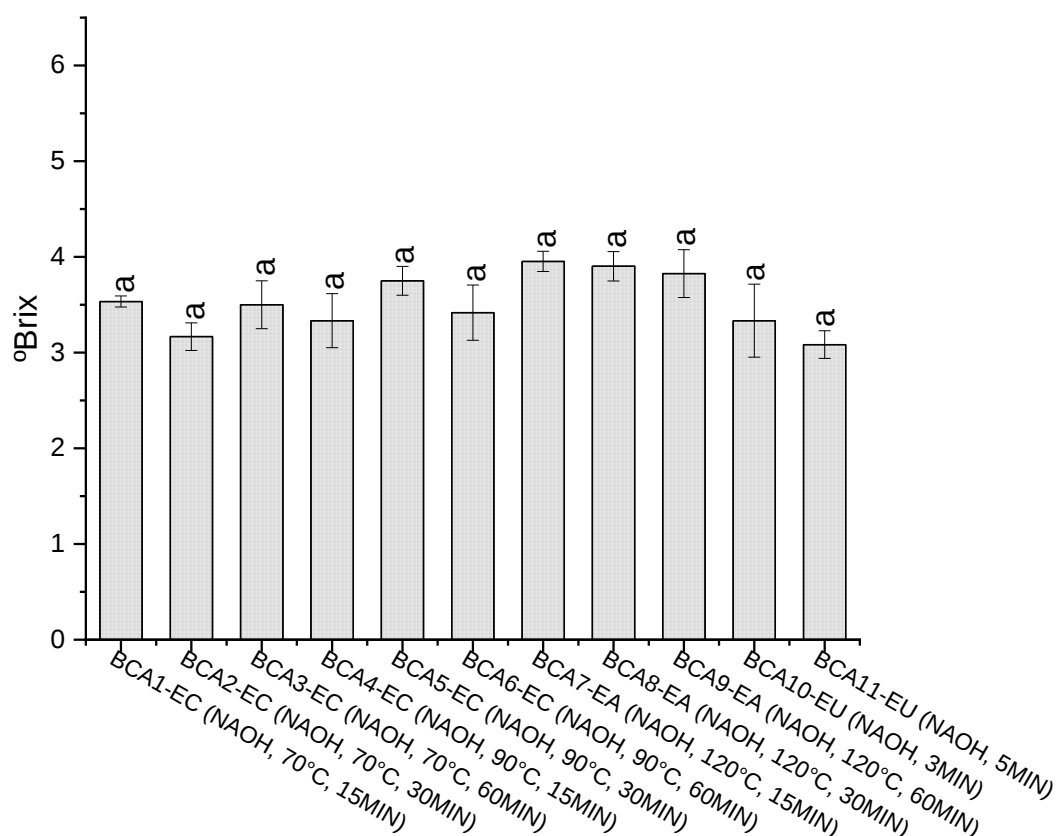


Fonte: Autor.

Em nenhum dos extratos obtidos após a realização dos diferentes procedimentos de extração foi observado aspecto de alta turbidez, característica do

rompimento das estruturas de celulose. Contudo, todas as amostras tiveram seu °Brix e a quantidade de açúcares redutores verificados devido a possibilidade de haver sólidos solubilizados. Os valores obtidos para a mensuração de °Brix dos extratos de bagaço de cana de açúcar estão apresentados na Figura 4, é possível observar que não superam 4,0 °Brix, bem como os testes estatísticos não demonstraram diferença significativa entre os diferentes métodos de extração, os dados do teste de Tukey estão adicionados nas figuras.

Figura 4: Valor médio e desvio padrão para o teor de °Brix dos extratos obtidos, onde BCA: Bagaço de cana de açúcar, EC: Extração convencional, EA: Extração com autoclave e EU: Extração com sonda de ultrassom.



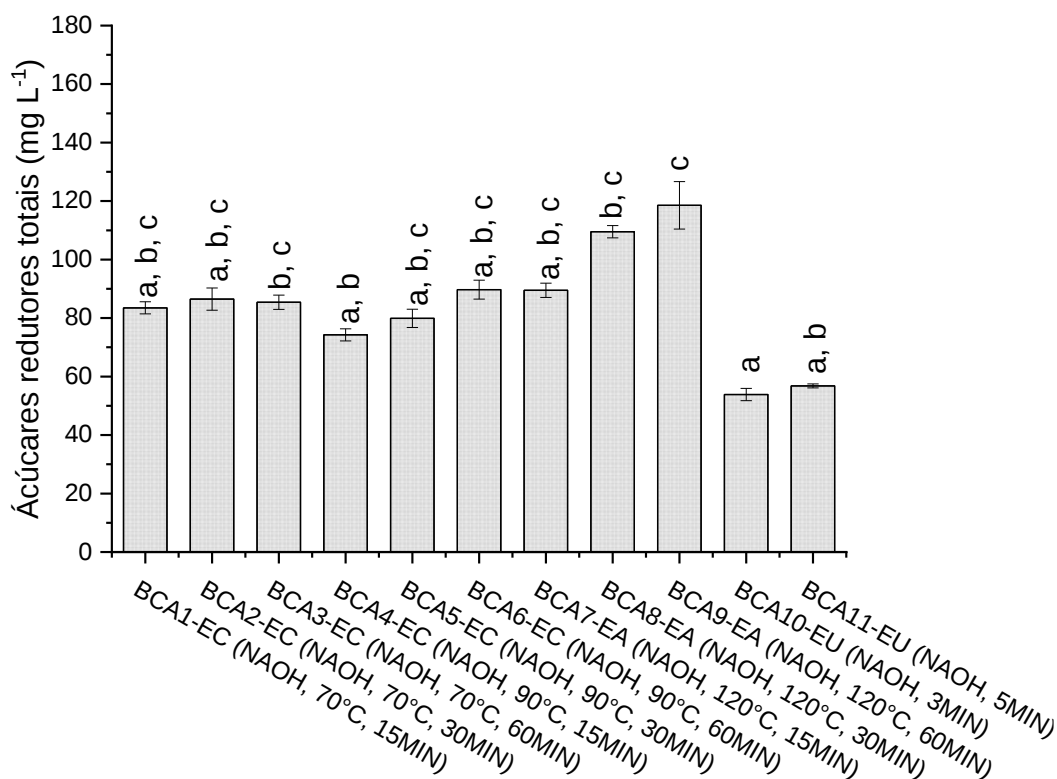
Nota: Diferentes sobrescritos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de extração de acordo com o teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

Os resultados obtidos indicam a presença de sólidos solúveis, que podem ser açúcares, bem como de sais em solução. Segundo (BILAL et al., 2020), no processo de pré-tratamento alcalino seguido de adição de ácido concentrado para correção do pH, provoca a precipitação das frações de lignina de alta massa molar e com a

diminuição do valor do pH, ocorre também a formação de sais que podem provocar redução dos rendimentos de fases posteriores como a realização de bioprocessos enzimáticos e etapas de quantificação dos compostos de interesse.

Sendo assim, a quantificação de açúcares redutores foi procedida afim que determinar quanto destes sólidos são açúcares provenientes dos diferentes processos extrativos, os resultados estão apresentados na Figura 5. De acordo com a análise de variância os resultados apresentam diferenças significativas ao nível de 95% de confiança, com valor p (ANOVA) $< 0,05$ sendo $F=4,11$. O teor de açúcares totais moveu-se na faixa de 53,8-118,5 mg L^{-1} , onde os tratamentos com autoclave BCA8 e BCA9, deram origem a extratos com teor de açúcares redutores superior ao dos extratos obtidos por aplicação ultrassônica (BCA10 e BCA11).

Figura 5: Valor médio e desvio padrão para o teor de açúcares redutores totais dos extratos obtidos, onde BCA: Bagaço de cana de açúcar, EC: Extração convencional, EA: Extração com autoclave e EU: Extração com sonda de ultrassom.



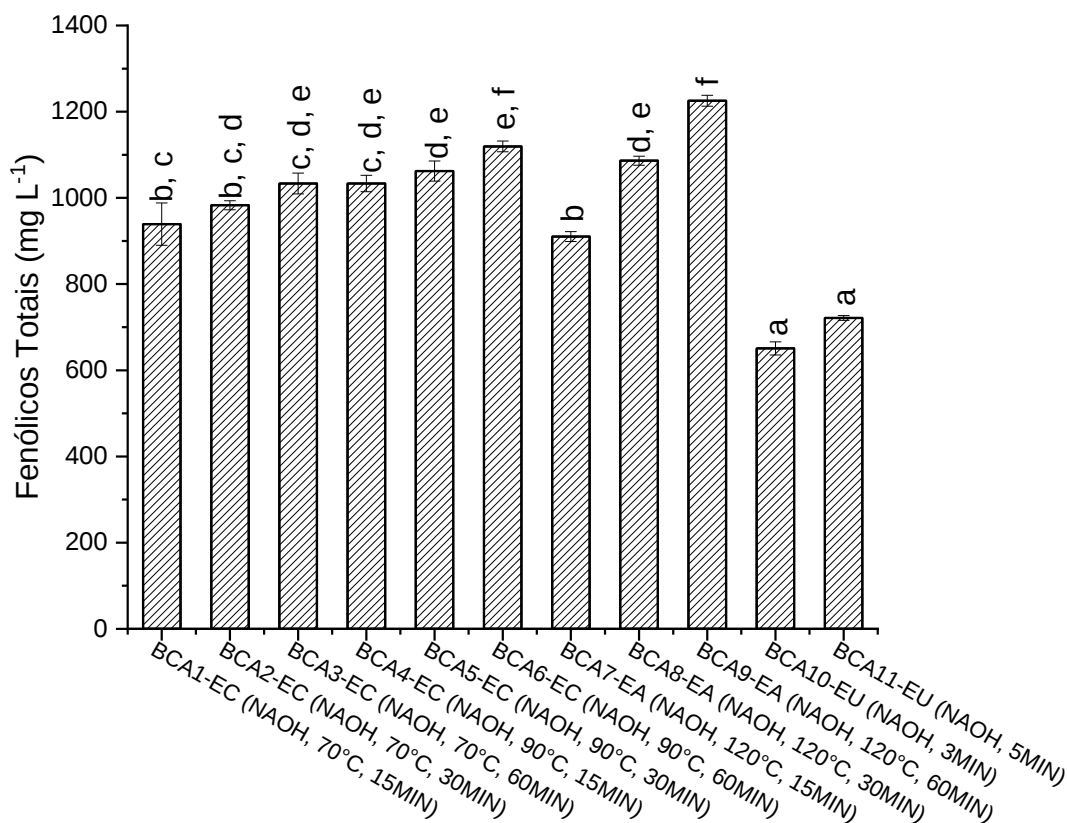
Nota: Diferentes sobrescritos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de extração de acordo com o teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

Thammasittirong e colaboradores (2017), obtiveram uma concentração de 200 mg L⁻¹ de açúcares redutores totais em um tratamento ácido (H₂SO₄ - 1%), que permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos, seguido de processo de autoclavagem à 121 °C, 1 atm., por 30 minutos. Tais resultados demonstram que o método ácido de extração possui maior ação sobre os açúcares da biomassa lignocelulósica, contudo este método também está relacionado a obtenção de altas concentrações de compostos tóxicos e inibidores enzimáticos provenientes da degradação dos açúcares como é o caso do furfural e do hidroximetilfurfural (SCARPA et al., 2019).

A obtenção de maiores valores para os tratamentos extrativos que utilizaram autoclave pode ser explicada pelo fato da água em altas pressões tender a penetrar com mais facilidade na estrutura da biomassa, promovendo a hidratação da celulose e remoção de parte da hemicelulose junto da lignina, o que pode levar a disponibilização de açúcares no meio (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; SCARPA et al., 2019). Qiang Yu e colaboradores (2013), também com tratamentos alcalinos utilizando hidróxido de amônia líquido, realizou tratamentos sequenciais de 140 e 200°C, por 30 minutos, em reator de autoclave adaptado, observando que a presença de altas temperaturas promove a geração de furfural e o 5-hidroximetilfurfural devida a degradação direta da xilose relacionada com as altas temperaturas.

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado nos extratos de cana de açúcar (Figura 6). De acordo com a análise de variância os resultados apresentam diferenças significativas ao nível de 95% de confiança, com valor p (ANOVA)<0,05. E, diante da realização do teste de Tukey é possível inferir que BCA9 com autoclave é diferente estatisticamente dos demais métodos extrativos, no qual houve a maior liberação de fenólicos totais com uma concentração de 1225,5 mg L⁻¹. Bem como os menores valores de liberação de fenólicos totais são encontrados para BCA10 e BCA11, sonda de ultrassom, respectivamente com teores de 650,7 mg L⁻¹ e 721,3 mg L⁻¹, não apresentando diferença estatística significativa entre si.

Figura 6: Valor médio e desvio padrão para o teor de fenólicos totais dos extratos de bagaço de cana de açúcar em função dos diferentes procedimentos de extração, onde BCA- Bagaço de cana de açúcar, EC- Extração convencional, EA- Extração com autoclave e EU- Extração com sonda de ultrassom.

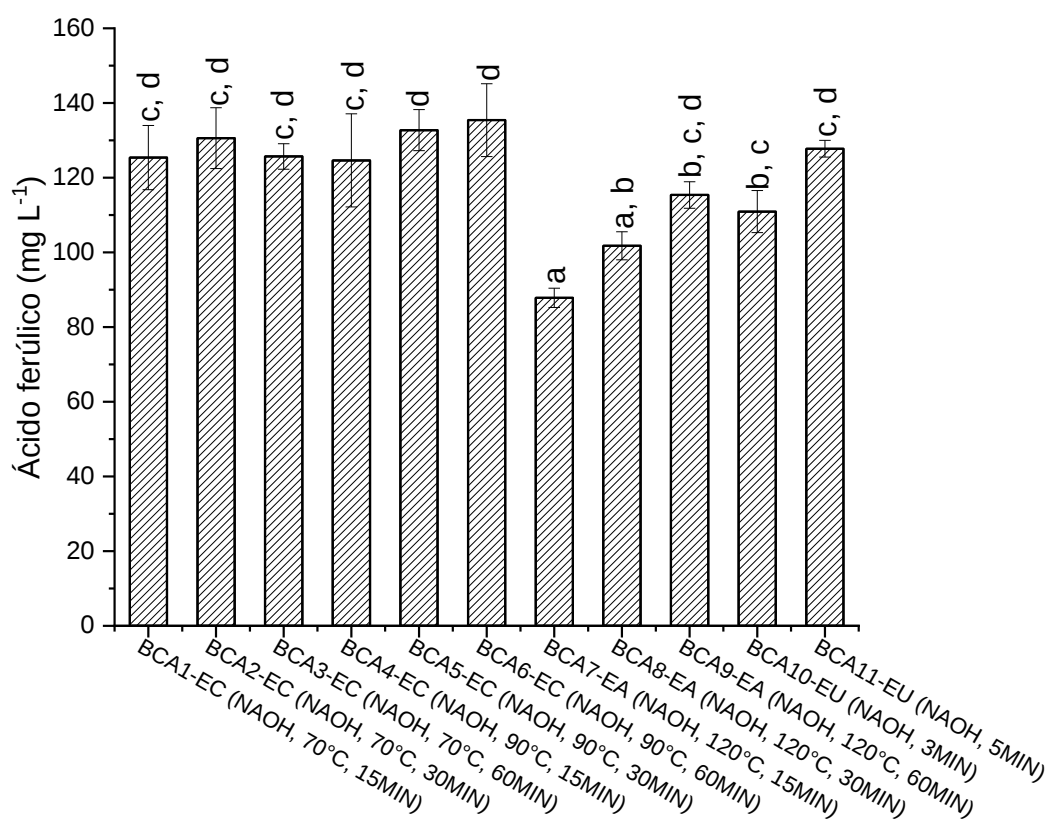


Nota: Diferentes sobrescritos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de extração de acordo com o teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

Para ácido ferúlico, de acordo com análise de variância os resultados apresentam diferenças significativas ao nível de 95% de confiança, com valor p (ANOVA) $< 0,05$ sendo $F=13,87$. Na Figura 7, aplicando os resultados do teste de Tukey é possível observar que os métodos extrativos BCA5 e BCA6 demonstraram uma significativa diferença de BCA7, BCA8 e BCA10, contudo não são diferentes estatisticamente entre si. Nestes tratamentos a concentração de ácido ferúlico variou entre 132,7 e 135,4 mg L⁻¹, mostrando que o aumento de temperatura para os tratamentos convencionais onde não há ação de altas pressões pode resultar em maiores quantidades do composto de interesse em uma menor faixa de tempo de extração.

Já para BCA1, BCA2, BCA3, BCA4 e BCA11, não foram obtidas diferenças estatísticas significativas, nos quais as concentrações de ácido ferúlico flutuaram entre 110,9 e 130,5 mg L⁻¹, e a menor concentração foi obtida no tratamento BCA7, o qual apresentou diferença estatística considerável de todos os outros tratamentos com 87,8 mg L⁻¹ de ácido ferúlico.

Figura 7: Valor médio e desvio padrão para o teor de ácido ferúlico dos extratos de bagaço de cana de açúcar em função dos diferentes procedimentos de extração, onde BCA- Bagaço de cana de açúcar, EC- Extração convencional, EA- Extração com autoclave e EU- Extração com sonda de ultrassom.



Nota: Diferentes sobrescritos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de extração de acordo com o teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

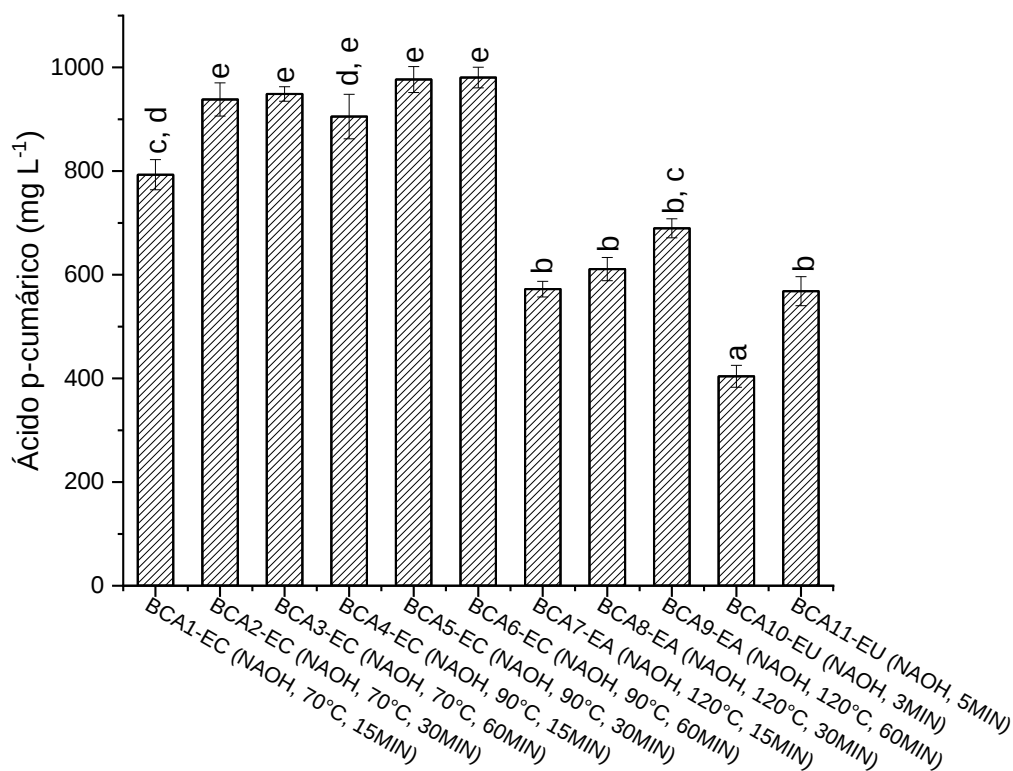
Os maiores níveis de liberação de ácido ferúlico não são encontrados nos tratamentos com autoclave, e sim nos tratamentos convencionais em temperatura de 70°C e 90°C, bem como nos tratamentos com sonda de ultrassom. Tais resultados demonstram que um método de extração agressivo com relação a temperatura pode

ser prejudicial ao rendimento de obtenção dos ácidos ferúlico, composto que é citado como termo sensíveis (BEHERA et al., 2014; FIDDLER et al., 1967).

Para ácido *p*-cumárico, de acordo com análise de variância os resultados apresentam diferenças significativas ao nível de 95% de confiança, com valor *p* (ANOVA)<0,05 sendo $F=70,92$. Na Figura 8, aplicando os resultados do teste de Tukey é possível observar que os métodos extrativos mais agressivos também não resultam em maiores teores de ácido *p*-cumárico, assim como encontrado para ácido ferúlico. Contudo, foram obtidas quantidades maiores de ácido *p*-cumárico e relação ao obtido de ácido ferúlico (BEHERA et al., 2014; FIDDLER et al., 1967).

As menores concentrações de ácido *p*-cumárico foram obtidas no tratamento BCA10 com $404,1 \text{ mg L}^{-1}$, que se apresentou estatisticamente diferente de todos os demais. Enquanto que as maiores concentrações centraram-se nos tratamentos BCA2, BCA3, BCA5 e BCA6, estatisticamente semelhantes com valores variando entre 793 e $980,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido *p*-cumárico.

Figura 8: Valor médio e desvio padrão para o teor de ácido *p*-cumárico dos extratos de bagaço de cana de açúcar em função dos diferentes procedimentos de extração, onde BCA- Bagaço de cana de açúcar, EC- Extração convencional, EA- Extração com autoclave e EU- Extração com sonda de ultrassom.



Nota: Diferentes sobrescritos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de extração de acordo com o teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

Os estudos disponíveis na literatura demonstram que a remoção de lignina em tratamentos alcalinos está correlacionada diretamente ao tempo e a temperatura em que está sujeita a biomassa lignocelulósica de cana de açúcar a estas condições, como é o caso dos resultados obtidos por Oladi e colaboradores (2017), que quando de testes realizando pré-tratamento com hidróxido de amônia líquido em autoclave, obteve a maior remoção de lignina (66,85%) nos tratamentos mais extensos e de temperatura mais alta (54 minutos de duração, sob temperatura de 208 °C).

O alto valor obtido nos ensaios de quantificação de fenólicos totais para o tratamento em autoclave no tempo 60 minutos, corroboram a literatura demonstrando que a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica é melhor

acessada com tratamentos alcalinos sob alta temperatura e pressão levando à uma melhor decomposição/remoção da lignina que culmina na liberação de grandes quantidades de compostos fenólicos diversos de alto, médio e baixo peso molecular (PANG et al., 2021; PEREIRA et al., 2021). Contudo, conforme a literatura e o disposto neste estudo, é possível observar que uma maior degradação de lignina devido a condições mais drásticas de tratamento não está diretamente relacionada à melhores rendimentos de ácido ferúlico e *p*-cumárico, uma vez que estes são afetados por estas condições (BEHERA et al., 2014; FIDDLER et al., 1967).

Além disso, observou que resultados sobre remoções de lignina em aumento da temperatura de reação do pré-tratamento não contribui na melhoria da remoção de lignina e, ao contrário, mais lignina permanece nos resíduos sólidos sob a alta temperatura de 180 °C, confirmando os resultados referentes a reação de repolimerização da lignina em altas temperaturas durante as extrações termoquímicas já descritas em outros trabalhos (PANG et al., 2021)

Neste trabalho, nos tratamentos convencionais de 70 e 90°C, os conteúdos de ácido *p*-cumárico não sofreram alterações significativas nos tempos de tratamento de 30 e 60 minutos, demonstrando que o acesso a estrutura exterior da biomassa é efetivo com 30 minutos a 70 °C. Assim como para os conteúdos de ácido ferúlico que não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos convencionais de 60 minutos a 70 °C e de 15 minutos a 90°C, o que indica que um tratamento mais curto pode ser realizado para obtenção de quantidades de ácido ferúlico proporcionais. Esses resultados podem ser explicados devido a localização destes ácidos na organização da biomassa lignocelulósica. Sabe-se que o tratamento alcalino na biomassa lignocelulósica desestrutura as ligações ésteres entre a xilana e a lignina, e desfaz as ligações éters localizadas entre o carbono aquelas entre carbono alifático–O–carbono aromático e aquelas entre carbono aromático–O–carbono aromático que liberam ácido ferúlico e *p*-cumárico (PANG et al., 2021; PONNUCHAMY, 2022).

As maiores quantidades de ácido *p*-cumárico, são explicadas pois este composto é encontrado em maiores proporções nas plantas gramíneas principalmente nas espécies de clima quente como a cana-de-açúcar, rica em ácidos fenólicos ligados a ésteres dentro da parede celular, este já foi descrito como o composto fenólico mais abundante já relatado em extrações alcalinas por alguns

autores como (ABBAS et al., 2014; PEREIRA SCARPA et al., 2019; XU et al., 2005a).

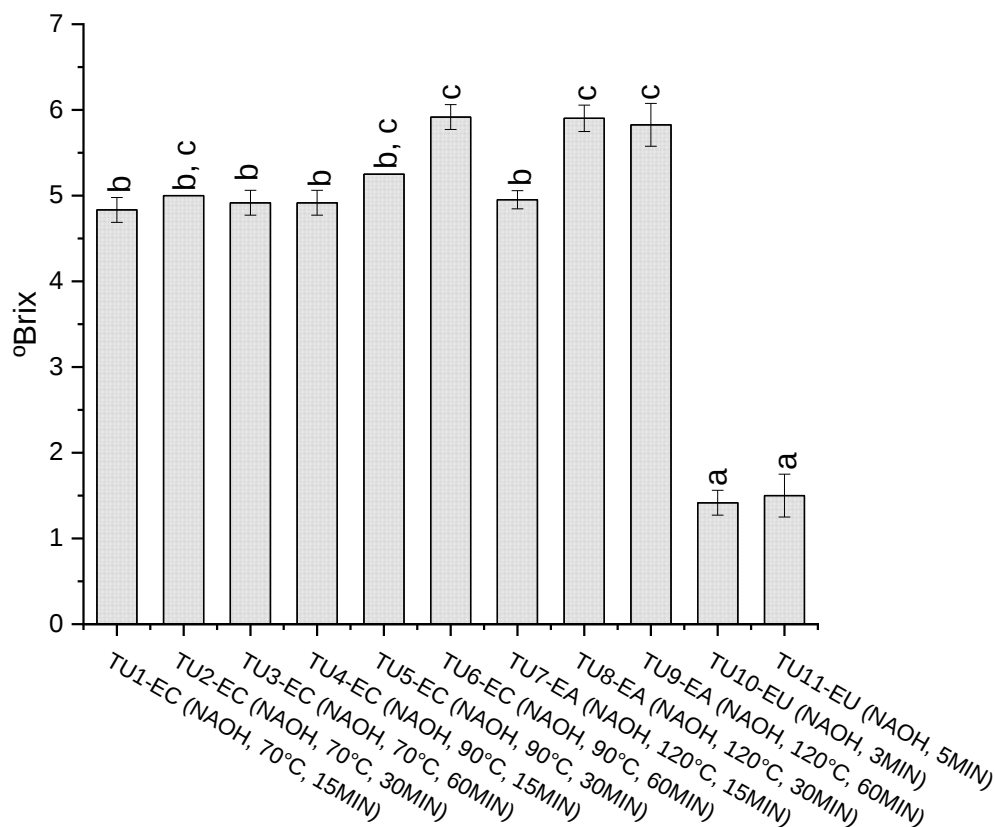
Vale destacar que para a extração do ácido ferúlico o tratamento de 5 minutos com sonda de ultrassom é tão eficaz quanto os tratamentos convencionais de extração a 70 e 90 °C. Portanto, se o composto de interesse for ferúlico e não o ácido *p*-cumárico, provavelmente a opção mais adequada do ponto de vista de consumo de energia e tempo gasto é o tratamento ultrassônico.

Talos de uva

Os talos de uva Airén foram submetidos a três métodos de extração sólido-liquido alcalina (convencional, autoclave e ultrassom), e assim como o bagaço de cana de açúcar em aspecto visual demonstrava estar bem acessado pela solução extratante no início do processo, as amostras tiveram seu °Brix e a quantidade de açúcares redutores mensurados, e os resultados são apresentados nas Figuras 9 e 10.

Aplicando o teste de Tukey, os tratamentos convencionais e com autoclave demonstraram significativa diferença quando comparadas aos tratamentos com sonda de ultrassom, amostras TU10 e TU11 que apresentaram os menores índices de °Brix com respectivamente 1,4 e 1,5. É possível observar que há a presença de sólidos solúveis em maior proporção que o obtido nos tratamentos com bagaço de cana de açúcar, isso pode ser justificado pelo fato dos talos serem materiais advindos diretamente do desengace e ainda não extraídos em um outro processo uma vez que não sofrem retirada de caldo ou outro componente de sua estrutura.

Figura 9: Valor médio e desvio padrão para o teor de °Brix dos extratos de talos de uva obtidos, onde TU: Talos de uva, EC: Extração convencional, EA: Extração com autoclave e EU: Extração com sonda de ultrassom.



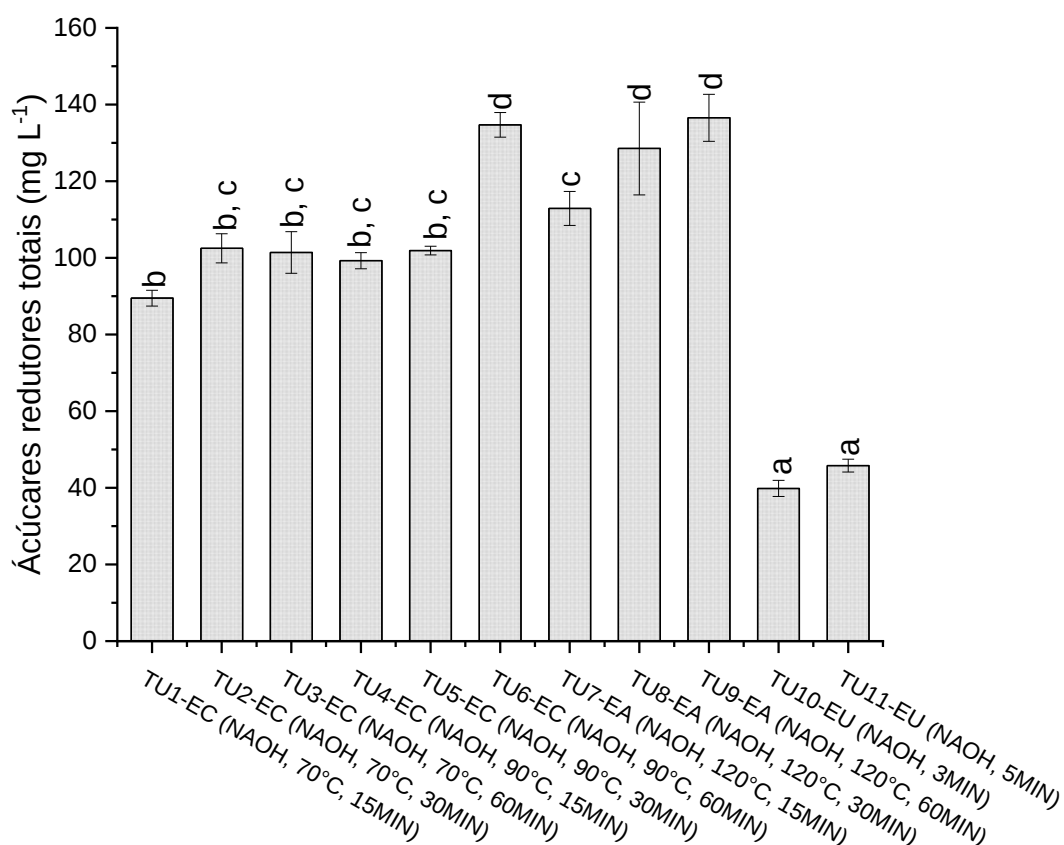
Nota: Diferentes sobrescritos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de extração de acordo com o teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

De acordo com análise de variância (ANOVA), a liberação de açúcares redutores totais apresentou $p < 0,05$ demonstrando que os valores são significativos ao nível de 95% de confiança. Aplicando o teste de Tukey, os valores das amostras demonstraram uma significativa diferença, principalmente para as amostras TU10 e TU11 que apresentaram as menores concentrações de açúcares redutores totais, respectivamente 39,8 e 45,8 mg L⁻¹.

Além disso, as amostras TU6, TU8 e TU9 são consideradas semelhantes estatisticamente, mostrando que na extração convencional de 60 minutos a 90°C, obtém concentrações de açúcares similares quando comparado aos tratamentos sob alta pressão e temperatura em autoclave de 30 e 60 minutos. O que se mostra como o melhor método extrativo de açúcares dentre os testes realizados, visando o gasto

de energia e equipamentos necessários para obtenção de altas pressões e temperatura.

Figura 10: Valor médio e desvio padrão para o teor de açúcares redutores totais (B) dos extratos de talos de uva obtidos, onde TU: Talos de uva, EC: Extração convencional, EA: Extração com autoclave e EU: Extração com sonda de ultrassom.



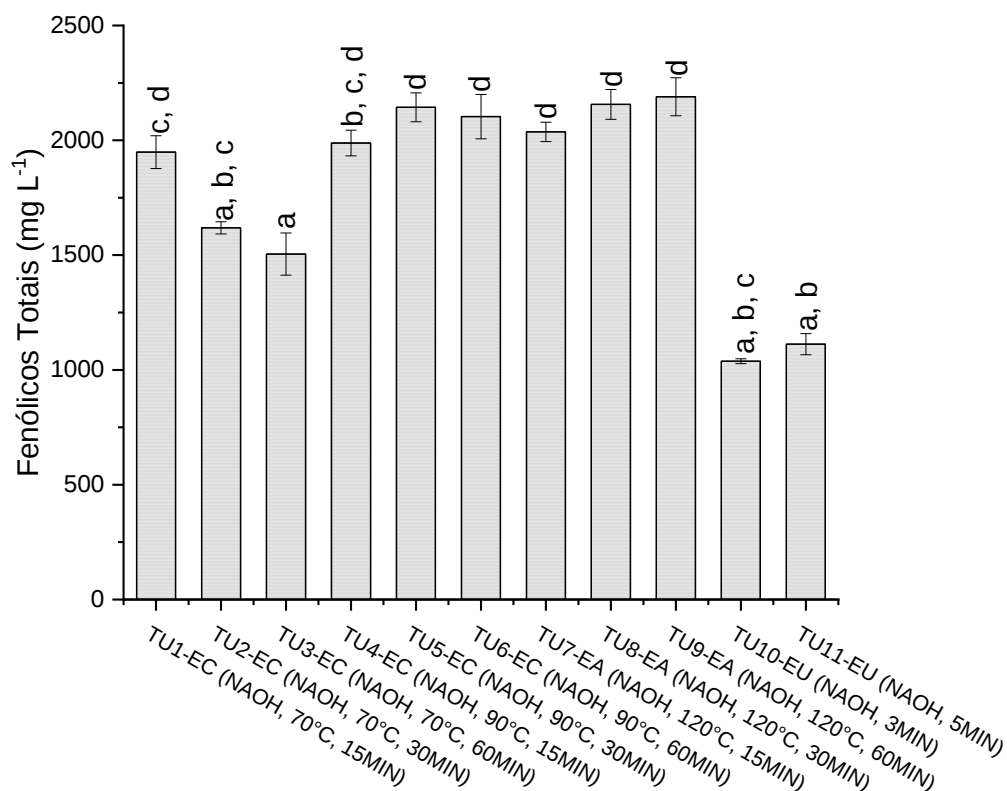
Nota: Diferentes sobrescritos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de extração de acordo com o teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

Os talos de uva são os esqueletos do cacho de uva e são compostos principalmente por lignoceluloses, os quais contém polissacarídeos como celulose e hemiceluloses e fibras como lignina, durante o processo de pré-tratamento as mudanças sofridas pela biomassa tendem a disponibilizar açúcares e lignina fragmentada nos extratos (ATATOPRAK et al., 2022). Conforme observamos os resultados estatísticos apresentados na Figura 10, mostram que maiores concentrações de açúcares redutores totais foram obtidas no tratamento mais longo

a 90°C (TU6); indicando que maiores níveis de açúcares estão correlacionados com a exposição a temperaturas mais altas de exposição da biomassa à solução de extração e não somente ao tempo de extração.

O conteúdo de polifenóis totais foi mensurado nos extratos de talo de uva (Figura 11), as quantidades obtidas são consideravelmente maiores do que foi obtido para o bagaço de cana de açúcar. Os maiores teores de fenólicos totais não se encontram relacionados aos métodos em que se aplica maiores temperaturas, ou seja, extrações convencionais a 90 °C e extrações em autoclave a 120 °C, não apresentando diferença significativa entre os diferentes tempos de extração (15, 30 e 60 minutos,). Neste sentido observa-se que de TU1 realizado a 70 °C não apresenta diferença estatística significativa de TU4, TU5, TU6, TU7, TU8 e TU9.

Figura 11: Valor médio e desvio padrão para o teor de fenólicos totais dos extratos de talos de uva em função dos diferentes procedimentos de extração, onde TU- Talos de uva, EC- Extração convencional, EA- Extração com autoclave e EU- Extração com sonda de ultrassom.



Nota: Diferentes sobrescritos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de extração de acordo com o teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

De acordo com análise de variância (ANOVA), a liberação de compostos fenólicos totais apresentou $p < 0,05$ demonstrando que os valores são significativos ao nível de 95% de confiança. Além disso, a diferença entre as médias demonstrou que as amostras TU1, com a concentração de $1948,3 \text{ mg L}^{-1}$ de compostos fenólicos totais se trataria do melhor método extrativo, pois ainda que $2189,67 \text{ mg L}^{-1}$ foram obtidos em TU9, e a não há diferença significativa entre estas amostras, justificada então pelo fato de que o gasto de energia e equipamentos necessários para obtenção de altas pressões e temperatura levariam à um maior gasto energético como no apresentado para os resultados de obtenção de açúcares.

Sabe-se que o conteúdo de polifenóis totais está diretamente relacionado aos processos de deslignificação, principalmente em condições alcalinas de extração, relatos na literatura como os de Atatoprak e colaboradores (2022), mostram que com 60 minutos de extração em condições alcalinas é possível obter cerca de 50% de deslignificação da biomassa de talos de uva branca. Filippi e colaboradores (2021), durante estudos de aproveitamento de talos e bagaço de uva para produção de ácido succínico, realizou hidrólise alcalina com solução de hidróxido de sódio, que resultou em remoção de lignina de 52%. Assim como Ding e colaboradores (2019) relataram 21,14% de remoção de lignina quando em tratamentos realizados com solução de hidróxido de sódio. Demonstrando que os métodos baseados em álcalis podem remover a lignina com eficiência.

Quando da quantificação dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico não foi identificada presença destes compostos nos extratos resultantes dos procedimentos de extração por isso optou-se em prosseguir para a próxima etapa da pesquisa referente aos testes de conversão destes ácidos com a enzima ácido ferúlico descarboxilase, apenas com a biomassa de bagaço de cana de açúcar. Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, apesar de não obtidos nos tratamentos extrativos realizados neste trabalho já foram relatados para sementes e bagaço de uva, contudo sabe-se que não necessariamente estes dados são indicativos de presença destes compostos nos talos de uva uma vez que os mesmos não foram relatados em estudos com outros métodos de extração (AHMAD et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2014, PING et al, 2011).

Contudo, apesar de não explorado neste estudo, a biomassa de talos de uva tem sido investigada quanto as suas características antimicrobianas, estabilidade

térmica e sua aplicabilidade em biomateriais quando submetida a tratamentos físicos e químicos, conforme estudos apresentados por Engel e colaboradores (2022). Bem como Atatoprak e colaboradores (2021), demonstraram que os talos de uva são viáveis como fontes de lignina, nanocelulose e açúcares fermentáveis como a xilose para a produção de bioetanol; ou ainda como componente de embalagens biodegradáveis de alimentos de baixo teor de umidade (ENGEL; AMBROSI; TESSARO, 2019).

Produção enzimática de 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol a partir de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico de bagaço de cana de açúcar

Devido à ausência dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico na biomassa de talo de uva, esta etapa da investigação foi realizada apenas com biomassa e bagaço de cana de açúcar.

Levando em consideração os resultados estatísticos das análises realizadas quanto aos dados obtidos para extração de ácido ferúlico e o intuito deste trabalho de realizar toda uma caracterização da enzima AFD atuando sobre ácido ferúlico, bem como a busca por um tratamento extrativo simples, de baixo custo e eficiente, de maneira que resulte na menor demanda de equipamentos possível; optou-se por aplicar o extrato enzimático apenas no extrato BCA1-EC NaOH, 70°C, 15MIN.

Quando o extrato de bagaço de cana de açúcar foi submetido a reação enzimática, após 2 minutos de reação obteve-se 48,9 mg L⁻¹ de 4-vinilguaiacol produzido a partir de ácido ferúlico do hidrolisado obtido pelo método de extração convencional a temperatura de 70°C e tempo de 15 minutos (nomeadamente BCA1-EC NaOH, 70°C, 15MIN). Bem como a formação de 354,1 mg L⁻¹ de 4-vinilfenol produzido a partir do ácido *p*-cumárico, demonstrando a atividade da enzima sobre ambos os compostos presentes no meio reacional. Os valores são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Biotransformação enzimática de ácido ferúlico e *p*-cumárico pela enzima heteróloga ácido ferúlico descarboxilase.

Tempo de reação (min.)	Ácido ferúlico (mg L ⁻¹)	4-vinilguaiaicol (mg L ⁻¹)	Ácido <i>p</i> -cumárico (mg L ⁻¹)	4-vinilfenol (mg L ⁻¹)
0	123,35±2,06	-	785,29±13,88	-
2	57,34±5,46	48,97±2,53	492,06±8,95	354,06±8,95
5	39,12±6,57	53,58±5,09	397,61±9,72	437,89±15,09

De acordo com a análise de variância (ANOVA), tanto 4-vinilguaiaicol quanto 4-vinilfenol apresentaram $p < 0,05$, com $F = 245,6$ para 4-vinilguaiaicol e $F = 1579,54$ para 4-vinilfenol, respectivamente. As diferenças das médias, demonstraram que o tempo de reação interfere no resultado das atividades enzimáticas, logo nas conversões de ácido ferúlico em 4-vinilguaiaicol e ácido *p*-cumárico em 4-vinilfenol um maior tempo de reação estará diretamente relacionado há um maior rendimento de produção dos seus respectivos produtos a partir de seus substratos.

Um maior tempo reacional tende a promover maior geração de produto desde que haja presença de substrato, contudo sabe-se que as estruturas enzimáticas sofrem alterações prejudiciais na presença de dados componentes geralmente encontrados nos pré-tratados lignocelulósicos, o que poderia causar perda gradual da capacidade catalítica e redução do rendimento de conversão dos substratos em seus referidos produtos (PEREIRA SCARPA et al., 2019). Neste sentido se fazem necessários estudos mais profundos e direcionados à composição do meio reacional nestas condições e bem como dos possíveis danos sofridos pela estrutura proteica.

Ao final do tempo reacional de 5 minutos obteve-se um rendimento de aproximadamente 43% para ácido ferúlico e 55% para ácido *p*-cumárico. Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico possuem valor em sua forma natural ou biotransformados em 4-vinilguaiaicol e 4-vinilfenol respectivamente, uma vez que suas aplicações são vastas na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Contudo a sua utilização como fonte de *flavours* se mostra convidativa uma vez que insumos produzidos através da aplicação de bioprocessos possuem o *status* legal de produto natural e seguro, e são também alternativas ecologicamente sustentáveis (CARVALHO et al., 2021; PAZ et al., 2016). Atualmente o valor comercial do quilo de ácido ferúlico é de aproximadamente U\$1370,00 e ácido *p*-cumárico é de U\$1360,00; já seus produtos de conversão como o 4-vinilguaiaicol e 4-vinilfenol possuem preços comerciais de

U\$4270,00 e U\$3920,00 (valores aproximados coletados via internet na data de 16/10/2022).

CONCLUSÃO

Para o bagaço de cana de açúcar o teor de açúcares totais moveu-se na faixa de 53,8-118,5 mg L⁻¹, onde os tratamentos com autoclave BCA8 e BCA9, deram origem a extratos com teor de açúcares redutores superior ao dos extratos obtidos por aplicação ultrassônica (BCA10 e BCA11). O conteúdo de polifenóis totais indicou maior liberação com o método de extração solido-liquido com autoclave (BCA9), com 60 minutos a 120°C e 1 atm., liberando um total de 1225,53 mg L⁻¹, este tratamento apresentou diferença estatística significativa dos demais métodos extrativos. Já os menores teores de liberação de fenólicos totais são encontrados para os tratamentos com sonda de ultrassim (BCA10 e BCA11), respectivamente com teores de 650,7 mg L⁻¹ e 721,3 mg L⁻¹, não apresentando diferença estatística significativa entre si.

Os maiores níveis de liberação de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico não são encontrados nos tratamentos com autoclave, e sim nos tratamentos convencionais em temperatura de 70°C, seguido pelo método extrativo convencional a 90°C mostrando que tratamentos extrativos mais agressivos não propiciam maior obtenção dos compostos de interesse.

Enquanto isso, para o talo de uva a maior concentração de açúcares redutores foi de 136,54 mg L⁻¹ obtidos no tratamento TU9, este tratamento não apresentou diferenças estatísticas com relação aos tratamentos TU6 e TU8. Com relação ao teor de compostos fenólicos, maiores concentrações estão relacionadas com maiores temperaturas de extração (90 e 120 °C), não apresentando diferença significativa entre os diferentes tempos de extração (15, 30 e 60 minutos).

Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, provenientes de bagaço de cana de açúcar foram convertidos enzimaticamente em 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol, com rendimentos de aproximadamente 43% e 55% respectivamente; evidenciando alta atividade da enzima recombinante ácido ferúlico descarboxilase sobre o ácido *p*-cumárico, além do ácido ferúlico.

REFERENCIAS

- ABADÍA RETUERTA SA. **¿Qué es el raspón y para qué lo utilizamos? - Abadía Retuerta**. Disponível em: <https://www.abadia-retuerta.com/blog/que-es-el-raspon-y-para-que-lo-utilizamos/>. Acesso em: 5 out. 2021.
- ABBAS, S. R. et al. Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Food Chemistry**, v. 147, p. 10–16, 15 mar. 2014.
- AHMAD, B. et al. Integrated biorefinery approach to valorize winery waste: A review from waste to energy perspectives. *Science of The Total Environment*, v. 719, p. 137315, 1 jun. 2020.
- ASGHER, M. et al. A comprehensive ligninolytic pre-treatment approach from lignocellulose green biotechnology to produce bio-ethanol. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1571–1578, ago. 2014.
- ATATOPRAK, T. et al. Grape stalk valorization for fermentation purposes. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 4, p. 100067, 30 jul. 2022.
- BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91–106, 2014.
- BILAL, M. et al. Environmental impact of lignocellulosic wastes and their effective exploitation as smart carriers – A drive towards greener and eco-friendlier biocatalytic systems *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., , 20 jun. 2020.
- BRASILIA. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. **CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**, v. 8, n. 1, 2021.
- CAO, L. et al. Lignin valorization for the production of renewable chemicals: State-of-the-art review and future prospects. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 dez. 2018.
- CARVALHO, M. J. et al. Potential of sugarcane extracts as cosmetic and skincare ingredients. **Industrial Crops and Products**, v. 169, p. 113625, 1 out. 2021.
- DEL RÍO, J. C. et al. Structural characterization of the lignin from jute (*corchorus capsularis*) fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10271–10281, 11 nov. 2009.
- DEL RÍO, J. C. et al. Structural characterization of the lignin in the cortex and pith of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) stems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 14, p. 3619–3634, 11 abr. 2012a.
- DEL RÍO, J. C. et al. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5922–5935, 13 jun. 2012b.
- DONOHUE, B. S. et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnology and bioengineering*, v. 101, n. 5, p. 913–925, 1 dez. 2008.

ENGEL, J. B.; AMBROSI, A.; TESSARO, I. C. Development of biodegradable starch-based foams incorporated with grape stalks for food packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 225, p. 115234, 1 dez. 2019.

ENGEL, J. B.; LUCHESE, C. L.; TESSARO, I. C. Insights on the properties of physically and chemically treated grape stalks. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 34, p. e00506, 1 dez. 2022.

ESCOBAR-AVELLO, D. et al. Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from grape canes: Comprehensive characterization by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. **Food Research International**, v. 143, p. 110265, 1 maio 2021.

EUGENIO, M. E. et al. Properties versus application requirements of solubilized lignins from an elm clone during different pre-treatments. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 99–111, 30 jun. 2021.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139–8144, 28 jul. 2010.

FAO. **FAO grapes - Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <https://mediabase.fao.org/search/grapes.html>. Acesso em: 14 jan. 2023.

FIDDLER, W. et al. Thermal decomposition of ferulic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 757–761, maio 1967.

FILIPPI, K. et al. Valorisation of grape stalks and pomace for the production of bio-based succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. **Industrial Crops and Products**, v. 168, p. 113578, 15 set. 2021.

NANNI, A. et al. Functionalization and use of grape stalks as poly(butylene succinate) (PBS) reinforcing fillers. **Waste Management**, v. 126, p. 538–548, 1 maio 2021.

OIV. **OIV - The distribution of the world's grapevine varieties**. Disponível em: <https://www.oiv.int/en/oiv-life/the-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties-new-oiv-study-available>. Acesso em: 2 fev. 2022.

OLADI, S.; AITA, G. M. Optimization of liquid ammonia pretreatment variables for maximum enzymatic hydrolysis yield of energy cane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 103, p. 122–132, 1 set. 2017.

PANG, T. et al. Lignin fractionation: Effective strategy to reduce molecule weight dependent heterogeneity for upgraded lignin valorization. **Industrial Crops and Products** Elsevier B.V., , 1 jul. 2021.

PARISI, M.; NANNI, A.; COLONNA, M. Recycling of Chrome-Tanned Leather and Its Utilization as Polymeric Materials and in Polymer-Based Composites: A Review. **Polymers 2021, Vol. 13, Page 429**, v. 13, n. 3, p. 429, 29 jan. 2021.

PAZ, A. et al. *Bacillus aryabhattai* BA03: a novel approach to the production of natural value-added compounds. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 32, n. 10, 1 out. 2016.

PEREIRA, B. et al. High yield biorefinery products from sugarcane bagasse:

Prebiotic xylooligosaccharides, cellulosic ethanol, cellulose nanofibrils and lignin nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 125970, 1 dez. 2021.

PEREIRA SCARPA, J. DE C. et al. Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnopus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 141, p. 111795, 1 dez. 2019.

PING, L. et al. Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial Crops and Products*, v. 33, n. 1, p. 200–204, 1 jan. 2011.

PONNUCHAMY, V. Multiscale modeling studies for exploring lignocellulosic biomass structure. **Advanced Catalysis for Drop-in Chemicals**, p. 257–289, 1 jan. 2022.

REN, N.-Q. et al. A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H₂: Key challenges and new insights. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 92–99, 2016.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, R. et al. Vine-Shoot Waste Aqueous Extracts for Re-use in Agriculture Obtained by Different Extraction Techniques: Phenolic, Volatile, and Mineral Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 45, p. 10861–10872, 12 nov. 2014.

TEIXEIRA, A. et al. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *International journal of molecular sciences*, v. 15, n. 9, p. 15638–15678, 4 set. 2014.

THAMMASITTIRONG, S. N. R. et al. Evaluation of ethanol production from sugar and lignocellulosic part of energy cane. *Industrial Crops and Products*, v. 108, p. 598–603, 1 dez. 2017.

XU, F. et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 207–217, 2005.

YU, Q. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse with liquid hot water and aqueous ammonia. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 210–215, 1 set. 2013.

CONCLUSÕES FINAIS

A partir da cepa de *K pneumoniae* TD 4.7 uma enzima descarboxilase de ácido ferúlico foi identificada, esta enzima foi clonada e expressa heterológamente em *E. coli*, uma vez que foi detectada sua atividade durante o crescimento bacteriano em meio contendo hidrolisado alcalino de bagaço de cana-de-açúcar indicando potenciais de aplicação biotecnológica.

Esta enzima possui pH ótimo 5,5 e temperatura ótima de 40°C para descarboxilação de ácido ferúlico, e sua expressão heteróloga não promoveu alterações em suas características. Observou-se baixa perda de atividade nos testes de estabilidade em diferentes faixas de pH, onde após 24 horas sob temperatura de 25°C e faixa de pH de 4 a 9, manteve aproximadamente 99%; bem como após 720 minutos de incubação a 40°C e pH 5,5, mantendo aproximadamente 80% de sua capacidade catalítica. As análises *in silico* da sequência do gene da ácido ferúlico descarboxilase demonstram um alto grau de conservação para as bactérias do gênero *Klebsiella* (identidade de sequência de 98%).

Os estudos computacionais sobre a estrutura da enzima mostraram ausência de cisteína e pontes dissulfeto, e grandes quantidades de lisina que foram observadas no homodímero a partir dos modelos gerados, o que é favorável ao uso do glutaraldeído como reticulante em futuros processos de imobilização.

Os resíduos envolvidos no ciclo catalítico são os aminoácidos Trp25 e Tyr27 necessários para a entrada e orientação adequada do substrato, e Glu134 e Asn22 participam da transferência de prótons. Ainda com ensaios computacionais verificou-se que a presença de íons Hg^{+2} interagem direta e continuamente com E134 e D22, inviabilizando a atividade enzimática.

Durante os processos extrativos com bagaço de cana de açúcar o teor de açúcares totais moveu-se na faixa de 53,8-118,5 mg L⁻¹, com os tratamentos com autoclave dando origem a extratos com teor de açúcares redutores superior ao dos extratos obtidos por aplicação ultrassônica. O conteúdo de polifenóis totais indicou maior liberação com o método de extração solido-liquido com autoclave (BCA9), liberando um total de 1225,53 mg L⁻¹, este tratamento apresentou diferença estatística significativa dos demais métodos extrativos.

Os maiores níveis de liberação de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico foram obtidos nos tratamentos convencionais em temperatura de 70°C, seguido pelo método extrativo convencional a 90°C mostrando que tratamentos extrativos mais agressivos não propiciam maior obtenção dos compostos de interesse.

Para as extrações realizadas com talo de uva a maior concentração de açúcares redutores foi de 136,54 mg L⁻¹ obtidos no tratamento com autoclave TU9, este tratamento não apresentou diferença estatísticas com relação aos tratamentos TU6 e TU8. Com relação ao teor de compostos fenólicos, maiores concentrações estão relacionadas com maiores temperaturas de extração (90 e 120 °C), não apresentando diferença significativa entre os diferentes tempos de extração (15, 30 e 60 minutos). Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico não foram obtidos nas extrações realizadas com talos de uva.

Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, provenientes de bagaço de cana de açúcar foram convertidos enzimaticamente em 4-vinilguaiaacol e 4-vinilfenol, com rendimentos de aproximadamente 43% e 55% respectivamente; com ênfase para a maior atividade enzimática sobre ácido *p*-cumárico, enfatizando a necessidade de continuidade dos estudos relacionados à atividade desta promissora enzima.

Este estudo demonstrou a possibilidade de aproveitamento da biomassa lignocelulósica como fonte de compostos com aplicação nobre nas indústrias alimentícia e cosméticas.

CONCLUSIONES FINALES

A partir de la cepa de *K. pneumoniae* TD 4.7 se identificó una enzima descarboxilasa del ácido ferúlico, esta enzima fue clonada y expresada heterológamente en *E. coli*, ya que se detectó su actividad durante el crecimiento bacteriano en medio que contenía hidrolizado alcalino de bagazo de caña de azúcar indicando posibles aplicaciones biotecnológicas.

Esta enzima tiene un pH óptimo de 5.5 y una temperatura óptima de 40 °C para la descarboxilación del ácido ferúlico, y su expresión heteróloga no promovió cambios en sus características. Se observó una baja pérdida de actividad en las pruebas de estabilidad a diferentes rangos de pH, donde luego de 24 horas a una temperatura de 25 °C y un rango de pH de 4 a 9, se mantuvo aproximadamente en un 99%; así como tras 720 minutos de incubación a 40 °C y pH 5,5, manteniendo aproximadamente el 80% de su capacidad catalítica. Los análisis *in silico* de la secuencia del gen de la descarboxilasa del ácido ferúlico demuestran un alto grado de conservación para las bacterias del género *Klebsiella* (98% de identidad de secuencia).

Los estudios computacionales sobre la estructura de la enzima mostraron la ausencia de puentes de cisteína y disulfuro, y grandes cantidades de lisina que se observaron en el homodímero de los modelos generados, lo que favorece el uso del glutaraldehído como reticulante en futuros procesos de inmovilización.

Los residuos involucrados en el ciclo catalítico son los aminoácidos Trp25 y Tyr27 necesarios para la correcta entrada y orientación del sustrato, y Glu134 y Asn22 participan en la transferencia de protones. Aún con pruebas computacionales se comprobó que la presencia de iones Hg^{+2} interactúan directa y continuamente con E134 y D22, haciendo inviable la actividad enzimática.

Durante los procesos extractivos con bagazo de caña de azúcar, el contenido de azúcares totales se movió en el rango de 53,8-118,5 mg L⁻¹, originándose los tratamientos en autoclave extractos con un contenido de azúcares reductores superior al de los extractos obtenidos por aplicación de ultrasonidos. El contenido de polifenoles totales indicó mayor liberación con el método de extracción sólido-líquido con autoclave (BCA9), liberando un total de 1225.53 mg L⁻¹, este tratamiento mostró una diferencia estadísticamente significativa con los demás métodos extractivos.

Los mayores niveles de liberación de ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico se obtuvieron en los tratamientos convencionales a una temperatura de 70 °C, seguido del método extractivo convencional a 90 °C, demostrando que los tratamientos extractivos más agresivos no proporcionan una mayor obtención de los compuestos de interés.

Para las extracciones realizadas con raspón de uva, la mayor concentración de azúcares reductores fue de 136,54 mg L⁻¹ obtenida en el tratamiento autoclave TU9, este tratamiento no presentó diferencia estadística con relación a los tratamientos TU6 y TU8. En cuanto al contenido de compuestos fenólicos, mayores concentraciones se relacionan con mayores temperaturas de extracción (90 y 120 °C), sin diferencia significativa entre los diferentes tiempos de extracción (15, 30 y 60 minutos). Los ácidos ferúlico y *p*-cumárico no se obtuvieron en las extracciones realizadas con raspón de uva.

Los ácidos ferúlico y *p*-cumárico del bagazo de caña de azúcar se convirtieron enzimáticamente en 4-vinilguayacol y 4-vinilfenol, con rendimientos de aproximadamente 43% y 55% respectivamente; con énfasis en la mayor actividad enzimática sobre el ácido *p*-cumárico, destacando la necesidad de continuidad de estudios relacionados con la actividad de esta prometedora enzima.

Este estudio demostró la posibilidad de utilizar biomasa lignocelulósica como fuente de compuestos con noble aplicación en la industria alimentaria y cosmética.

ANEXO 1

Sequências da enzima AFDase para o gênero *Klebsiella* e alinhamento

A seguir estão demonstradas as sequências obtidas em banco de dados e alinhamento do gene da enzima ácido ferúlico descarboxilase disponíveis para o gênero de *Klebsiella*.

>K.Aeruginosa

```
ATGAGCACTTTTGACAAACATGACCTCAGCGGCTTTATCGGTAAACATCTGGTTTATACCTACGACAACGGCTGG
AACTACGAAATTTACGTTAAAAATGGCACCACCTCTGGACTATCGTATTCACAGCGGTATCGTTGCTAATCGTTGG
GTGAAAGACCAGCATGCGTACATCGTGCGGGTAGGCGAAAGCATTTATAAAATTTCCCTGGACTGAACCAACCGGT
ACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGACAAACTGTTCCACGGCACCATTTTCTTCCCCCGCTGGATCATG
AATAACCCGGAAAAAACCGTCTGCTTCCAGAACGATCATATTCGTTAATGAACGCCTATCGTGACGCCGGCCCCG
GCCTACCCGACCGAAGTGATTGATGAATTCGCGACTATCACCTTTGTTTCGCGATTGCGGCGCGGATAATAACGAT
GTAATTAATTGCCCCGGCTAATGAATTACCCGCAGATTTTCTTGCAAATTTGTAA
```

>K.pneumoniaeBIDMC31

```
ATGATGAGCACTTTTCGACAAACATGACCTCGGCGGGCTTTATCGGTAAACATCTGGTCTATACCTACGACAACGGC
TGGAATACGAGATTTACGTCAAAAATGGCCACACCCCTCGACTACCGTATTCACAGCGGCATCGTCGGCAATCGC
TGGGTGAAAGATCAGGAAGCGTACATTGTGCGGGTGGGGGAAAGTATCTACAAAATCTCCTGGACCGAACCAGACC
GGCACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGACAAACTATTCACGGCACTATTTTCTTCCCGCGCTGGATC
ATGAATAACCCGGAAAAAACCATCTGCTTCCAGAACGACCATATTCGCTGATGAATTCGTATCGCGATGCCGGC
CCGGCCTACCCGACCGAAGTGATTGACGAGTTCGCCACTATCACCTTCATTCGCGACTGTGGCGCGGATAATGAC
GAGGTCATTAATTGCCCCGGCGAGCGAATTGCCTGCGGATTTTCTTGCAAATTTGTAA
```

>K.aerogenesUCI15

```
ATGAGCACTTTTCGACAAACATGACCTCAGCGGCTTTATCGGTAAACATCTGGTTTATACCTACGACAACGGCTGG
AACTACGAAATTTACGTTAAAAATGGCACCACCTCTGGACTATCGTATTCACAGCGGTATCGTTGCCAATCGTTGG
GTGAAAGACCAGCATGCGTACATCGTGCGGGTAGGCGAAAGCATTTATAAAATTTCCCTGGACTGAACCAACCGGT
ACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGACAAACTGTTCCACGGCACCATATTCTTCCCCCGCTGGATCATG
AATAACCCGGAAAAAACCGTCTGCTTCCAGAACGATCATATTCGTTAATGAACGCCTATCGTGACGCCGGCCCCG
GCCTACCCGACCGAAGTGATTGATGAATTCGCGACTATCACTTTTGTTCGCGATTGCGGCGCGGATAATAACGAT
GTTATTAATTGCCCCGGCTAATGAATTACCCGCAGATTTTCTTGCAAATTTGTAA
```

>K.aerogenesUCI16

```
ATGAGCACTTTTCGACAAACATGACCTCAGCGGCTTTATCGGTAAACATCTGGTTTATACCTACGACAACGGCTGG
AACTACGAAATTTACGTTAAAAATGGCACCACCTCTGGACTATCGTATTCACAGCGGTATCGTTGCCAATCGTTGG
GTGAAAGACCAGCATGCGTACATCGTGCGGGTAGGCGAAAGCATTTATAAAATTTCCCTGGACTGAACCAACCGGT
ACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGACAAACTGTTCCACGGCACCATATTCTTCCCCCGCTGGATCATG
AATAACCCGGAAAAAACCGTCTGCTTCCAGAACGATCATATTCGTTAATGAACGCCTATCGTGACGCCGGCCCCG
GCCTACCCGACCGAAGTGATTGATGAATTCGCGACTATCACTTTTGTTCGCGATTGCGGCGCGGATAATAACGAT
GTTATTAATTGCCCCGGCTAATGAATTACCCGCAGATTTTCTTGCAAATTTGTAA
```

>K.aerogenesUCI28

```
ATGAGCACTTTTGACAAACATGACCTCAGCGGTTTTATCGGTAAACATCTGGTTTATACCTACGACAACGGCTGG
AACTACGAAATTTACGTTAAAAATGGCACCACCTCTGGACTATCGTATTCACAGCGGTATCGTTGCTAATCGTTGG
GTGAAAGACCAGCATGCGTACATCGTGCGGGTAGGCGAAAGCATTTATAAAATTTCCCTGGACTGAACCAACCGGT
ACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGACAAACTGTTCCACGGCACCATATTCTTCCCCCGCTGGATCATG
```

AATAACCCGGAAAAAACCGTCTGCTTCCAGAACGATCATATTCCGTAAATGAACGCTTATCGTGACGCCGGCCCCG
GCCTACCCGACCGAAGTGATTGATGAATTCGCGACTATCACCTTTGTTTCGCGATTGCGGCGCGGATAATAACGAT
GTAATTAATTGCCCCGCTAATGAATTACCCGCAGATTTTCCTGCAAATTTGTAA

>K.aerogenesUCI27

ATGAGCACTTTTGACAAACATGACCTCAGCGGTTTTATCGGTAAACATCTGGTTTATACCTACGACAACGGCTGG
AACTACGAAATTTACGTAAAAATGGCACCCTCTGGACTATCGTATTCACAGCGGTATCGTTGCTAATCGTTGG
GTGAAAGACCAGCATGCGTACATCGTGCGGGTAGGCGAAAGCATTATATAAAATTTCCCTGGACTGAACCAACCGGT
ACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGACAACTGTTCCACGGCACCATATTCTTCCCCCGCTGGATCATG
AATAACCCGGAAAAAACCGTCTGCTTCCAGAACGATCATATTCCGTAAATGAACGCTTATCGTGACGCCGGCCCCG
GCCTACCCGACCGAAGTGATTGATGAATTCGCGACTATCACCTTTGTTTCGCGATTGCGGCGCGGATAATAACGAT
GTAATTAATTGCCCCGCTAATGAATTACCCGCAGATTTTCCTGCAAATTTGTAA

>K.aerogenesUCI45

ATGAGCACTTTTGACAAACATGACCTCAGCGGTTTTATCGGTAAACATCTGGTTTATACCTACGACAACGGCTGG
AACTACGAAATTTACGTAAAAATGGCACCCTCTGGACTATCGTATTCACAGCGGTATCGTTGCTAATCGTTGG
GTGAAAGACCAGCATGCGTACATCGTGCGGGTAGGCGAAAGCATTATATAAAATTTCCCTGGACTGAACCAACCGGT
ACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGACAACTGTTCCACGGCACCATATTCTTCCCCCGCTGGATCATG
AATAACCCGGAAAAAACCGTCTGCTTCCAGAACGATCATATTCCGTAAATGAACGCTTATCGTGACGCCGGCCCCG
GCCTACCCGACCGAAGTGATTGATGAATTCGCGACTATCACCTTTGTTTCGCGATTGCGGCGCGGATAATAACGAT
GTAATTAATTGCCCCGCTAATGAATTACCCGCAGATTTTCCTGCAAATTTGTAA

>K.aerogenesUCI46

ATGAGCACTTTTCGACAAACATGACCTCAGCGGCTTTATCGGTAAACATCTGGTTTATACCTACGACAACGGCTGG
AACTACGAAATTTACGTAAAAATGGCACCCTCTGGACTATCGTATTCACAGCGGTATCGTTGCCAATCGTTGG
GTGAAAGACCAGCATGCGTACATCGTGCGGGTAGGCGAAAGCATTATATAAAATTTCCCTGGACTGAACCAACCGGT
ACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGACAACTGTTCCACGGCACCATATTCTTCCCCCGCTGGATCATG
AATAACCCGGAAAAAACCGTCTGCTTCCAGAACGATCATATTCCGTAAATGAACGCTTATCGTGACGCCGGCCCCG
GCCTACCCGACCGAAGTGATTGATGAATTCGCGACTATCACTTTTGTTCGCGATTGCGGCGCGGATAATAACGAT
GTTATTAATTGCCCCGCTAATGAATTACCCGCAGATTTTCCTGCAAATTTGTAA

>K.aerogenesUCI47

ATGAGCACTTTTCGACAAACATGACCTCAGCGGCTTTATCGGTAAACATCTGGTTTATACCTACGACAACGGCTGG
AACTACGAAATTTACGTAAAAATGGCACCCTCTGGACTATCGTATTCACAGCGGTATCGTTGCCAATCGTTGG
GTGAAAGACCAGCATGCGTACATCGTGCGGGTAGGCGAAAGCATTATATAAAATTTCCCTGGACTGAACCAACCGGT
ACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGACAACTGTTCCACGGCACCATATTCTTCCCCCGCTGGATCATG
AATAACCCGGAAAAAACCGTCTGCTTCCAGAACGATCATATTCCGTAAATGAACGCTTATCGTGACGCCGGCCCCG
GCCTACCCGACCGAAGTGATTGATGAATTCGCGACTATCACTTTTGTTCGCGATTGCGGCGCGGATAATAACGAT
GTTATTAATTGCCCCGCTAATGAATTACCCGCAGATTTTCCTGCAAATTTGTAA

>K.oxytoca

ATGATGAGCACTTTTCGACAAACATGACCTCAGCGGCTTTATCGGTAAACATCTGGTCTATACCTACGACAACGGC
TGGAACCTACGAGATTTACGTCAAAAAATGGCCGACCCCTCGACTACCGTATTCACAGCGGCATCGTCGGCAATCGC
TGGGTGAAAGATCAGGAAGCGTACATTGTGCGGGTGGGGGAAAGTATCTACAAAATCTCCTGGACCGAACCACC
GGCACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGACAACTGTTCCACGGCACTATTTTCTTCCCCGCGCTGGATC
ATGAATAACCCGGAAAAAACTATCTGCTTCCAGAACGACCATATTCGCTGATGAATTCGTATCGCGATGCCGGC
CCGGCTACCCGACCGAAGTGATTGACGAGTTCGCCACTATCACCTTCATTCGCGACTGTGGCGCGGATAATGAC
GAGGTCATTAATTGCCCGGCGAGCGAATTGCCTGCGGATTTTCCTGCAAATTTGTAA

>K.quasipneumoniaesubsp.similipneumoniae

ATGATGAGCACTTTTCGACAAACATGACCTCAGCGGCTTTATCGGTAAACATCTGGTCTACACCTACGACAACGGC
TGGAACCTACGAAATTTACGTCAAAAAATGGCCACACCCTCGACTACCGTATTCACAGCGGCATCGTCGGCAATCGC
TGGGTGAAAGATCAGGAAGCGTACATCGTGCGGGTGGGGGAAAGTATCTACAAAATCTCCTGGACCGAGCCGACC
GGTACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGATAAACTGTTCCACGGCACCATCTTCTTCCCCGCGCTGGATC

Figura 19: Alinhamento onde “*” indica similaridade e “.” Indica divergência nas bases.

```

K.aerogenesUCI46      -MSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GTTLDYRIHSGIVANR
K.aerogenesUCI47      -MSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GTTLDYRIHSGIVANR
K.aerogenesUCI45      -MSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GTTLDYRIHSGIVANR
K.aerogenesUCI28      -MSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GTTLDYRIHSGIVANR
K.aerogenesUCI27      -MSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GTTLDYRIHSGIVANR
K.aerogenesUCI16      -MSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GTTLDYRIHSGIVANR
K.aerogenesUCI15      -MSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GTTLDYRIHSGIVANR
K.aerogenes           -MSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GTTLDYRIHSGIVANR
K.pneumoniaeBIDMC31   MMSTFDKHDLG GFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GHTLDYRIHSGIVG NR
K.oxytoca             MMSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GR TLDYRIHSGIVG NR
K.quasipneumoniaesubsp.similip MMSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVVKN GHTLDYRIHSGIVG NR
*****

```

K.aerogenesUCI46
K.aerogenesUCI47
K.aerogenesUCI45
K.aerogenesUCI28
K.aerogenesUCI27
K.aerogenesUCI16
K.aerogenesUCI15
K.aerogenes
K.pneumoniaeBIDMC31
K.oxytoca
K.quasipneumoniaesubsp.similip

K.aerogenesUCI46
K.aerogenesUCI47
K.aerogenesUCI45
K.aerogenesUCI28
K.aerogenesUCI27
K.aerogenesUCI16
K.aerogenesUCI15
K.aerogenes
K.pneumoniaeBIDMC31
K.oxytoca
K.quasipneumoniaesubsp.similip

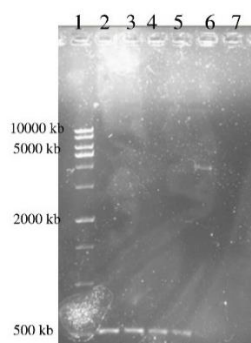
Fonte: autor.

ANEXO 2

Extração de DNA total e obtenção do gene da ácido ferúlico descarboxilase para construção do plasmídeo de clonagem e plasmídeo de expressão

Após a extração do DNA total do microrganismo, antemão aos procedimentos principais de clonagem e expressão heteróloga, foram realizados testes de amplificação com os dois primers *foward* disponíveis (Tabela 3), e através de observação/quantificação visual conforme Figura 20, optou-se por realizar as reações *PCR* com o primer *foward* Pad2_For.

Figura 20: Gel de teste e seleção de *primers*, onde as amostras são 1 - marcador 1kb, 2 - Primer Pad2_For, 3 – Primer Pad2_For, 4 - Primer Pad1_For, 5 - Primer Pad1_For, 6 – Controle negativo Primer Pad2_For, 7 – Controle negativo Pad1_For.

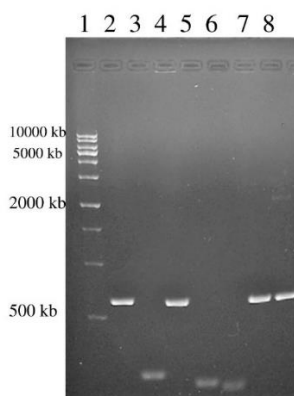


Fonte: autor.

Com base nestes resultados e na visualização das bandas, foi possível observar eficiência de amplificação do *primer* correspondente.

Após a seleção e amplificação do gene de interesse, a construção do plasmídeo de clonagem pJET/blunt_AFDKP foi realizada e seguindo-se os procedimentos para identificar das colônias de *E. coli* Dh5α que possuíam o plasmídeo com o gene de clonagem, conforme se observa na Figura 4, em que clones aleatórios foram submetidos a reação de *PCR* de colônia para verificação da presença de amplificação do gene de interesse.

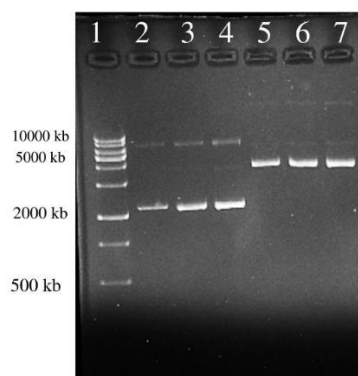
Figura 21: Gel das reações de PCR para de seleção de clones em que plasmídeo de clonagem (pJET/blunt) continha o gene de interesse. Amostras 1 - marcador 1kb, 2 - clone 7, 3 - clone 4, 4 - clone 2, 5 - clone 9, 6 - clone 8, 7 - clone 1, 8 - clone 3.



Fonte: autor.

Com base na identificação dos clones que continham o gene de clonagem, foi selecionada uma das colônias de *E. coli* Dh5 α e a propagação do plasmídeo de clonagem que continha o inserto foi iniciada por cultivo das células e extração do DNA, conforme descrito na metodologia. A Figura 22 mostra gel de agarose com amostras do plasmídeo de clonagem na presença do inserto, que foi utilizado para procedimento de excisão do gene de interesse e posterior inserção no plasmídeo de expressão. Na Figura 22 é possível observar também o plasmídeo pET28a(+) vazio que foi utilizado para inclusão do gene de interesse no processo de expressão.

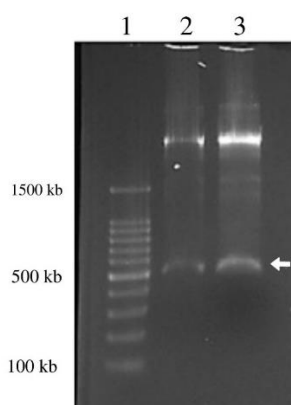
Figura 22: Gel de agarose extração e análise da qualidade dos plasmídeos, sendo amostras 1 - marcador 1 kb, 2 - pJET/blunt + inserto, 3 - pJET/blunt + inserto, 4 - pJET/blunt + inserto, 5 - pET28a(+) vazio, 6 - pET28a(+) vazio, 7 - pET28a(+) vazio.



Fonte: autor.

O plasmídeo de clonagem que continha o inserto e o plasmídeo de expressão foram submetidos ao processo de digestão conforme descrito em metodologia, obtendo-se o gene livre e com cortes complementares ao plasmídeo de expressão. Na Figura 23 é possível observar o resultado da digestão em gel de agarose do plasmídeo pJET/blunt_AFDKP com o gene de interesse (seta).

Figura 23: Gel de agarose para separação e purificação dos fragmentos após digestão do plasmídeo de clonagem, sendo amostras 1 - marcador 100 pb, 2 - mistura digestão (10µl), 3 - mistura digestão (20 µl).



Fonte: autor.

As bandas indicadas no gel de agarose demonstrado na Figura 23 foram purificadas de acordo com a metodologia descrita, e submetidas a reação de ligação ao plasmídeo pET28a(+) também excisado com as referidas enzimas de restrição. Os plasmídeos resultantes desta reação de ligação, nomeados como pET28a(+)_AFDKP, foram inseridos em uma cepa de *E.coli* DH5α de acordo com a

metodologia descrita para transformação. Após o cultivo em placa de petri com meio LB acrescido de Canamicina foi possível observar o crescimento de cepas que continham o plasmídeo pET28a(+)_AFDKP.

Com os devidos procedimentos e após a confirmação da presença do gene de interesse na célula receptora, uma colônia selecionada foi submetida a cultivo para propagação e purificação do plasmídeo pET28a(+)_AFDKP, conforme metodologia descrita.

Análise da sequência

O amplificado de PCR do gene da ácido ferúlico descarboxilase de *K. pneumoniae* TD 4.7 foi clonado no vetor de clonagem pJET/blunt e em seguida inserido no vetor de expressão nomeado pET28a(+)_AFDKP, neste momento o inserto foi sequenciado. O resultado do sequenciamento foi analisado quanto à sua qualidade (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), demonstrando sequencias de ótima qualidade (Figura 24), o que permitiu a continuidade das análises e montagem do *contig* através do CAP3 (Anexo 2).

Figura 24: Tabela de qualidade das sequencias obtidas.

Quality table of: SEQ-B822_C05_MS01-R_043.zip

Number of Reads: 2

Read number	Total of bases	# Bases with quality > 20	# Bases with quality > 30	% Vector	> 100 bases & quality > 20
☒ SEQ-B822_B05_MS01-F2_045.ab1	1460	740 (51%)	633 (43%)	29 1s%[%]	Ok
☒ SEQ-B822_C05_MS01-R_043.ab1	1409	754 (54%)	692 (49%)	30 1s%[%]	Ok
Total	2869	1494 (52%)	1325 (46%)	No. 0	Ok: 2

Cluster sequences using CAP3 for checked reads Show RTF files for checked reads Show SCF files for checked reads

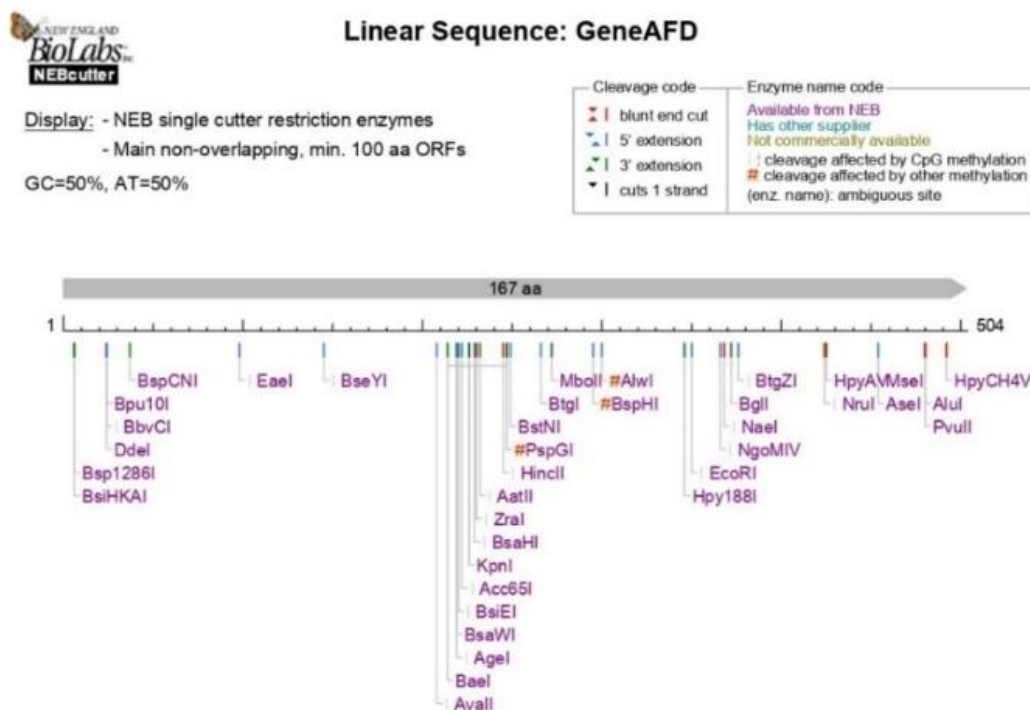
Developed by: Roberto Togawa
Marcelo Brígida

Fonte: autor.

Os sítios de restrição presentes na sequência de nucleotídeos foram identificados através do NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), onde foi possível observar que a mesma não apresenta sítios de restrição para as enzimas

utilizadas no processo de montagem dos plasmídeos de clonagem e expressão (Figura 25).

Figura 25: Análise dos sítios de restrição encontrados na sequência de nucleotídeos.



Fonte: autor.

Os resultados da análise da sequência AFDKP indicaram que o gene da enzima continha uma região “*open reading frame*” (ORF) iniciada com códon ATG e terminado com um códon de terminação TAA. A ORF do gene da ácido ferúlico descarboxilase isolada, consiste em 504 nucleotídeos codificando uma proteína de 167 aminoácidos, apresentando a predição de massa molar de 22 kDa conforme junção dos homo-dímeros que compõem a conformação total da proteína.

Gu e colaboradores (2011), em estudos de clonagem e expressão heteróloga com o gene de uma ácido ferúlico descarboxilase da cepa *Enterobacter sp.* encontraram um gene composto por 507 nucleotídeos que compõem uma proteína de 168 resíduos de aminoácidos. Bem como Cavin e colaboradores (1998), observaram para uma cepa de *Bacillus subtilis*, um gene composto por 528 pares de base que compõem uma proteína de 161 aminoácidos.

A sequência do gene AFDKP foi comparada com sequências disponíveis no

GenBank usando os programas BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A sequência de aminoácidos apresentou 98,80% de similaridade com a sequência da enzima ácido fenólico descarboxilase de *K. variicola* e 98,20% de similaridade com a sequência da enzima ácido fenólico descarboxilase de *K. quasipneumoniae* (número de acesso GenBank AJA94554.1 e WP_181961074.1, respectivamente) conforme alinhamento a seguir:

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

WP_181961074.1      MMSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVKNGHTLDYRIHSGIVGNRWVKDQEAYIV
AJA94554.1          -MSTFDKHDLSGFIGKHLVYTYDNGWNYEIVKNGHTLDYRIHSGIVGNRWVKDQEAYIV
AFDKP               -MSTFDKHDLSGFIGKHKYTYDNGWNYEIVKNGHTLDYRIHSGIVGNRWVKDQEAYIV
                      *****
WP_181961074.1      RVGESIYKISWTEPTGTDVSLIVNLGDKLFHGTIFFPRWIMNNEKTVCFQNDHIPLMNS
AJA94554.1          RVGESIYKISWTEPTGTDVSLIVNLGDKLFHGTIFFPRWIMNNEKTVCFQNDHIPLMNS
AFDKP               RVGESIYKISWTEPTGTDVSLIVNLGDKLFHGTIFFPRWIMNNEKTVCFQNDHIPLMNS
                      *****
WP_181961074.1      YRDAGPAYPTEVIDEFATITFIRDCGADNDEVINCPASELPADFPAN-
AJA94554.1          YRDAGPAYPTEVIDEFATITFIRDCGADNDEVINCPASELPADFPANL
AFDKP               YRDAGPAYPTEVIDEFATITFIRDCGADNDEVINCPASELPADFPANL
                      *****

```

A sequência de aminoácidos foi analisada com ferramentas do EXPASY (<http://expasy.org/>), demonstrada no Anexo 2. As análises subsequentes da sequência de aminoácidos indicaram que se trata de uma ácido fenólico descarboxilase pertencente a superfamília de descarboxilases de ácido fenólico (Figura 26).

Figura 26: Análise de comparação da sequência de aminoácidos com as sequencias de aminoácidos disponíveis no banco de dados GenBank NCBI.



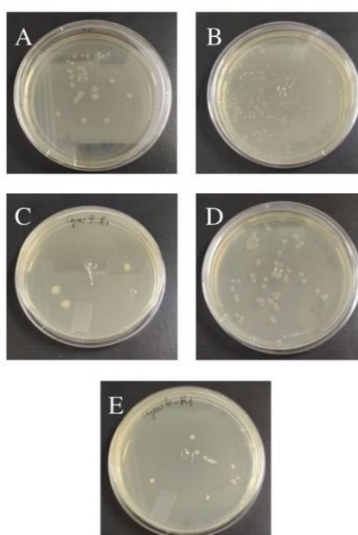
Fonte: autor.

Em análise complementar, a sequência de aminoácidos foi submetida a ferramenta ProtParam (<http://expasy.org/protparam>), na análise teórica demonstrando uma sequência de 167 aminoácidos na unidade dimérica e massa molar de aproximadamente 22 kDa, com ponto isoelétrico de 5,12.

Transformação de diferentes linhagens de *Escherichia coli* para expressão

Os plasmídeos pET28a(+)_AFDKP obtidos na etapa de propagação foram utilizados para transformar as cepas de *E. coli* BL21 Star; *E. coli* Rosetta-gami, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* Origami, *E. coli* Artic Express. Após transformação as cepas foram submetidas a cultivo em meio LB acrescido de canamicina (Figura 27), para posterior seleção de clones aleatórios que foram submetidos a confirmação por PCR da presença do inserto e testes de expressão da proteína de interesse.

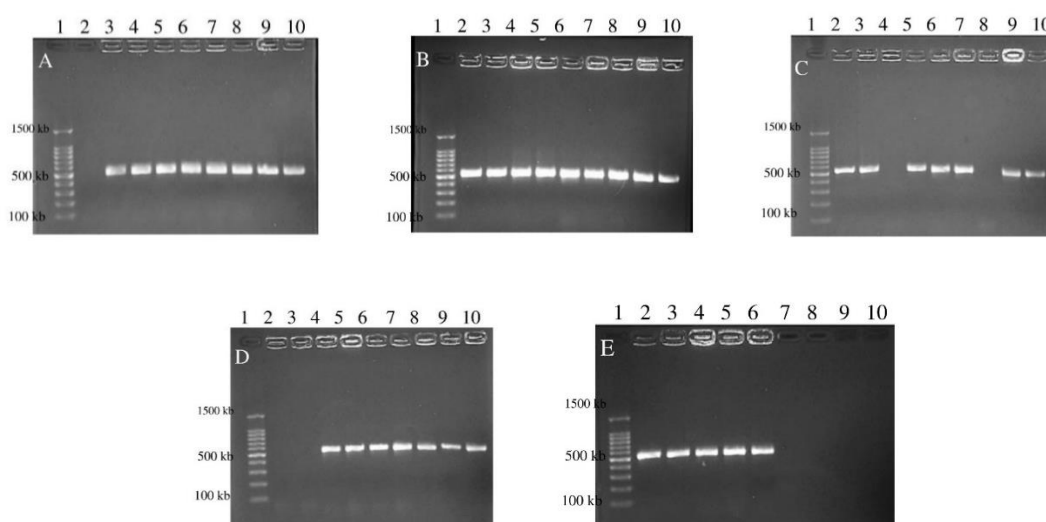
Figura 27: Cultivo das cepas transformadas em placa meio com Canamicina para detecção de indivíduos com o plasmídeo pET28a(+)_AFDKP, onde A – *E. coli* BL21 Star; B – *E. coli* Rosetta-gami; C – *E. coli* BL21(DE3); D- *E. coli* Origami, E- *E. coli* Artic Express.



Posterior ao cultivo em placa de Petri, colônias aleatórias foram selecionadas e submetidas a PCR para confirmação da presença do gene de interesse na cepa

de expressão. Os resultados de confirmação da presença do inserto estão demonstrados na Figura 28.

Figura 28: Gel de agarose para visualização dos testes de confirmação da presença do gene de interesse, onde A – PCR colônia de *E. coli* BL21 Star; B – PCR colônia de *E. coli* Rosetta-gami; C – PCR colônia de *E. coli* BL21(DE3); D- PCR colônia de *E. coli* Origami, E- PCR colônia de *E. coli* Artic Express.



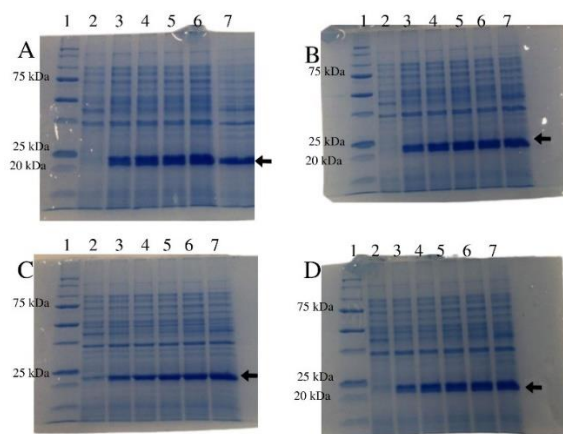
Fonte: autor.

Dos clones confirmados, foram selecionados aleatoriamente exemplares para os testes de expressão e seleção da cepa mais adequada aos processos de expressão de proteína em sua forma solúvel, chegando-se a conclusão que a cepa *E. coli* BL21(DE3), demonstrada nas figuras abaixo (Figuras 29, 30, 31 e 32). Esta decisão foi tomada devido as características gerais dos lisados celulares após o processo de testes com diferentes condições de indução que demonstraram lisados muito mais limpos para a cepa *E. coli* BL21(DE3), que foi então submetida a testes para identificação das melhores condições de expressão da proteína recombinante em volumes maiores.

Otimização de expressão e extração da proteína recombinante

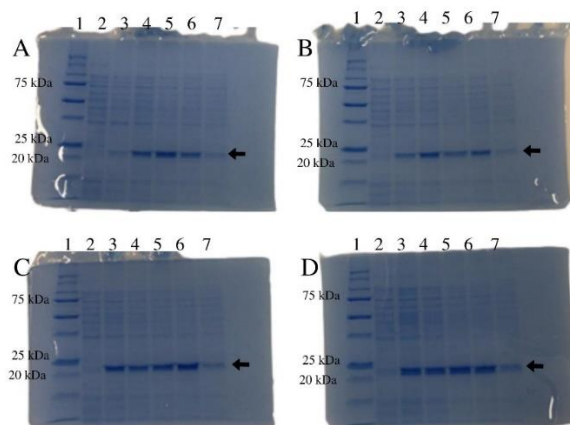
Nesta etapa do trabalho procedeu-se com a otimização das condições de expressão da proteína de interesse, onde observou-se que a cepa *E. coli* BL21(DE3) produzia maior quantidade de enzima insolúvel com temperatura de expressão a 37°C, em diferentes períodos de expressão a partir da indução com IPTG. Tais resultados estão demonstrados nas Figuras 29, 30, 31 e 32.

Figura 29: Géis de teste de expressão a 37 °C da cepa *E. coli* BL21(DE3), fração insolúvel. Contração de IPTG: A - 0.1 mM, B - 0.2 mM, C - 0.3 mM e D - 0.5 mM. Amostras organizadas por tempo: 1 – marcador, 2 – tempo 0 horas (sem indução), 3 – 2 horas, 4 – 4 horas, 5 – 6 horas, 6 – 12 horas e 7 – 24 horas de indução.



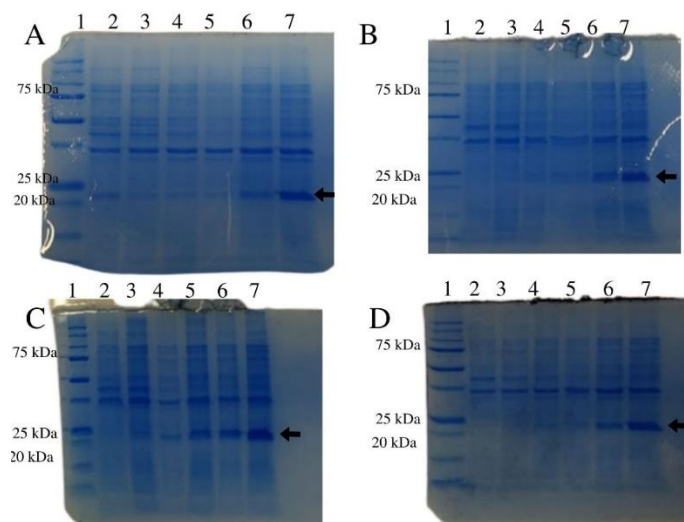
Fonte: autor.

Figura 30: Géis de teste de expressão a 37 °C da cepa *E. coli* BL21(DE3), fração solúvel. Contração de IPTG: A - 0.1 mM, B - 0.2 mM, C - 0.3 mM e D - 0.5 mM. Amostras organizadas por tempo: 1 – marcador, 2 – tempo 0 horas (sem indução), 3 – 2 horas, 4 – 4 horas, 5 – 6 horas, 6 – 12 horas e 7 – 24 horas de indução



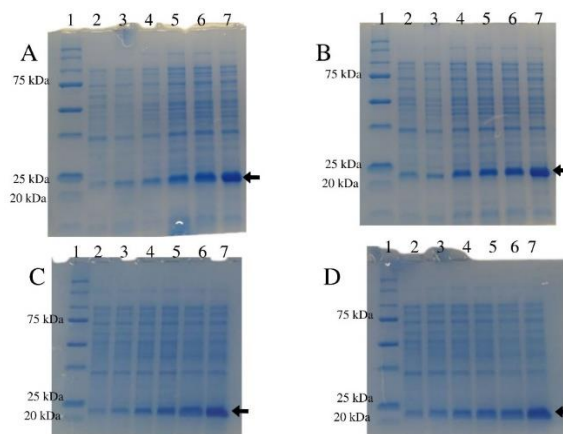
Fonte: autor.

Figura 31: Géis de teste de expressão a 20 °C da cepa *E. coli* BL21(DE3), fração insolúvel. Contração de IPTG: A - 0.1 mM, B - 0.2 mM, C - 0.3 mM e D - 0.5 mM. Amostras organizadas por tempo: 1 – marcador, 2 – tempo 0 horas (sem indução), 3 – 2 horas, 4 – 4 horas, 5 – 6 horas, 6 – 12 horas e 7 – 24 horas de indução



Fonte: autor.

Figura 32: Géis de teste de expressão a 20 °C da cepa *E. coli* BL21(DE3), fração solúvel, Contração de IPTG: A - 0.1 mM, B - 0.2 mM, C - 0.3 mM e D - 0.5 mM. Amostras organizadas por tempo: 1 – marcador, 2 – tempo 0 horas (sem indução), 3 – 2 horas, 4 – 4 horas, 5 – 6 horas, 6 – 12 horas e 7 – 24 horas de indução



A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE revelou que a proteína migra em banda única, com massa molar de aproximadamente 22 kDa. O que culmina com as análises de massa molar da sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Após os testes de condição de indução observou-se que a enzima recombinante era melhor expressa na fração solúvel quando a cepa recombinante era submetida a expressão a 20°C, e induzida com 0,2 mM de IPTG.

As outras cepas foram testadas nas mesmas condições, e por opção de extratos mais limpos e proporção de enzima na fração solúvel, optou-se por trabalhar com a cepa *E. coli* BL21(DE3). Uma vez que tal fato pode estar relacionado a questão da cepa ser projetada para tal plasmídeo de expressão.

ANEXO 3

Gene da enzima ácido ferúlico descarboxilase

Após sequenciamento, o material recebido foi utilizado para a geração do *Contig1*, através da ferramenta virtual CAP3.

>Contig1

```
AAGCAGCCCATTAGTAGGTTGGGGCAGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCAAGA
AAGGAGAGGGCGCCCCAACAGTCCCCCGGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAA
ACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCCATCGGTGATGTCGGCGA
TATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGT
AGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGC
GGATAACAATTCCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGG
GCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGG
CTAGCATGATGAGCACTTTCGACAAACATGACCTCAGCGGCTTTATCGGTAAACATAAAAA
AATACACCTACGACAACGGCTGGAACCTACGAAATTTACGTCAAAAACGGCCACACCCCTCG
ACTACCGTATTACAGCGGCATCGTCGGCAATCGCTGGGTGAAAGATCAGGAAGCGTACA
TCGTGCGGGTGGGGGAAAAGTATCTACAAAAATCTCATGGACCGAACCAGCCGGTACCGACG
TCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGATAAACTGTTCCACGGCACCATTTTCTTCCCGCGCT
GGATCATGAATAACCCGGAAAAAACCGTCTGCTTCCAGAACGATCACATTCTCTGATGA
ATTTCGTACCGCGATGCCGGCCCGGCCTACCCGACGGAAGTGATTGACGAGTTTGCTACTA
TCACCTTCATTTCGCGACTGTGGCGCGGATAATGACGAGGTTATTAATTGCCCGGCAAGTG
AATTGCCAGCTGATTTTCCTGCAAATTTGTAAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAG
CTTGCGGGCCGCACTCGAGCACCAACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCC
CGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGG
GCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTGGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATTGGCG
AATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAACG
TGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTTCCTTTTCGCTTTTCTTCCCTTTCTCT
TTCTCCCCACGTTTCGCGGCTTTCCCCGTTAAGCTCTTAAATCGGGGGCTCCCTTTTAGG
TTTCCGAATTTATTGCTTTCCGGCCCCCTCCAACCCCAAAAACTTGATTTAGGG
```

O gene da ácido ferúlico descarboxilase foi separado e apresentado abaixo.

>GeneAFD

```
ATGAGCACTTTCGACAAACATGACCTCAGCGGCTTTATCGGTAAACATAAAAAATACACCTACGACAACGGCT
GGAACCTACGAAATTTACGTCAAAAACGGCCACACCCTCGACTACCGTATTCACAGCGGCATCGTCGGCAATCG
CTGGGTGAAAGATCAGGAAGCGTACATCGTGCGGGTGGGGGAAAGTATCTACAAAATCTCATGGACCGAACC
GACCGGTACCGACGTCAGCCTGATCGTCAACCTGGGCGATAAACTGTTCCACGGCACCATTTTCTTCCCGCGCT
GGATCATGAATAACCCGGAAAAAACCGTCTGCTTCCAGAACGATCACATTCTCTGATGAATTCGTACCGCGAT
GCCGGCCCGGCCTACCCGACGGAAGTGATTGACGAGTTTGCTACTATCACCTTCATTTCGCGACTGTGGCGCGG
ATAATGACGAGGTTATTAATTGCCCGGCAAGTGAATTGCCAGCTGATTTTCTGCAAATTTGTAA
```

