



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

Vitória Gonçalves Navarrete

**Caracterização bioquímica e biofísica de enzima
ácido ferúlico descarboxilase e aplicação na produção de
4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico**

São José do Rio Preto
2023

Vitória Gonçalves Navarrete

**Caracterização bioquímica e biofísica de enzima
ácido ferúlico descarboxilase e aplicação na produção de
4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto 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.

Financiadora: bolsa CAPES e auxílio Fapesp

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

São José do Rio Preto
2023

N321c

Navarrete, Vitória Gonçalves

Caracterização bioquímica e biofísica de enzima ácido ferúlico descarboxilase e aplicação na produção e 4-vinilguaicol a partir de ácido ferúlic / Vitória Gonçalves Navarrete. -- São José do Rio Preto, 2023

71 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Eleni Gomes

1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. 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.

Vitória Gonçalves Navarrete

**Caracterização bioquímica e biofísica de enzima
ácido ferúlico descarboxilase e aplicação na produção de
4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto 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.

Financiadora: Financiadora: bolsa CAPES e auxílio Fapesp

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Gustavo Metzker
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Pâmela Aparecida Maldaner Pereira
UNESP – Câmpus de Jaboticabal

São José do Rio Preto
07 de março de 2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo o apoio durante todas as etapas da vida, em especial à minha mãe pela amizade e parceria que temos. Agradeço também aos meus demais familiares pelos encorajamentos.

Aos meus amigos todos, em especial aos mais próximos, Maria Eduarda, Guilherme, Ingrid, João, Humberto, Amanda, Leopoldo, Loyane, Bianca, Giovana, Gabis, Monique, Ricardo e More, e à minha namorada Nathalia por estarem sempre presentes de alguma forma nas situações boas e por me ajudarem nas que não são, deixando minha caminhada mais leve. Muito obrigada.

À minha psicóloga Fran que foi essencial durante este período.

À minha orientadora pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Aos colegas de laboratório, principalmente Gustavo, Roni e Maitê. E aos colegas e amigos feitos em outros departamentos, em especial o departamento da Física e ao Renan, que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao Ibilce por ser quase uma segunda casa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço pela concessão da bolsa de pesquisa.

RESUMO

A crescente valorização dos processos industriais sustentáveis e limitações na obtenção de alguns produtos de importância industrial têm tornado a tecnologia enzimática uma alternativa cada vez mais oportuna. A biossíntese de compostos permite produção contínua, sem impacto ou interferência sazonal, maior controle e otimização de parâmetros e maior especificidade dos produtos. A enzima ácido ferúlico descarboxilase (FADase) catalisa a descarboxilação não oxidativa do ácido ferúlico (AF) em 4-vinilguaiacol (4VG), um composto fenólico volátil utilizado como aromatizante em alimentos e bebidas. O 4VG, composto com aroma picante de cravo, é um produto de interesse industrial cuja demanda não é suprida por fontes naturais e com alto custo de produção por via química. Com a finalidade de entender a dinâmica estrutural e parâmetros funcionais da FADase heteróloga, derivada do gene da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, para aplicação na produção de 4VG, foram realizados estudos bioquímicos e biofísicos da enzima. Para futura aplicação em processos industriais de produção, também foram realizadas tentativas de imobilização da enzima. Os testes de capacidade de conversão de AF em 4VG pela enzima purificada e em extrato bruto tiveram consumo de substrato e formação de produto foram confirmados por HPLC. A temperatura e pH ótimos determinados foram 40 °C e pH 5,5, e a faixa de estabilidade variou entre 35 °C e 50 °C e pH 5,0 a 5,5. O *melting point* de 60 °C foi determinado por *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) e a investigação de um possível estágio intermediário de desdobramento foi feito por *Circular Dichroism* (CD) nas faixas de 218 e 222nm, que apontou apenas dois estágios. A modelagem computacional da enzima possibilitou a confirmação da estrutura, seu sítio catalítico e sugeriu compatibilidade com glutaraldeído como agente reticulante a ser utilizado para imobilização. Nos ensaios de imobilização com CLEAs (*cross-linked aggregates*) e m-CLEAs (*magnetic cross-linked aggregates*), observou-se perda da atividade da enzima. Visando o entendimento deste resultado, a interação da FADase com o ligante foi analisada por espectroscopia de fluorescência, a partir da qual foram determinados dois sítios de ligação e uma constante de associação muito baixa para que a ligação fosse estável. Entretanto, estes resultados ainda são inconclusivos e novos ensaios são necessários para se definir as condições de imobilização adequadas para a enzima.

Palavras-chave: Ácido ferúlico descarboxilase. Ácido ferúlico. 4-vinilguaiacol.

ABSTRACT

The growing appreciation of sustainable industrial processes and limitations in obtaining some industrially important products have made enzymatic technology an increasingly opportune alternative. The biosynthesis of compounds allows continuous production, without seasonal interference or impact, greater control and optimization of parameters and greater product specificity. The enzyme ferulic acid decarboxylase (FADase) catalyzes the non-oxidative decarboxylation of ferulic acid (FA) to 4-vinylguaiacol (4VG), a volatile phenolic compound used as a flavoring in foods and beverages. 4VG, a compound with a spicy clove aroma, is a product of industrial interest whose demand is not met by natural sources and with a high cost of chemical production. In order to understand the structural dynamics and functional parameters of the heterologous FADase, derived from the gene of the bacterium *Klebsiella pneumoniae*, for application in the production of 4VG, biochemical and biophysical studies of the enzyme were carried out. For future application in industrial production processes, attempts were also made to immobilize the enzyme. Tests on the ability to convert FA into 4VG by the purified enzyme and crude extract had substrate consumption and product formation confirmed by HPLC. The optimal temperature and pH determined were 40°C and pH 5.5, and the stability range varied between 35 and 50°C and pH 5.0 to 5.5. The melting point of 60°C was determined by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and the investigation of a possible intermediate stage of unfolding was carried out by Circular Dichroism (CD) in the ranges of 218 and 222 nm, which identified only two stages. The computational modeling of the enzyme enabled confirmation of the structure, its catalytic site and suggested compatibility with glutaraldehyde as a cross-linking agent to be used for immobilization. In immobilization assays with CLEAs (cross-linked aggregates) and m-CLEAs (magnetic cross-linked aggregates), loss of enzyme activity was observed. Aiming at understanding this result, the interaction of the FADase with the ligand was analyzed by Fluorescence Spectroscopy, from which two binding sites and a very low association constant were determined for the binding to be stable. However, these results are still inconclusive and new tests are needed to define the appropriate immobilization conditions for the enzyme.

Keywords: Ferulic acid decarboxylase. Ferulic acid. 4-vinylguaiacol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do ácido ferúlico.	15
Figura 2 – Síntese do ácido ferúlico em plantas.	17
Figura 3 – Metabolismo de AF em outros compostos aromáticos pela bactéria <i>Bacillus coagulans</i> proposta por Karmakar e colaboradores.	19
Figura 4 – Fórmula molecular do 4-vinilguaiacol.	20
Figura 5 – Gel de poliacrilamida para detecção das bandas de FADase.	35
Figura 6 – Cromatogramas dos padrões de AF e 4VG, com tempo de retenção de cerca de 6,5 min e 11,5 min.	37
Figura 7 – Cromatograma de amostra analisada por CLAE para exemplo da identificação e quantificação dos compostos AF e 4VG a partir dos padrões, com tempo de retenção de cerca de 6,5 min e 11,5 min.	38
Figura 8 – Curva de tempo de reação da enzima FADase com a finalidade de encontrar o tempo de reação mais eficiente para conversão de ácido ferúlico (AF) em 4-vinilguaiacol (4VG) e comparação da conversão de AF em 4VG utilizando a enzima purificada (P) e o extrato bruto (B).	38
Figura 9 – Teste de estabilidade da enzima FADase pura à diferentes temperaturas	39
Figura 10 – Teste de atividade da enzima FADase pura em diferentes faixas de pH.	40
Figura 11 – DSC para determinação de <i>melting point</i> e investigação de estágio intermediário na enzima FADase.	41
Figura 12 – CD com variação de temperatura de 35°C a 70°C a 218 nm para averiguação de mudança conformacional de folhas β -pregueadas para análise de indicativo de estágio intermediário da enzima FADase.	42
Figura 13 – CD com variação de temperatura de 35°C a 70°C a 222 nm para averiguação de mudança conformacional de α -hélices para análise de indicativo de estágio intermediário da enzima FADase.	42
Figura 14 – Comparação das estruturas da enzima utilizando Alphafold Multimer (magenta e amarela) e a plataforma Swissmodel (verde e ciano).	43
Figura 15 – Valores de IDDT para cada resíduo em cada modelo gerados por AlphaFold. A linha vertical indica o fim de uma cadeia e começo da outra. Valores maiores de 80 indicam alta confiabilidade do modelo.	45

Figura 16 – Erro de alinhamento predito. Indica o erro esperado nas posições relativas de pares de resíduos nos cinco modelos de dímeros gerados. Regiões em azul indicam alta confiança.	45
Figura 17 – Número de sequências homólogas abrangendo diferentes % de identidade (barra à direita) com a sequência alvo. As linhas dentro do gráfico estão coloridas de acordo com a legenda de cores.	46
Figura 18 – Alinhamento da sequência alvo com o molde (PDB 4UU2).	46
Figura 19 – Valor de Z-score para o modelo gerado por homologia.	47
Figura 20 – Gráfico de Ramachandran para os ângulos diedros Phi (eixo x) e Psi (eixo y) no modelo.	48
Figura 21 – Similaridade local com o molde. O eixo x representa os resíduos de aminoácidos e o eixo y representa a similaridade local com o molde.	48
Figura 22 – Representação estrutural da enzima mostrando em <i>sticks</i> os resíduos catalíticos.	49
Figura 23 – Atividade relativa da enzima FADase em diferentes tentativas de imobilização.	59
Figura 24 – Espectro de emissão de fluorescência da supressão da atividade da enzima FADase pela adição de glutaraldeído.	60
Figura 25 – Gráfico de duplo-log gerado a partir dos dados obtidos da supressão de fluorescência nas temperaturas de 2°C, 4°C e 6°C.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre os precipitantes em diferentes concentrações adicionados à solução de enzima pura (EP) e extrato bruto (EB) a partir da quantidade de 4VG formado (mg L^{-1}).	41
Tabela 2 – Número de sítios de ligação e constante de associação da interação FADase-glutaraldeído.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4VG	4-vinilguaiacol
AF	Ácido ferúlico
CD	<i>Circular Dichroism</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
FADase	Ácido Ferúlico Descarboxilase
IPTG	isopropil- β -D-thiogalactopiranoside
LB	Lúria Bertani
min	Minutos
PEG	Polietilenoglicol

LISTA DE SÍMBOLOS

mM	Milimolar
µg	Micrograma
mL	Miligrama
°C	Graus Celsius
nm	Nanômetros
g	Gramas
(v/v)	(Volume de Soluta)/(Volume de Solução)
rpm	Rotações Por Minuto
mmol	Milimol
L⁻¹	Por Litro
(w/v)	(Peso)/(Volume)
µL	Microlitro
U	Unidade de Atividade
µmol	Micromol

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Ácido ferúlico	15
2.1.1 Características do composto	15
2.1.2 Fontes naturais de ácido ferúlico	16
2.1.3 Bioconversão de ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol	18
2.2 4-vinilguaiacol	19
2.3 Ácido ferúlico descarboxilase	21
2.4 Imobilização enzimática	22
3 OBJETIVOS GERAIS	23
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO II	27
1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Experimentação <i>in vitro</i>	30
3.1.1 Microrganismo	30
3.1.2 Obtenção do extrato enzimático	30
3.1.3 Purificação da enzima	31
3.1.4 Estimativa da massa molecular da enzima	31
3.1.5 Determinação da atividade da enzima	32
3.1.6 Estabilidade em variação de temperatura e pH	32
3.1.7 Especificidade da ácido ferúlico descarboxilase	33
3.1.8 Teste de precipitante	33
3.1.9 Determinação do <i>melting point</i> por DSC (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)	33
3.1.10 Investigação dos estágios de desenovelamento da FADase heteróloga por CD (<i>Circular Dichroism</i>)	34
3.2 Métodos analíticos	34
3.2.1 Determinação de proteínas totais	34

3.2.2	Análise dos compostos por cromatografia	34
3.3	Experimentação <i>in silico</i> – Modelagem computacional	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Produção, purificação e quantificação de FADase	35
4.2	Determinação da atividade da FADase heteróloga	36
4.2.1	Tempo de conversão de AF em 4VG	36
4.2.2	Estabilidade em variação de temperatura e pH	39
4.3	Teste de especificidade	40
4.4	Teste de precipitante	40
4.5	Determinação do <i>melting point</i> por DSC (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)	41
4.6	Investigação dos estágios de desenovelamento da FADase heteróloga por CD (<i>Circular Dichroism</i>)	42
4.7	Modelagem	43
4.7.1	Modelos estruturais da FADase	43
4.7.2	Modelos estruturais da FADase gerados por AlphaFold	44
4.7.3	Modelo estrutural da FADase gerado por homologia	46
5	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	CAPÍTULO III	54
1	INTRODUÇÃO	56
2	OBJETIVO ESPECÍFICO	57
3	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1	Imobilização enzimática	57
3.2	Determinação da atividade da enzima	58
3.3	Análise dos compostos por cromatografia	58
3.4	Investigação da interação enzima-ligante por espectroscopia de fluorescência	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	62
	CAPÍTULO IV	64
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64

APÊNDICE A - Curvas dos padrões de AF e 4VG feitas a partir da quantificação por CLAE e utilizadas para quantificação dos compostos nas amostras	65
APÊNDICE B - Tabela com dados de capacidade de conversão de FADase heteróloga purificada e em extrato bruto obtidos por CLAE	66
APÊNDICE C - Tabela com dados de estabilidade de FADase heteróloga incubada por 60min à diferentes temperaturas obtidos por CLAE	67
APÊNDICE D - Tabela com dados de tolerância de FADase heteróloga à alteração de pH do substrato de obtidos por CLAE	67
APÊNDICE E - Tabela com dados do teste de precipitantes	68
APÊNDICE F - Tabela com as titulações de glutaraldeído (GL.) feitas na análise da interação enzima-ligante por espectroscopia de fluorescência nas temperaturas de 2°C, 4°C e 6°C.	69
APÊNDICE G - Tabela com dados de intensidades obtidas por análise de supressão por espectroscopia de fluorescência.	70
ANEXO A - Supressão de fluorescência	71

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

A tecnologia enzimática uma alternativa cada vez mais oportuna em processos industriais sustentáveis e para suprir as limitações na obtenção de produtos de importância industrial por técnicas de extração natural ou por síntese química (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020; SOUZA et al., 2017). A biossíntese de compostos pode ser mais interessante do ponto de vista econômico em comparação aos processos de extração a partir de produtos naturais, visto que permite produção contínua, sem impacto ou interferência sazonal, maior controle e otimização de parâmetros e maior quantidade dos produtos. Entre os métodos de síntese, aqueles por via enzimática permitem maior especificidade do produto, além de ser mais amigável sob o ponto de vista ambiental (BETTIO, 2020).

A ácido ferúlico descarboxilase (FADase) (EC 4.1.1.102) é uma enzima da família das liases capaz de catalisar a descarboxilação não oxidativa do ácido ferúlico (AF) em 4-vinilguaiacol (4VG), um composto fenólico volátil muito utilizado em alimentos e bebidas por possuir o aroma picante de cravo (LI; LONG; DING, 2019; SUN et al, 2018). O 4VG é um composto de interesse industrial que não tem sua demanda suprida por fontes naturais e tem alto custo de produção por via de síntese química (SANTOS, 2018; SUN et al, 2018).

As descarboxilases independentes de cofatores externos, como a FADase, são candidatas promissoras para o bioprocessamento de produção de 4VG e seus derivados, e são disponíveis a partir da produção heteróloga em *Escherichia coli* (*E. coli*), no contexto de aplicação industrial, apesar serem expressadas de forma nativa em diversos microrganismos, principalmente bactérias (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020; SANTOS, 2018; GU et al., 2011).

O 4VG possui um limiar de detecção extremamente baixo, em torno de 0,30 ppm e apresenta um aroma bastante persistente mesmo em pequenas concentrações, o que aumenta o valor agregado do produto (MEILGAARD, 1975). O composto também apresenta crescente valor medicinal devido à sua possível atividade anticâncer e atividade antioxidante, assim como uso na indústria cosmética, farmacêutica e química (LUO et al., 2021; LI; LONG; DING, 2019; TAŃSKA; MIKOŁAJCZAK; KONOPKA, 2018).

O AF, substrato da reação, pode ser extraído de resíduos lignocelulósicos, uma fonte sustentável e de baixo custo. Por ser um dos compostos fenólicos mais abundantes nestes resíduos, livre ou ligados covalentemente aos biopolímeros de hemicelulose e lignina, o AF pode ser extraído de bagaço de cana de açúcar por meio de hidrólise alcalina, sendo uma fonte barata e acessível do precursor do 4VG (AL ARNI, 2018; SANTOS, 2018). A extração do ácido ferúico requer a dissociação da hemicelulose e lignina, a qual requer combinação de processos químicos, físicos e biológicos devido à resistência natural das paredes das células vegetais. A fração de lignina obtida é chamada de líquor, um líquido rico em compostos aromáticos (SANTOS, 2018; ROOPAN, 2017).

Diferentemente da alta disponibilidade do AF em resíduos lignocelulósicos, a quantidade de 4VG disponível nas plantas é muito limitada, o que não atende o aumento da demanda de consumo mundial (SANTOS, 2018; SUN et al, 2018). Atualmente, a maior parte do 4VG é produzida por síntese química de alto custo de produção devido ao elevado preço do AF obtido de forma sintética por processos químicos (SAEED et al., 2019; SANTOS, 2018; SUN et al, 2018). Desse modo, a extração do ácido ferúico a partir de bagaço de cana de açúcar e sua subsequente transformação por via enzimática a 4VG, além de ser um método ambientalmente mais seguro, faz do 4VG um produto natural, com maior valor agregado.

O presente trabalho está inserido num projeto maior do grupo de pesquisa que visa o desenvolvimento de métodos de extração de ácido ferúico a partir de bagaço de cana e busca detectar, isolar e produzir a FADase e aplicá-la na biotransformação do AF a 4VG. Este estudo teve por objetivos entender a dinâmica estrutural e parâmetros funcionais para aplicação da FADase na produção de 4VG, utilizando ensaios bioquímicos e biofísicos com uma FADase produzida por *Klebsiella pneumoniae*, clonada em *E. coli*. Ainda, busca na imobilização da FADase melhoria do desempenho, estabilidade e atividade da enzimas para aplicação industrial e produção em larga escala através de protocolos utilizando CLEAs e m-CLEAs.

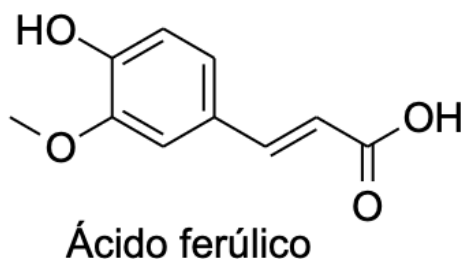
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido ferúlico

2.1.1 Características do composto

O ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinâmico) (Figura 1) é um dos ácidos fenólicos de maior importância, especialmente dentro do grupo dos derivados do ácido cinâmico (SAEED et al., 2019).

Figura 1 – Estrutura química do ácido ferúlico.



Fonte: Autora

Compostos fenólicos são metabólitos secundários de fórmulas químicas e propriedades variadas. São muito conhecidos pela ação antioxidante, que depende do número de grupos hidroxila e metoxila ligados ao anel fenólico (ZDUŃSKA et al., 2018). Ácidos fenólicos são a classe mais predominante de produtos químicos bioativos agrupados sob compostos fenólicos, sendo os metabólitos secundários aromáticos que apresentam cor, sabor e adstringência, que contribuem para as características organolépticas típicas dos alimentos (RASHMI; NEGI, 2020).

Sua estrutura molecular conta com um anel benzênico, que juntamente à cadeia lateral e ao grupo carboxila (COOH) tem ação de proteção contra a peroxidação lipídica, uma substituinte hidroxila (OH), que promove ressonância e estabilidade das moléculas diretamente ligado ao anel, permitindo combater as espécies reativas de oxigênio (ROS), e um grupo metoxila (OCH₃), que pode formar ligações de hidrogênio e tornar as moléculas mais estáveis (CAVALCANTI et al.,

2020; SAEED et al., 2019). Existe nas formas isoméricas *cis* e *trans*, mas isolado de plantas geralmente aparece como o isômero *trans* (GRAF, 1992).

O AF é utilizado principalmente pelas suas funções antioxidantes, mas também possui muitas aplicabilidades fisiológicas, incluindo anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica (utilizado em pesquisa de tratamento, por exemplo, de câncer de pulmão, mama, cólon e pele), atividade antiarrítmica e antitrombótica, efeitos antidiabéticos, propriedades imunostimulantes, reduz o dano às células nervosas e pode ajudar a reparar as células danificadas (ZDUŇSKA et al., 2018). A partir do ácido ferúlico é possível a obtenção de outros compostos de interesse industrial e analítico, como 4-vinilguaiacol, vanilina, ácido vanílico, álcool vanílico, metoxi-hidroquinona, guaiacol, hidroxiquinolcatecol e pirogalol (GRAF, 1992).

Atualmente o ácido ferúlico é obtido de forma sintética por processos químicos, mas estudos vêm sendo realizados com o propósito de liberação enzimática de fontes naturais (SAEED et al., 2019).

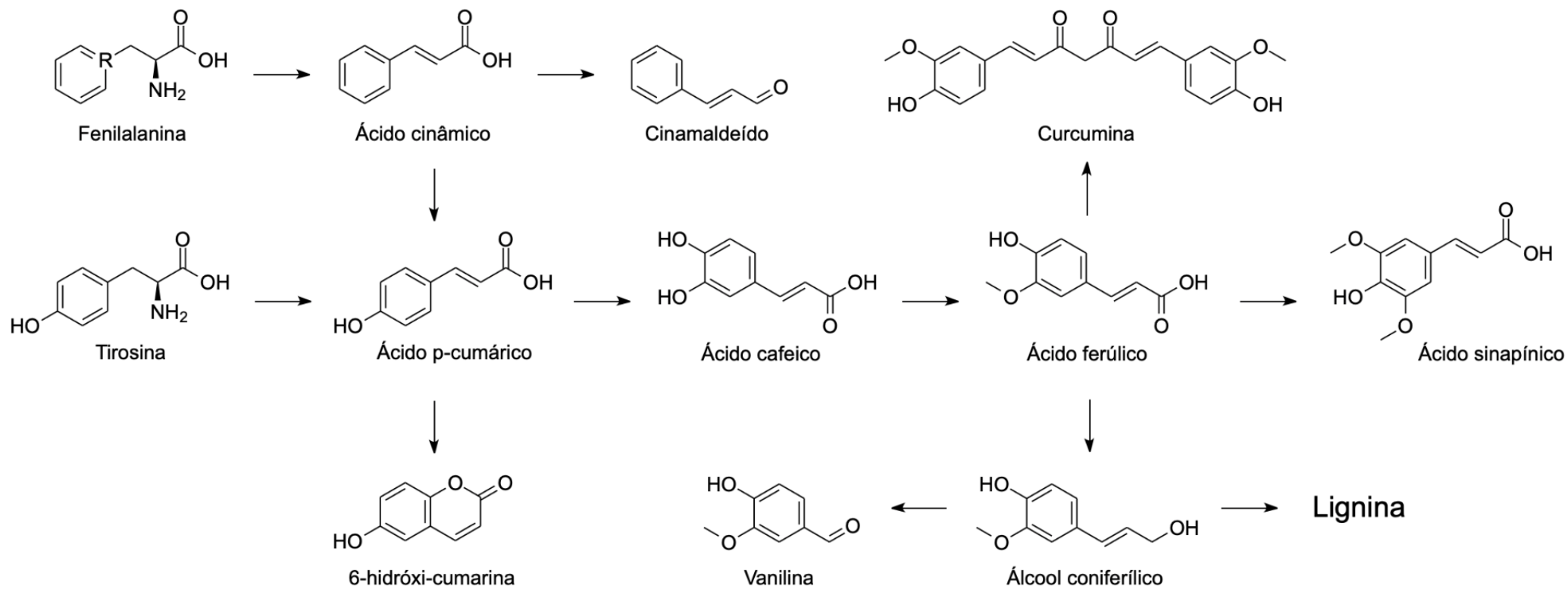
2.1.2 Fontes naturais de ácido ferúlico

O AF foi isolado pela primeira vez por Hlasiwetz e Barth da planta *Ferula foetida*, na Áustria, em 1866 (GRAF, 1992). O composto é amplamente encontrado em diferentes plantas, mas especialmente abundante em gramíneas, comumente distribuído nas paredes celulares de vegetais (SAEED et al., 2019).

A síntese do AF nas plantas ocorre através via metabólica do ácido shikímico (Figura 2), com L-fenilalanina e L-tirosina como precursores (SANTOS, 2018). A fenilalanina e a tirosina são convertidas em ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico pelas enzimas fenilalanina amônia-liase e tirosina amônia-liase, respectivamente, e o ácido *p*-cumárico converte-se em ácido ferúlico por hidroxilação e reação de metilação (SANTOS, 2018; GRAF, 1992). As reações subsequentes de oxidação e metilação dão origem a derivados adicionais de di- e tri-hidroxi cinamato que se tornam os materiais de partida para a formação de lignina (GRAF, 1992).

A degradação oxidativa do ácido ferúlico leva à vanilina e ao guaiacol, outras alterações da cadeia lateral do ácido propenóico podem produzir classes adicionais de estruturas fenilpropanóides, como os flavonoides (GRAF, 1992).

Figura 2 – Síntese do ácido ferúlico em plantas.



Fonte: Adaptado de Graf, 1992.

A lignina, segundo biopolímero mais abundante na biosfera, representa cerca de 15-30% da massa seca da matéria lignocelulósica e tem como estrutura um anel aromático com grupos funcionais hidroxila e metoxi e uma cadeia propanoide, tornando-a interessante para a produção de produtos de valor agregado (AZADFAR et al., 2015). A lignina tem ligações termodinamicamente muito estáveis (C–C e C–O), o que a torna difícil de quebrar e isolar em um produto alvo. A obtenção de produtos a partir da biomassa lignocelulósica ocorre através de processos químicos, físicos e biológicos, devido à resistência natural das paredes das células vegetais. Como resultado dos processos químicos e físicos há a remoção da lignina, chamada de deslignificação (SANTOS, 2018). A fração de lignina obtida é chamada de líquor, líquido rico em compostos aromáticos (SANTOS, 2018; ROOPAN, 2017).

O AF é um dos compostos fenólicos mais abundantes nos resíduos lignocelulósicos, livre ou ligados covalentemente aos biopolímeros de hemicelulose e lignina (AL ARNI, 2018; SANTOS, 2018). Dentre os diversos tipos de biomassa lignocelulósica, o AF pode ser extraído de bagaço de cana-de-açúcar, resíduo abundante no Brasil, por meio de hidrólise alcalina (AL ARNI, 2018; SANTOS, 2018; LANDETE et al., 2010).

Hidrolases encontradas em microrganismos liberam AF e/ou ácido p-cumárico das paredes das células vegetais, disponibilizando-os como substrato para enzimas descarboxilases de ácidos fenólicos, que convertem os primeiros compostos em seus derivados de vinil fenol (LANDETE et al., 2010).

2.2.3 Bioconversão de ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol

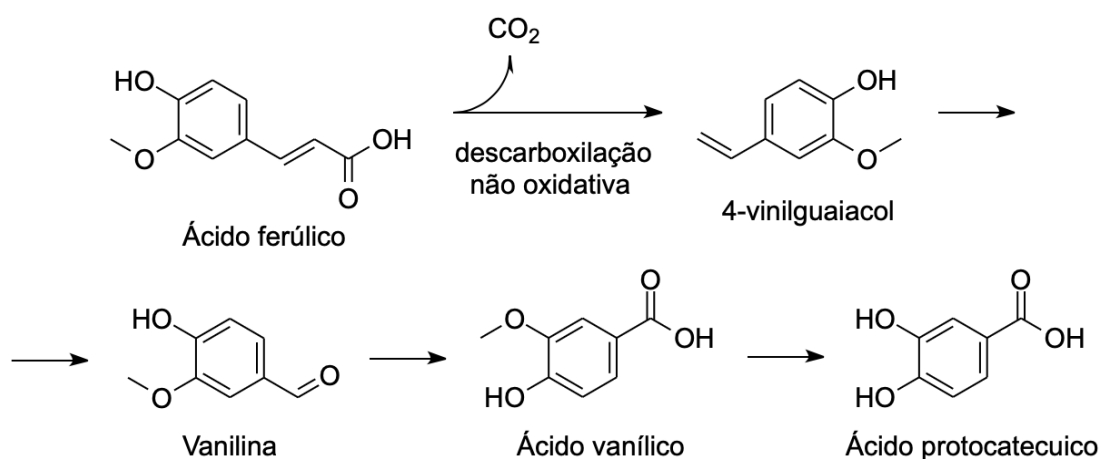
A biotransformação do AF, na via metabólica mais comum, tem como primeiro produto formado por descarboxilação o 4VG (SANTOS, 2018). A bioconversão do AF em 4VG acontece por descarboxilação biológica não oxidativa do AF por ação da enzima ácido ferúlico descarboxilase (FADase), presente em diversos microrganismos, principalmente bactérias (SANTOS, 2018; GU et al., 2011).

Apesar de constituir substrato para bioconversão microbiana na produção de flavorizantes como a vanilina e o 4-vinilguaiacol, o ácido ferúlico (AF) tem ação tóxica para alguns microrganismos, e pode inclusive ser utilizado como antimicrobiano (ZDUŇSKA et al., 2018). Sendo assim, sua bioconversão em outros

produtos só é possível a partir de organismos tolerantes a AF ou suas enzimas (SANTOS, 2018; ZDUŃSKA et al., 2018).

Algumas cepas bacterianas, como por exemplo *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus pumilus*, têm o 4-vinilguaiacol como o produto final do metabolismo do AF (SANTOS et al., 2021; LEE; VOLM; ROSAZZA, 1998; HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1994). Em outras cepas, como *Streptomyces setonii*, *Bacillus coagulans* (Figura 3) e *Enterobacter sp.*, o 4VG é um produto intermediário do metabolismo (SANTOS, 2021; SALGADO et al., 2012; SALGADO et al., 2014).

Figura 3 – Metabolismo de AF em outros compostos aromáticos pela bactéria *Bacillus coagulans* proposta por Karmakar e colaboradores



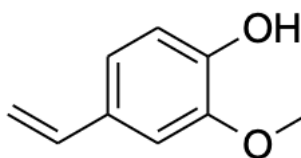
Fonte: Adaptado de Karmakar et al., 2000

2.2 4-vinilguaiacol

O 4-vinilguaiacol (2-metoxi-4-vinilfenol) (4VG) (Figura 4) é um composto fenólico volátil derivado do ácido ferúlico. É amplamente utilizado na indústria alimentícia, principalmente em cervejas, já que o aroma do cravo é caracterizado principalmente pelo 4VG (BETTIO, 2020; LI; LONG; DING, 2019; SUN et al, 2018). Ele também é descrito como o composto de sabor de impacto do sabor de fumaça/defumado (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020). Ainda na indústria alimentícia, além de flavorizante, também é utilizado como protetor de alimentos (ZHANG et al., 2020).

Na indústria farmacêutica é utilizado devido a sua potencial atividade antiproliferativa, reduzindo carcinogênese, e atividade antioxidante, sendo também utilizado na indústria cosmética e química como aromatizador e como matéria-prima para a fabricação de produtos químicos como a vanilina, e no campo oftálmico para a preparação de soluções contendo agentes aromatizantes (Patente US 20060292188) (LUO et al., 2021; LI; LONG; DING, 2019; TAŃSKA; MIKOŁAJCZAK; KONOPKA, 2018; HUNTER; MANTER; VAN DER LELIE, 2012; BAQUEIRO-PEÑA et al., 2010). Devido à sua ampla gama de aplicações o composto possui alto valor econômico.

Figura 4 – Fórmula molecular do 4-vinilguaiacol.



4-vinilguaiacol

Fonte: Autora.

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 (BETTIO, 2020).

A demanda pelo 4VG não pode ser atendida por fontes naturais, já que a quantidade disponível nas plantas é muito limitada. Atualmente, a maior parte da quantidade de composto disponibilizada é proveniente de síntese química, um procedimento de alto custo de produção devido ao valor elevado do AF (SANTOS, 2018; SUN et al, 2018).

A biotransformação, realizada por microrganismos ou catalisada por suas enzimas, é uma alternativa adequada para a produção do 4VG natural, pensando em custo de produção e sustentabilidade.

2.3 Ácido ferúlico descarboxilase

A enzima ácido ferúlico descarboxilase (FADase) foi descrita por Huang e colaboradores em 1994 a partir de uma cepa de *Pseudomonas fluorescens* (UI-670) eficiente na transformação de AF em 4VG (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1994). A enzima, um homodímero da família das liases, é responsável por catalisar a descarboxilação não oxidativa do ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol, produto de interesse deste estudo (GU et al., 2011). Além da bioconversão de ferulato a 4-vinilguaiacol + CO₂, a FADase catalisa as reações 4-cumarato a 4-vinilfenol + CO₂ e trans-cinamato a estireno + CO₂ (SANTOS et al., 2021).

Nos estudos da FADase encontrada em *P. fluorescens* por Huang e colaboradores a enzima foi descrita como independente de cofatores e não contendo grupos prostéticos. A filtração em gel estimou uma massa molecular aparente de 40,4 (+/- 6%) kDa, enquanto a eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio mostrou uma massa molecular de 20,4 kDa, indicando que a descarboxilase do AF é um homodímero em solução (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1994). A enzima purificada exibiu uma faixa de temperatura ótima de 27°C a 30°C e pH ótimo de 7,3 em tampão de fosfato de potássio e tinha um Km de 7,9 mM para AF e foi inativada por Hg²⁺, Cu²⁺, ácido *p*-cloromercuribenzóico e N-etilmaleimida, sugerindo que grupos sulfidril são necessários para a atividade enzimática (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1994).

Após sua primeira descrição, a descarboxilase de AF foi relatada em vários outros microrganismos e com características funcionais diferentes, e atualmente pode ser dividida em três subclasses: as nomeadas enzimas dependentes de prFMN (*prenylated flavin cofactor*), as dependentes de metal divalente e as independentes de cofator (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020; HUNTER; MANTER; VAN DER LELIE, 2012; GU et al., 2011).

As descarboxilases dependentes de cofator (FDC) tiveram o interesse a seu respeito despertado pelo mecanismo único de cicloadição 1,3-dipolar da enzima e seu cofator atípico prFMN, que proporcionou várias aplicações das descarboxilações mediadas pela FDC, como a síntese de estirenos, ou seus diversos derivados, incluindo 1,3-butadieno e a ativação enzimática das ligações C-H através das reações de carboligação reversa (DUȚĂ et al., 2022).

As descarboxilases independentes de cofatores, incluindo FADases bacterianas, vegetais e de ascomicetos, requerem um grupo hidroxila obrigatório na posição para do substrato e são promissoras na bioprodução de 4VG e derivados pela sua independência de cofatores externos, porém essas enzimas estão disponíveis apenas a partir da produção heteróloga em *Escherichia coli* (*E. coli*) (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020).

2.4 Imobilização enzimática

Um dos grandes desafios que as indústrias farmacêutica, química e relacionadas enfrentam no século 21 é a transição para uma base de manufatura mais sustentável (SHELDON, 2011). A crescente demanda por processos industriais sustentáveis e as limitações na obtenção de produtos de importância industrial vêm fazendo com que a tecnologia enzimática ganhe cada vez mais espaço (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020; SOUZA et al., 2017). A imobilização de enzimas possibilita a melhoria do desempenho, da estabilidade e da atividade das enzimas para aplicação industrial e produção em larga escala (CUI et al., 2017). É possível dividir os tipos de imobilização enzimática em três métodos tradicionais: aprisionamento, ligação a um suporte e *cross-linking* (ligações cruzadas).

Imobilização por aprisionamento ocorre via inclusão de uma enzima em uma rede de polímero (rede de gel), como um polímero orgânico ou um sol-gel de sílica, ou um dispositivo de membrana, como uma fibra oca ou uma microcápsula (SHELDON, 2007). Imobilização por ligação a um suporte pode ser por forças de Van der Waals, iônica ou covalente, em ordem crescente de força de ligação. O suporte pode ser uma resina sintética, um biopolímero ou um polímero inorgânico, como sílica (SHELDON, 2007). Imobilização por *cross-linking* se dá pela formação de agregados enzimáticos ou cristais, usando um reagente bifuncional, para preparar macropartículas sem carreador (SHELDON, 2007; SHELDON, 2011).

A imobilização enzimática através de *cross-linking*, formando agregados enzimáticos (CLEAs) é uma ferramenta promissora para a imobilização de enzimas devido à sua simplicidade e baixo custo, estabilidade e grande volume de atividade, armazenamento e reutilização (CUI et al., 2017; SHELDON, 2011). CLEAs parte do princípio a adição de sais, solventes orgânicos miscíveis em água ou polímeros não iônicos em soluções aquosas de proteínas que resulta em precipitação de

agregados físicos que são mantidos juntos por ligação não covalente, e que, quando agregados entre si por *cross-linking*, formam o que é essencialmente um polímero, permanentemente insolúvel, mantendo sua superestrutura pré-organizada e, portanto, sua atividade catalítica (SHELDON, 2011). Esta metodologia é aplicável a uma ampla variedade de enzimas (SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005).

Ganhando destaque nos últimos anos, materiais inorgânicos vêm sendo alvo de pesquisas por suas potenciais aplicações biotecnológicas. Entre os nanomateriais inorgânicos, pensando em imobilização enzimática por ligação covalente ao suporte, as nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 (MNPs) têm recebido atenção considerável devido às suas propriedades magnéticas únicas associadas à baixa toxicidade, reutilização, área de superfície, fácil manipulação de modificação de superfície e capacidade de carga de enzima interessantes (SOOZANIPOUR; TAHERI-KAFRANI; ISFAHAN, 2015). Os MNPs têm sido amplamente usados na imobilização de muitas substâncias bioativas, como proteínas, peptídeos, enzimas e anticorpos, podendo ser facilmente recuperados pela aplicação de um campo magnético (TURAL et al., 2013).

Unindo pontos positivos das duas técnicas expostas acima, os m-CLEAs (união de nanopartículas magnéticas e CLEAs) são uma mistura homogênea de enzimas e partículas magnéticas, resultando em um tamanho de partícula relativamente pequeno, alta atividade e facilidade de separação em escala industrial, sendo particularmente úteis para processos em que têm de ser separados de outros sólidos (SHELDON; SORGEDRAGER; KONDOR, 2016; SHELDON, 2019).

3 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo entender a dinâmica estrutural e parâmetros funcionais da enzima FADase através de estudos bioquímicos e biofísicos para seu uso na produção de 4VG. Ainda, busca na imobilização enzimática por m-CLEAs para biossíntese daquele composto.

REFERÊNCIAS

AL ARNI, S., 2018. Extraction and isolation methods for lignin separation from sugarcane bagasse: a review. **Industrial Crops and Products**, 115, pp.330-339.

AZADFAR, M.; GAO, A.H.; BULE, M.V.; CHEN, S., 2015. Structural characterization of lignin: A potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol. **International journal of biological macromolecules**, 75, pp.58-66.

BAQUEIRO-PEÑA, I.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.; GONZÁLEZ-ZAMORA, E.; AUGUR, C.; LOERA, O.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., 2010. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. **Bioresource technology**, 101(12), pp.4721-4724.

BETTIO, G., 2020. **Avaliação da bioconversão de ácido ferúlico em aromas vaniloides por leveduras isoladas da biodiversidade latino-americana**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CAVALCANTI, G. R.; DUARTE, F. I. C.; CONVERTI, A.; de LIMA, Á. A. N., 2020. Ferulic acid activity in topical formulations: technological and scientific prospecting. **Current Pharmaceutical Design**.

CUI, J.; ZHAO, Y.; FENG, Y.; LIN, T.; ZHONG, C. TAN, Z.; JIA, S., 2017. Encapsulation of spherical cross-linked phenylalanine ammonia lyase aggregates in mesoporous biosilica. **Journal of agricultural and food chemistry**, 65(3), pp.618-625.

DETERING, T.; MUNDRY, K.; BERGER, R. G., 2020. Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants. **PloS one**, 15(12), p.e0244290.

DUȚĂ, H.; FILIP, A.; NAGY, L. C.; NAGY, E. Z. A.; TÓTÓŠ, R.; BENCZE, L. C., 2022. Toolbox for the structure-guided evolution of ferulic acid decarboxylase (FDC). **Scientific Reports**, 12(1), 3347.

FURLANI, I. L.; AMARAL, B. S.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B., 2020. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, 43(4), pp.463-473.

GRAF, E., 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free radical biology and medicine**, 13(4), 435-448.

GU, W.; YANG, J.; LOU, Z.; LIANG, L.; SUN, Y.; HUANG, J.; YI, X. L.; ZHAOHUI, C. M.; ZHANG, K. Q., 2011. Structural basis of enzymatic activity for the ferulic acid decarboxylase (FADase) from *Enterobacter sp.* Px6-4. **PloS one**, 6(1), e16262.

GU, W.; LI, X.; HUANG, J.; DUAN, Y.; MENG, Z.; ZHANG, K. Q.; YANG, J., 2011. Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the *Enterobacter sp.* Px6-4 gene for ferulic acid decarboxylase. **Applied microbiology and biotechnology**, 89(6), pp.1797-1805.

HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P., 1994. Purification and characterization of a ferulic acid decarboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, 176(19), 5912-5918.

HUNTER, W. J.; MANTER, D. K.; VAN DER LELIE, D., 2012. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Enterobacter soli* and *E. aerogenes*. **Current microbiology**, 65, 752-757.

KARMAKAR, B.; VOHRA, R. M.; NANDANWAR, H.; SHARMA, P.; GUPTA, K. G.; SOBTI, R. C., 2000. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. **Journal of Biotechnology**, 80(3), 195-202.

LANDETE, J. M.; RODRÍGUEZ, H.; CURIEL, J. A.; de las RIVAS, B.; MANCHEÑO, J. M.; MUÑOZ, R., 2010. Gene cloning, expression, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Lactobacillus brevis* RM84. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 37(6), pp.617-624.

LEE, I. Y.; VOLM, T. G.; ROSAZZA, J. P., 1998. Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. **Enzyme and microbial technology**, 23(3-4), 261-266.

LI, L.; LONG, L.; DING, S., 2019. Bioproduction of high-concentration 4-vinylguaiacol using whole-cell catalysis harboring an organic solvent-tolerant phenolic acid decarboxylase from *Bacillus atrophaeus*. **Frontiers in microbiology**, 10, p.1798.

LUO, Y.; WANG, C. Z.; SAWADOGO, R.; YUAN, J.; ZENG, J.; XU, M.; TAN, T.; YUAN, C.S., 2021. 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**.

ROOPAN, S. M., 2017. An overview of natural renewable bio-polymer lignin towards nano and biotechnological applications. **International journal of biological macromolecules**, 103, pp.508-514.

SAEED, M.; ALAGAWANY, M.; FAZLANI, S. A.; KALHORO, S. A.; NAVEED, M.; ALI, N.; KIFAYAT-ULLAH; ARAIN, M. A.; CHAO, S., 2019. Health promoting and pharmaceutical potential of ferulic acid for the poultry industry. **World's Poultry Science Journal**, 75(1), 83-92.

SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRÍGUEZ-SOLANA, R.; DOMÍNGUEZ, J. M., 2012. Purification of ferulic acid solubilized from agroindustrial wastes and further conversion into 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii* using solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, 39, 52-61.

SALGADO, J. M.; RODRÍGUEZ-SOLANA, R.; CURIEL, J. A.; DE LAS RIVAS, B.; MUNOZ, R.; DOMÍNGUEZ, J. M., 2014. 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**, 58, 22-28.

SANTOS, M. B. C., 2018. **Biotransformação bacteriana de ácido ferúlico obtido de resíduo lignocelulósico a 4-vinilguaiacol**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto.

SANTOS, M. B. C.; SCARPASSA, J. A.; MONTEIRO, D. A.; LADINO-ORJUELA, G.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E., 2021. Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7. **Brazilian Journal of Microbiology**, 52(3), 1181-1190.

SHELDON, R. A., 2007. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, 349(8-9), pp.1289-1307.

SHELDON, R. A., 2011. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied microbiology and biotechnology**, 92(3), pp.467-477.

SHELDON, R. A., 2019. CLEAs, combi-CLEAs and 'smart'magnetic CLEAs: Biocatalysis in a bio-based economy. **Catalysts**, 9(3), 261.

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

SHELDON, R. A.; SORGEDRAGER, M. J.; KONDOR, B., 2016. Clea Technologies BV. **Non-leachable magnetic cross-linked enzyme aggregate**. U.S. Patent 9,353,367.

SOOZANIPOUR, A.; TAHERI-KAFRANI, A.; ISFAHANI, A. L., 2015. Covalent attachment of xylanase on functionalized magnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. **Chemical Engineering Journal**, 270, pp.235-243.

SUN, L. H.; LV, S. W.; YU, F.; LI, S. N.; HE, L. Y., 2018. Biosynthesis of 4-vinylguaiacol from crude ferulic acid by *Bacillus licheniformis* DLF-17056. **Journal of biotechnology**, 281, pp.144-149.

TAŃSKA, M.; MIKOŁAJCZAK, N.; KONOPKA, I., 2018. 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**, 240, pp.679-685.

TURAL, B.; ŞİMŞEK, İ.; TURAL, S.; ÇELEBI, B.; DEMIR, A. S., 2013. Carbonylation reactivity of benzaldehyde lyase (BAL, EC 4.1. 2.38) covalently attached to magnetic nanoparticles. **Tetrahedron: Asymmetry**, 24(5-6), 260-268.

ZDUŃSKA, K.; DANA, A.; KOŁODZIEJCZAK, A.; ROTSZTEJN, H., 2018. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. **Skin pharmacology and physiology**, 31(6), 332-336.

ZHANG, H.; JI, C.; CHEN, C.; CUI, Y., 2020. Transformation of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiacol by Microbiological Method. 5th International Symposium on Biomedical Science, **Biotechnology and Healthcare** (ISBSBH 2020).

CAPÍTULO II

Caracterização bioquímica e biofísica de ácido ferúlico descarboxilase (FADase) bacteriana heteróloga visando à biossíntese de 4-vinilguaiacol

RESUMO

Na via metabólica mais comum de biotransformação do ácido ferúlico (AF), o 4-vinilguaiacol (4VG) é o primeiro produto formado por descarboxilação. A descarboxilação não oxidativa do composto é catalisada pela enzima ácido ferúlico descarboxilase (FADase), uma enzima constituída em homodímero, pertencente à família das liases e expressada em diversos microrganismos, principalmente em bactérias. Para algumas cepas bacterianas, como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus pumilus*, o 4VG é o produto final da via de metabolismo do AF. O 4VG é muito utilizado na indústria alimentícia e de bebidas por seu aroma persistente de cravo. Neste estudo foram realizados estudos bioquímicos e biofísicos da FADase derivada do gene da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, expressa heterologicamente em *Escherichia coli*. O extrato enzimático foi obtido utilizando um protocolo de indução da expressão por IPTG e lise celular. Parte do extrato bruto foi purificado por cromatografia de afinidade. Para os testes de capacidade de conversão de AF em 4VG foram utilizados tanto a enzima purificada quanto o extrato bruto, com a finalidade de comparação. O consumo de substrato e formação de produto foram confirmados por HPLC. A enzima pura e o extrato bruto apresentaram atividades relativas semelhantes. A temperatura e pH ótimos foram 40°C e pH 5,5, e a faixa de estabilidade variou entre 35°C e 50°C e pH 5,0 a 5,5. O *melting point* da enzima foi determinado por DSC como 60°C e a investigação de um possível estágio intermediário de desenovelamento foi feito por CD nas faixas de 218 e 222nm, que apontou apenas dois estágios. Ao investigar a promiscuidade da enzima foi observada atividade nos substratos ácido cafeico e p-cumárico. Ensaio com precipitantes mostraram que o sulfato de amônio foi o mais apropriado, tanto na enzima purificada quanto no extrato bruto. Para confirmação da estrutura, análise do sítio catalítico e simulações foi feita a modelagem computacional da FADase a partir dos programas de predição estrutural AlphaFold Multimer e Swissmodel, o que possibilitou, *in silico*, corroborar a estrutura desta enzima com a descrita na literatura. A análise da conformação da enzima sugeriu compatibilidade com glutaraldeído como agente reticulante a ser utilizado em ensaios de imobilização enzimática.

Palavras-chave: Ácido ferúlico descarboxilase. Ácido Ferúlico. Modelo computacional da FDAase. DSC. CD.

1 INTRODUÇÃO

O 4-vinilguaiacol (2-metoxi-4-vinilfenol) (4VG) é um composto fenólico volátil derivado do ácido ferúlico (AF). A biotransformação do AF, na via metabólica mais comum, tem como primeiro produto formado por descarboxilação biológica não oxidativa, catalisada pela enzima ácido ferúlico descarboxilase (FADase), o 4VG (SANTOS, 2018; GU et al., 2011).

Desde sua primeira descrição em 1994 a partir de uma cepa de *Pseudomonas fluorescens*, a FADase foi identificada em diversos microrganismos, principalmente bactérias (SANTOS, 2018; GU et al., 2011; HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1994). Algumas cepas bacterianas, como por exemplo *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus pumilus*, tem o 4VG como o produto final do metabolismo do AF (SANTOS et al., 2021; LEE; VOLM; ROSAZZA, 1998; HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1994). Outras cepas, como *Streptomyces setonii*, *Bacillus coagulans* (Figura 3) e *Enterobacter sp.*, o 4VG é um produto intermediário do metabolismo (SANTOS, 2021; SALGADO et al., 2012; SALGADO et al., 2014).

O 4VG é amplamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica, tendo como característica distintiva um persistente aroma de cravo (LUO et al., 2021; LI; LONG; DING, 2019; TAŃSKA; MIKOŁAJCZAK; KONOPKA, 2018; HUNTER; MANTER; VAN DER LELIE, 2012; BAQUEIRO-PEÑA et al., 2010). Atualmente, por não ter sua demanda suprida por fontes naturais, o 4VG é produzido por síntese química (SANTOS, 2018; SUN et al, 2018). A produção sintética tem alto custo devido ao preço do AF, também produzido majoritariamente quimicamente apesar de abundante em resíduos lignocelulósicos (BETTIO, 2020; SANTOS, 2018; SUN et al, 2018).

Compostos aromatizantes produzidos por via biotecnológica são legalmente classificados como aditivos naturais e, por isso, apresentam-se mais atrativos do ponto de vista econômico e sustentável em comparação aos flavorizantes sintéticos (BETTIO, 2020). Diante da exposta possibilidade, o presente trabalho busca entender a estrutura e parâmetros funcionais de FADase heteróloga, derivada do gene da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, para aplicação na produção de 4VG.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção da enzima FADase expressa heterologicamente em extrato bruto;
- Purificação de parte do extrato bruto por cromatografia de afinidade;
- Avaliação da capacidade conversão de AF em 4VG em diferentes condições de pH e temperatura para estabelecer parâmetros de produção da FADase purificada e em extrato bruto;
- Testar a ação da enzima sobre outros substratos;
- Testar a tolerância da FADase a precipitantes;
- Investigar a termoestabilidade da enzima e estágios de desenovelamento;
- Modelagem computacional da FADase;
- Análise da estrutura da enzima.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimentação *in vitro*

3.1.1 Enzima ácido ferúlico descarboxilase (FADase)

A enzima ácido ferúlico descarboxilase nativa foi produzida por *Klebsiela pneumoniae* TD 4.7 (Santos et al., 2021; Santos, 2023) e expressa em *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen) em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA) da UNESP-IBILCE de São José do Rio Preto (Santos, 2023).

3.1.2 Obtenção do extrato enzimático

Com intuito de expressar a proteína de interesse previamente transformadas em célula competente de *E. coli*, uma colônia isolada foi inoculada em meio Lúria Bertani (LB) contendo canamicina a 50 µg/mL, sob agitação constante a 37°C até

atingir a fase logarítmica de crescimento, com D.O 600nm entre 0,4 e 0,6, quando foi induzida com isopropil- β -D-thiogalactopiranoside (IPTG) na concentração de 0.2 mM, e incubada durante 24 horas sob agitação constante e temperatura de 20°C.

Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o pellet usado para a extração da enzima. A massa celular foi ressuspendida em tampão de lise [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10% (v/v) glicerol] acrescido de 10 mg/mL de Lisozima. Após 30 minutos no gelo, as amostras foram lisadas por sonicação (BransonSonifier 250 (Branson, Connecticut, EUA) e centrifugadas por 30 minutos, a 4°C, 7000 rpm e o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta.

3.1.3 Purificação da enzima

O sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade com uso da coluna HisTrap HP, 1 mL, contendo resina Ni Sepharose®, em sistema AKTA (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão A (50 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio, 500 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio, 10 mmol L⁻¹ de imidazol e 5 % de glicerol). Após a injeção da amostra, as proteínas recombinantes foram eluídas em um gradiente linear de 0 a 100 % com o mesmo tampão, acrescido de 500 mmol L⁻¹ de imidazol (tampão B).

As proteínas eluídas foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A concentração das amostras de proteínas purificadas foi determinada espectrofotometricamente com uso do método de Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) e uma curva padrão com soroalbumina bovina.

3.1.4 Estimativa da massa molecular 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 nitrato de prata.

3.1.5 Determinação da atividade da enzima

A atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase foi determinada através de ensaios conduzidos em triplicata, adicionando-se 50µL de solução enzimática a 450µL de uma solução composta de 300 mg L⁻¹ de ácido ferúlico em tampão fosfato de sódio 50mM de pH 5,5. A mistura reacional foi incubada a temperatura de 40°C, e foram testados os tempos de reação de 2, 5, 10, 15 e 20 minutos. A escolha da temperatura de incubação e pH do substrato foi baseada em testes realizados previamente por Santos (2023), que estabeleceram estes como temperatura e pH ótimos para da FADase heteróloga. O presente ensaio foi realizado utilizando a solução de enzima pura e também o extrato bruto. A atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase foi medida pela redução da concentração de ácido ferúlico e formação de 4-vinilguaiacol, conforme descrito no item 3.2.2.

3.1.6 Estabilidade em variação de temperatura e pH

Foram realizados ensaios com a finalidade de verificar a estabilidade da enzima quando mantida em diferentes temperaturas e sua tolerância à variação de pH do substrato da reação. As temperaturas e pHs escolhidos para os ensaios foram baseados em testes realizados previamente por Santos e colaboradores (2021).

No teste de estabilidade em variação de temperatura, a enzima pura foi mantida em banho de aquecimento com rotação nas temperaturas de 4, 35, 40, 45, 50 e 55°C por 60min e em seguida submetida à reação com ácido ferúlico 300 mg L⁻¹ em tampão fosfato de sódio 50mM em sua temperatura e pH ótimos descritos nos estudos prévios (40 °C e pH 5,5). A atividade da enzima foi medida pela redução da concentração de ácido ferúlico e formação de 4-vinilguaiacol.

No ensaio de tolerância à variação de pH do substrato da reação a enzima pura foi adicionada em substrato de ácido ferúlico 300 mg L⁻¹ em tampão fosfato de sódio 50mM nas faixas de pH de 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5 em banho de aquecimento com rotação na temperatura de 40°C e incubado por 15 minutos. A atividade da enzima foi medida pela redução da concentração de ácido ferúlico e formação de 4-vinilguaiacol, conforme descrito no item 3.2.2.

3.1.7 Especificidade da ácido ferúlico descarboxilase

A especificidade da enzima, ou ação sobre diferentes substratos, foi analisada utilizando como substratos para a reação enzimática ácido *p*-cumárico e ácido cafeico, nas condições de ensaio descritas acima utilizando ácido ferúlico como substrato. A atividade da enzima foi medida pela redução do substrato e formação de produto.

3.1.8 Testes de precipitação

Antes do processo de imobilização foram investigados diferentes precipitantes: etanol nas concentrações de 50, 66 e 75%, polietilenoglicol (PEG) nas concentrações de 50, 66 e 75% e sulfato de amônio nas concentrações de 50, 66 e 75%. Os precipitantes foram adicionados às soluções de enzima pura e ao extrato bruto e mantidos sob agitação leve por 17h, em temperatura de 4°C. Após decorrido o tempo, foram conduzidos ensaios com as amostras como descrito previamente, adicionando-se 50 µL das amostras a 500 µL de uma solução de ácido ferúlico 300 mg L⁻¹ em tampão fosfato (fosfato de sódio 50 mM). A mistura reacional foi incubada a temperatura de 40°C, durante 5 minutos. A atividade da enzima foi medida pela redução da concentração de ácido ferúlico e formação de 4-vinilguaiacol.

3.1.9 Determinação da estabilidade térmica da enzima (*melting point*) por DSC (*Differential Scanning Calorimetry*)

Previamente à injeção no equipamento de DSC (CSC 6300 Nano DSC III), a amostra de FADase heteróloga pura foi concentrada de 100mL para 2mL. Para a concentração foi utilizado um concentrador de 30 kda que passou pelo processo de centrifugação a 4°C, 4000 rpm por 20 min. O processo foi repetido até que os 100mL passassem pelo concentrador. Para a injeção a concentração foi ajustada para 150µM.

A linha de base foi criada com seis corridas do tampão da enzima purificada. Foram realizadas três corridas com a amostra de FADase heteróloga para determinar não apenas o *melting point*, mas também para investigar a possibilidade

de um estágio de desenvolvimento intermediário da enzima. As corridas ocorreram na variação de temperatura de 35 a 90°C.

3.1.10 Investigação dos estágios de desenvolvimento da FADase heteróloga por CD (*Circular Dichroism*)

Para a análise em CD (Espectropolarímetro Jasco J-815 equipado com um Peltier Jasco CDF-426S), a concentração da amostra foi de 5µM. As leituras foram feitas a 222 nm e 218 nm, comprimentos de onda nos quais é possível observar as mudanças conformacionais das α-hélices e folhas β pregueadas, respectivamente, na variação de temperatura de 35 a 70°C.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteína foi estimada através do método de Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), usando o procedimento para microplaca e solução de albumina bovina como padrão em concentrações de 25 a 2000µg/mL e leitura de absorvância em espectrofotômetro (Molecular Devices SpectraMax) a 562 nm.

3.2.2 Análise dos compostos por cromatografia

O consumo de AF e a formação do 4VG foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Antes das injeções as amostras foram filtradas em filtros de Teflon de 0.22 µm. As amostras foram injetadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu Nexera XR com detector de arranjo de diodos na faixa espectral do UV/VIS. O método cromatográfico consistiu em eluição no modo gradiente, empregando como fases móveis: fase A (H₂O com 0,1% v/v de ácido trifluoroacético) e fase B (metanol com 0,1% v/v de ácido trifluoroacético). A coluna utilizada foi uma Discovery HS de fase estacionária de octadecilsilano (C18) de 5 µm de tamanho de partícula e 15cm X 4,6mm (comprimento X diâmetro) (Supelco). A eluição se deu seguindo as seguintes proporções: 40% de B de 0 a 2 min; de 40 a 90% de B de 2 a 9 min; 90% de B de 9 a 12 min; 40% de B de 12 a 13 min; mantido

40% de B até 15 min (final da corrida). Volume de injeção de 20 μ L, fluxo de 0,8 mL min⁻¹, detecção por espectrofotometria de UV-Vis (detector de arranjo de diodos) monitorando o comprimento de onda a 325 nm na quantificação de AF e a 260 nm na quantificação de 4VG, ambos comprimentos de lambda máximo dos compostos analisados.

3.3 Experimentação *in silico* – 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/>) a partir do sequenciamento feito por Santos (2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção, purificação e quantificação de FADase

A purificação da proteína foi realizada com sucesso e a pureza das alíquotas coletadas foi analisada por eletroforese com gel de poliacrilamida SDS-PAGE corado com nitrato de prata (Figura 5).

Figura 5 – Gel de poliacrilamida para detecção das bandas de FADase.



Fonte: Autora.

A estimativa da massa molecular das isoformas da enzima foi de 20 kDa, a partir da comparação com o padrão, o que corrobora a informação disponível na literatura de que uma única banda apresenta com massa molecular de cerca de 20,4 kDa e massa molecular da enzima nativa é de cerca de 40,4 kDa em solução (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1994).

A determinação da quantidade de proteínas totais na solução de enzima pura foi de 82 µg/mL e no extrato bruto, 272 µg/mL.

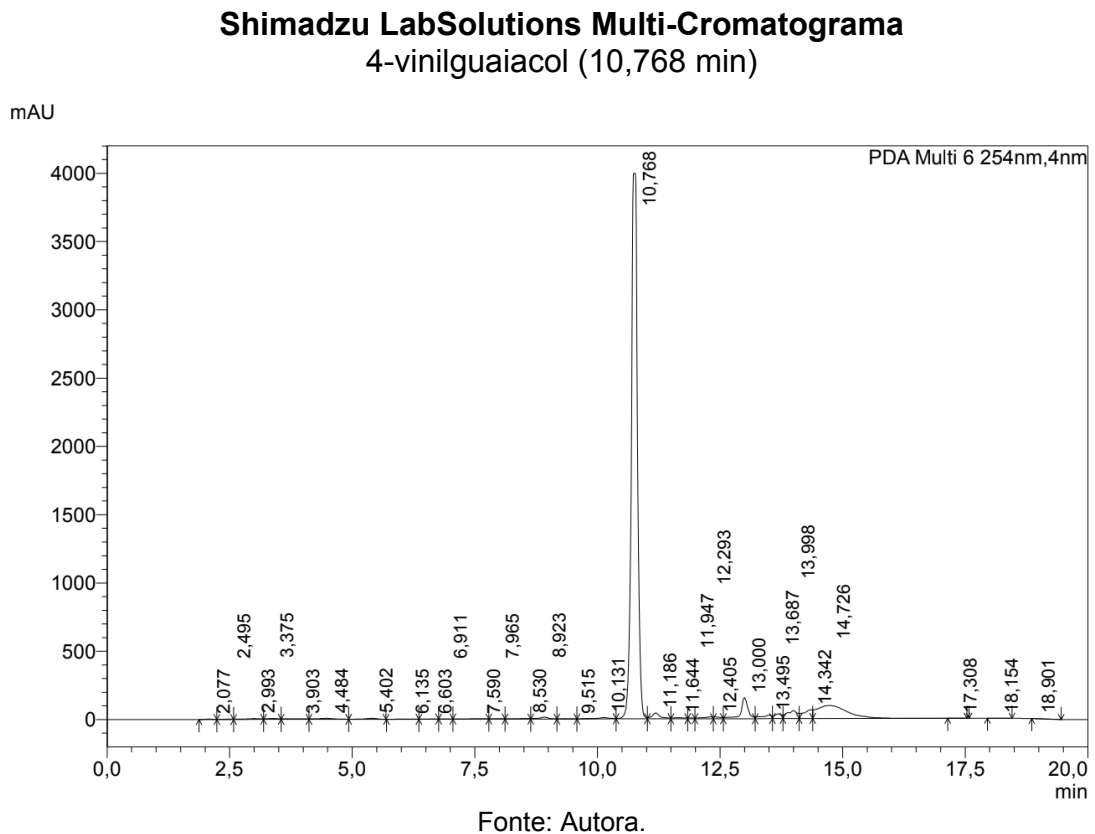
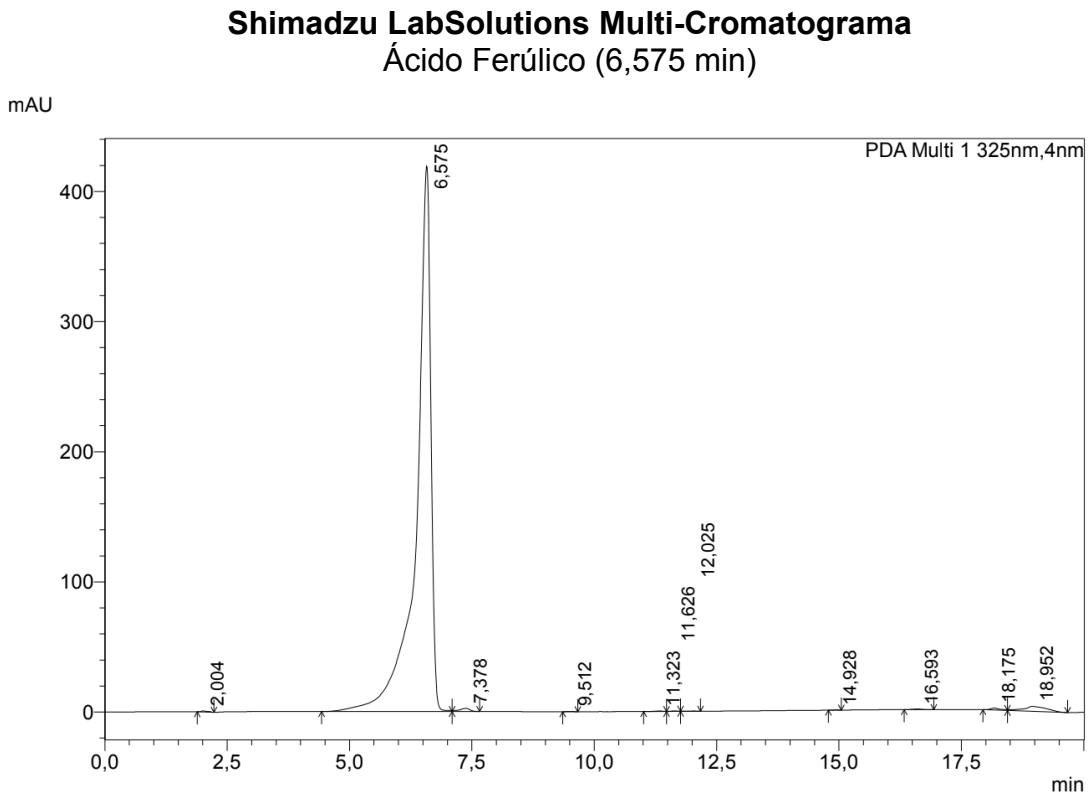
4.2 Determinação da atividade da FADase heteróloga

4.2.1 Tempo de conversão de AF em 4VG

A determinação do melhor tempo de reação tem a finalidade de manter o processo controlado e não prejudicar as posteriores quantificações de substrato e produto. A partir dos ensaios utilizando AF como substrato foi possível determinar o tempo ótimo de reação da enzima pura e do extrato bruto. O teste foi realizado em banho de aquecimento com rotação a 40 °C, em pH 5,5 (temperatura e pH ótimos observados nos ensaios anteriores), nos tempos de reação de 2, 5, 10, 15 e 20 minutos.

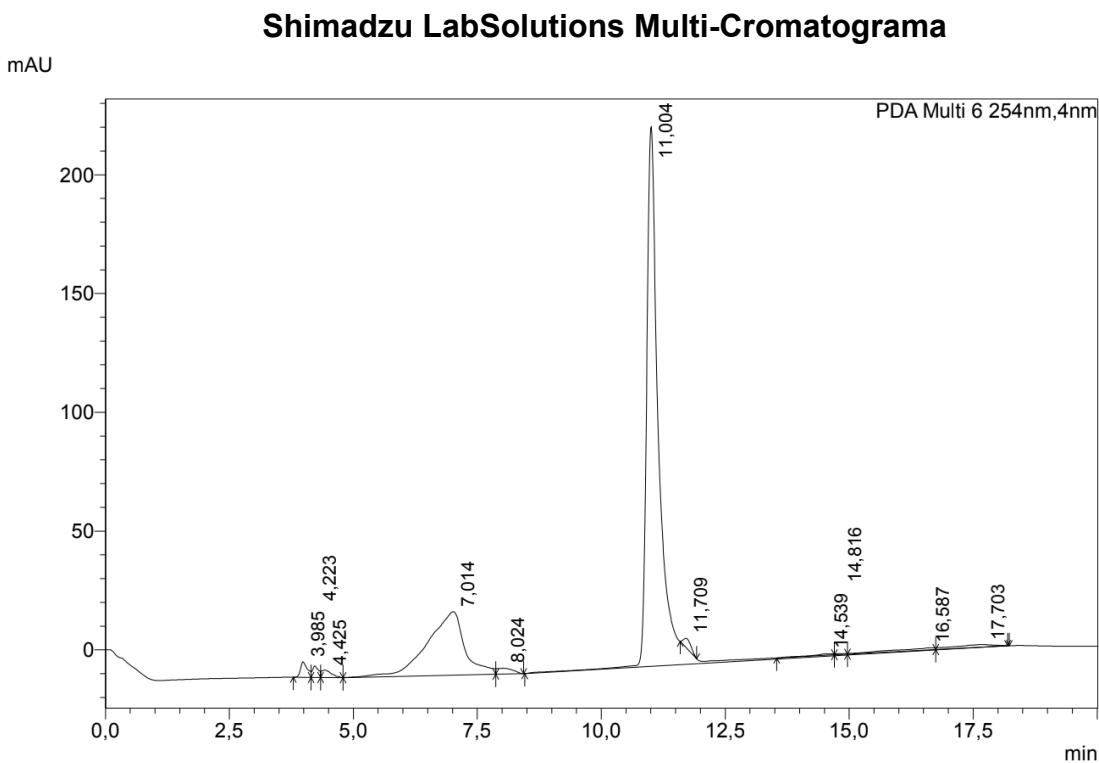
A quantificação dos compostos das amostras foi feita a partir da comparação com os padrões de AF e 4VG injetados em HPLC (Figuras 6 e 7). A partir dos valores obtidos, a concentração dos compostos foi calculada conforme o Apêndices A e B e obteve-se a curva de tempo de reação da FADase heteróloga (Figura 8).

Figura 6 – Cromatogramas dos padrões de AF e 4VG, com tempo de retenção de cerca de 6,5 min e 11,5 min.



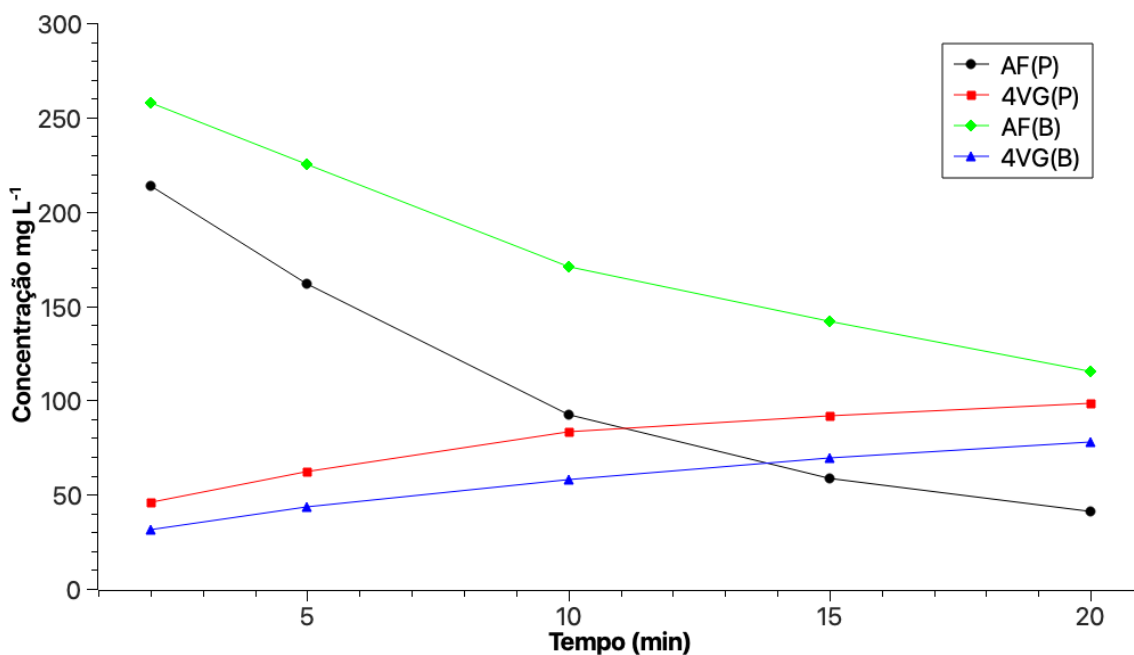
Fonte: Autora.

Figura 7 – Cromatograma de amostra analisada por CLAE para exemplo da identificação e quantificação dos compostos AF e 4VG a partir dos padrões, com tempo de retenção de 7 min e 11 min respectivamente.



Fonte: Autora.

Figura 8 – Curva de tempo de reação da enzima FADase com a finalidade de encontrar o tempo de reação mais eficiente para conversão de ácido ferúlico (AF) em 4-vinilguaiacol (4VG) e comparação da conversão de AF em 4VG utilizando a enzima purificada (P) e o extrato bruto (B).



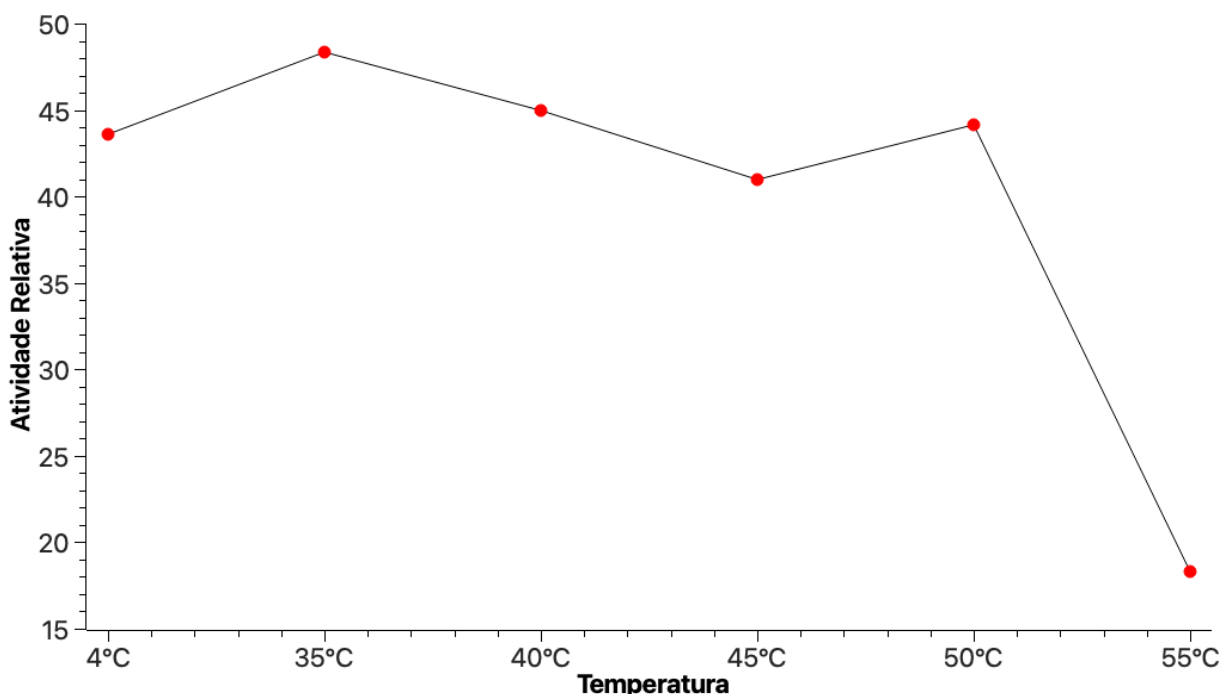
Fonte: Autora.

Ao observar a curva de tempo resultante deste ensaio (Figura 8), para a enzima pura, o melhor tempo de reação foi de 15 minutos. Para o extrato bruto, o tempo reacional é maior, apresentando melhor eficiência na produção de 4-vinilguaiacol em 20 minutos de reação. O melhor tempo de reação foi definido como o tempo no qual a enzima demonstra melhor eficiência na conversão de ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol sem esgotar seu substrato. Sob essas condições, também é possível observar uma produção semelhante de 4-vinilguaiacol comparando a enzima pura com o extrato bruto, uma forma economicamente mais viável considerando a produção em larga escala.

4.2.2 Estabilidade em variação de temperatura e pH

Com a finalidade de comparação e confirmação dos parâmetros ideais de atividade da enzima pura em sua forma livre foram realizados ensaios para verificar a estabilidade da enzima quando mantida por 60min em diferentes temperaturas (Figura 9) e sua tolerância à variação de pH do substrato da reação (Figura 10).

Figura 9 – Teste de estabilidade da enzima FADase pura à diferentes temperaturas

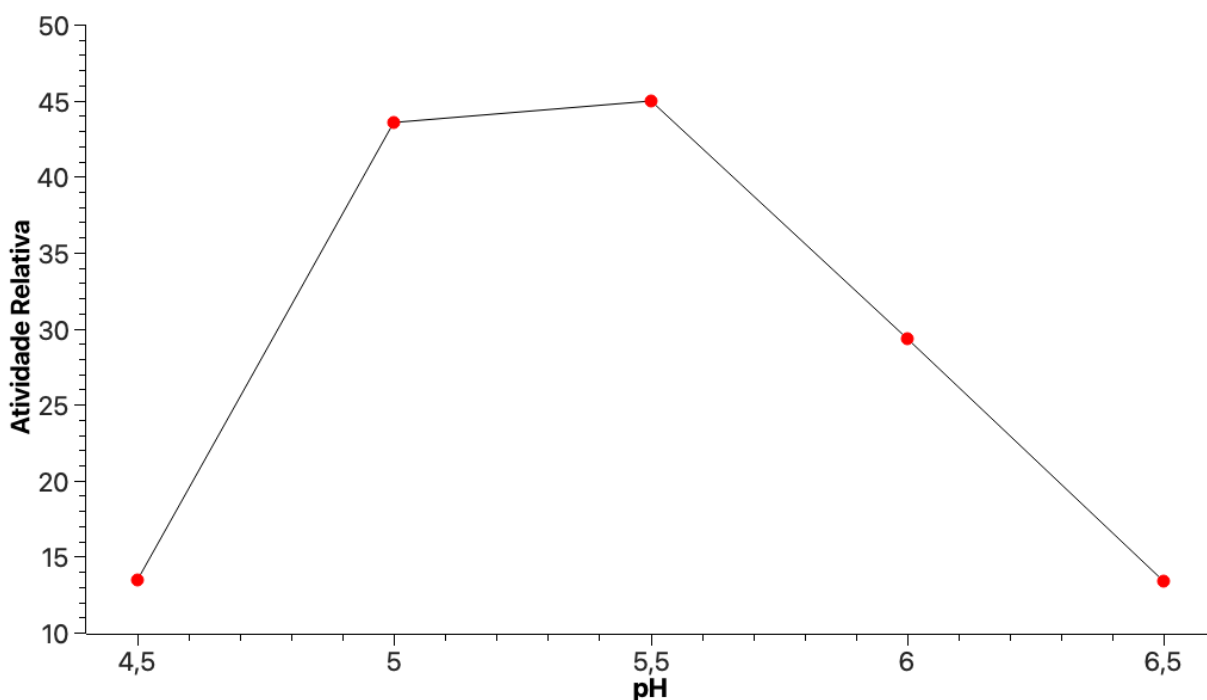


Fonte: Autora.

As temperaturas e pHs escolhidos para os ensaios foram baseados em testes realizados previamente por Santos (2023), nos quais a enzima pura mostrou estabilidade entre 20 e 45 °C, desnaturação em temperaturas superiores a 50 °C e

estabilidade na escala básica de pH, exibindo quase 100% de atividade entre pH 5,5 e 9. Na Figura 9 podemos observar que a faixa de estabilidade a temperatura se manteve semelhante à previamente estabelecida. Na Figura 10, diferente dos resultados obtidos por Santos em 2023, a enzima apresentou atividade na faixa de pH entre 5 e 6, sendo que em valores de pH acima de 5,5 a atividade já apresenta queda.

Figura 10 – Teste de atividade da enzima FADase pura em diferentes faixas de pH.



Fonte: Autora.

4.3 Teste de especificidade

Nas mesmas condições e metodologia em que foi realizado o teste de atividade, foram utilizados como substrato para reação enzimática, ao invés de AF, os substratos ácido p-cumárico e ácido cafeico com a finalidade de testar a especificidade da enzima FADase. A enzima apresentou atividade em ambos os substratos, que foi observada pela redução da quantidade de ácido ferúlico no meio reacional e formação de produtos 4-vinil derivados.

4.4 Teste de precipitantes

Ao utilizar precipitantes espera-se conseguir uma solução enzimática mais concentrada para as reações. Os precipitantes mais comumente utilizados de acordo com a literatura são acetona, etanol, sulfato de amônio e polietilenoglicol. Em testes previamente feitos por Santos (2023) a enzima se tornou inviável em acetona.

Ao testar os demais precipitantes foi possível observar melhores resultados em termos de produção de 4-vinilguaiacol ao utilizar sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) como precipitante tanto para a enzima pura quanto para o extrato bruto, seguido por polietilenoglicol (PEG) (Tabela 1). Etanol inviabilizou a enzima.

Tabela 1 – Comparação entre os precipitantes em diferentes concentrações adicionados à solução de enzima pura (EP) e extrato bruto (EB) a partir da quantidade de 4VG formado (mg.L^{-1}).

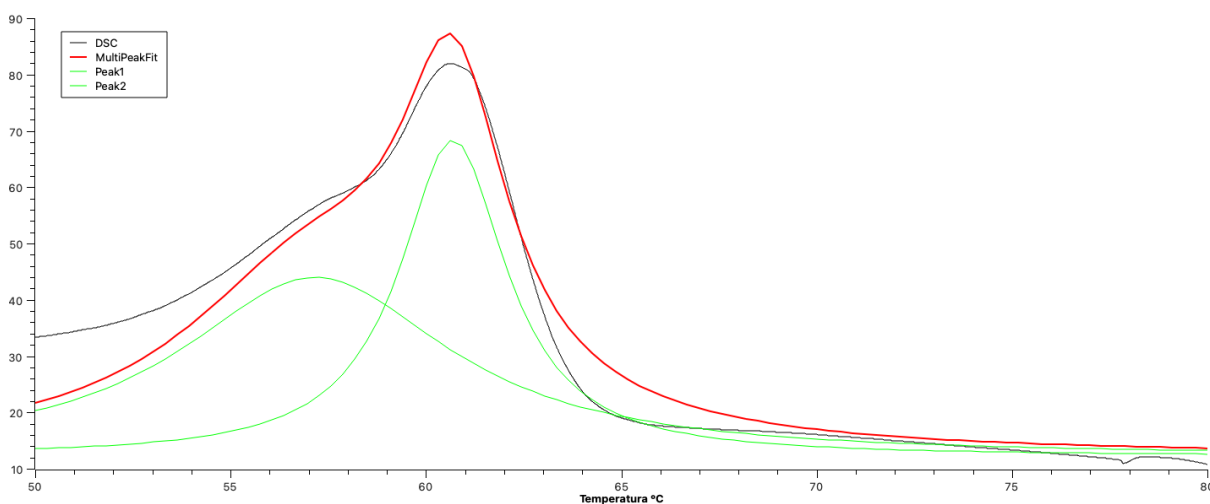
Solução	50% de precipitante		66% de precipitante		75% de precipitante	
	EP	EB	EP	EB	EP	EB
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1255	1344	672	1506	619	1287
PEG	958	111	9	116	7	46

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Determinação do *melting point* por DSC (*Differential Scanning Calorimetry*)

A partir de DSC foi possível estabelecer a temperatura de desenovelamento da enzima em 60°C . Na Figura 11 é possível observar que se forma um máximo local antes do máximo global, o que sugere a possibilidade de um estágio intermediário de desenovelamento da FADase. No entanto, também podemos observar que a temperatura entre os dois picos são próximas, o que impossibilita a confirmação de três estágios.

Figura 11 – DSC para determinação de *melting point* e investigação de estágio intermediário na enzima FADase.



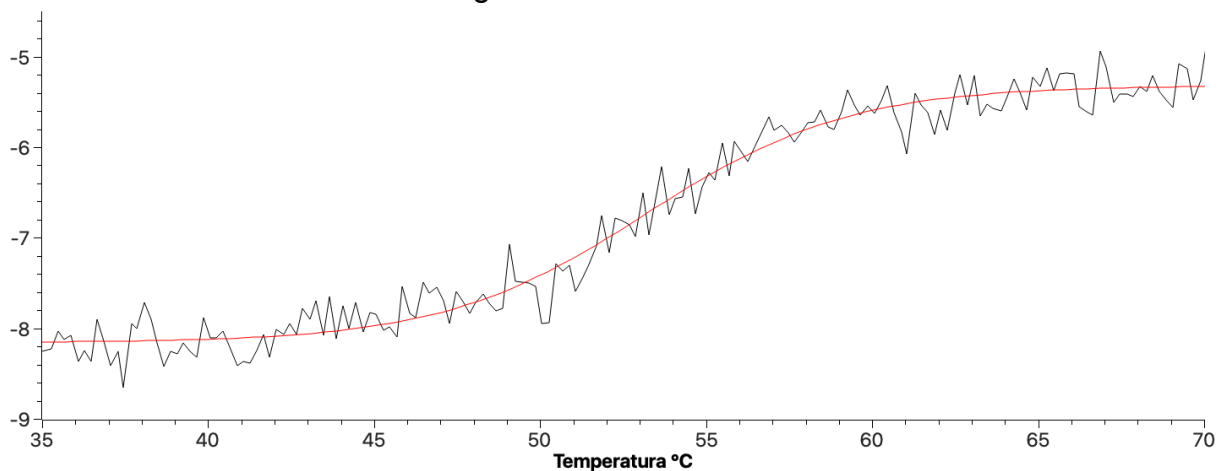
Fonte: Autora.

A existência de um estágio intermediário seria interessante para as futuras aplicações da enzima, já que neste estágio a enzima pode apresentar propriedades diferentes das apresentadas em seu estado de completo enovelamento.

4.6 Investigação dos estágios de desenovelamento da FADase heteróloga por CD (*Circular Dichroism*)

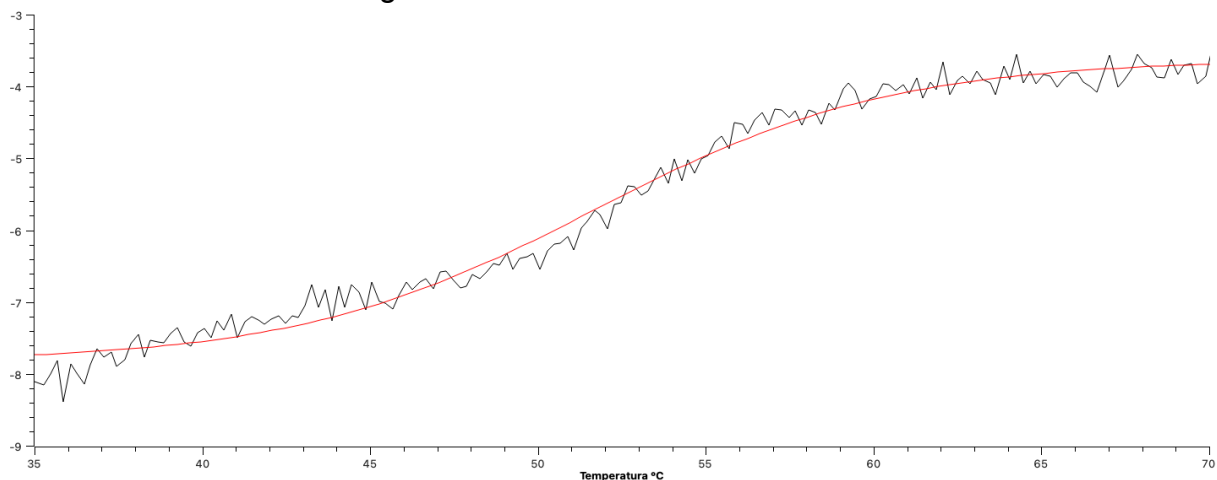
Para confirmar a existência ou não existência de um estágio intermediário de desenovelamento da enzima, amostras de FADase heteróloga pura foram analisadas em CD nos comprimentos de onda de 218 nm (Figura 12) e 222 nm (Figura 13).

Figura 12 – CD com variação de temperatura de 35°C a 70°C a 218 nm para averiguação de mudança conformacional de folhas β -pregueadas para análise de indicativo de estágio intermediário da enzima FADase.



Fonte: Autora.

Figura 13 – CD com variação de temperatura de 35°C a 70°C a 222 nm para averiguação de mudança conformacional de α -hélices para análise de indicativo de estágio intermediário da enzima FADase.



Fonte: Autora

A partir dos gráficos obtidos das leituras realizadas por CD é possível afirmar que a enzima possui apenas dois estágios, enovelado e desenovelado. O pico na temperatura de 57°C no gráfico da análise por DSC (Figura 11) é provavelmente a quebra do dímero antes do completo desenovelamento.

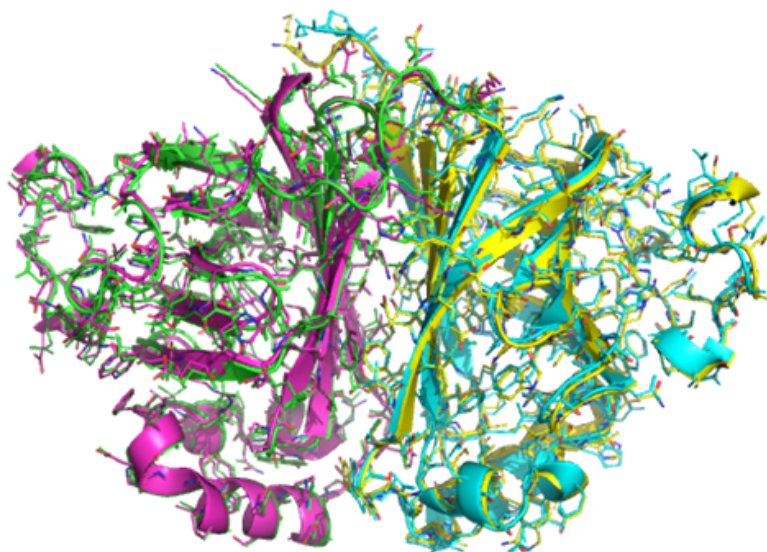
4.7 Modelagem

4.7.1 Modelos estruturais da FADase

A biologia estrutural tem grande importância para o entendimento da função de uma enzima. Existem diversas cadeias polipeptídicas (estrutura linear da proteína) depositadas em bancos de dados, mas apenas 3% dessas cadeias têm estruturas resolvidas e suas estruturas tridimensionais determinadas. 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 e o programa Swissmodel.

Com os modelos sugeridos para a estrutura tridimensional da FADase apresentados na Figura 14 foi possível fazer a comparação das estruturas da enzima. As duas estruturas são muito próximas, tendo um RMSD de apenas 0,7 Å com respeito aos átomos pesados, sugerindo alta confiabilidade do modelo estrutural.

Figura 14 – Comparação das estruturas da enzima utilizando Alphafold Multimer (magenta e amarela) e a plataforma Swissmodel (verde e ciano)



Fonte: Autora.

Gerando os modelos da enzima foi possível observar a ausência de cisteína e pontes dissulfeto, o que explica os resultados que os estudos prévios realizados por Santos (2023) demonstraram para a enzima em relação aos efeitos de DTT (ditiotreitól). Nestes estudos, o DTT reduziu 10% a capacidade catalítica da enzima heteróloga, demonstrando que o aumento da promiscuidade da enzima em relação ao substrato na presença de DTT relatado por Huang e colaboradores (2012) não pode ser aplicado a todas enzimas da família de descarboxilases de ácido fenólico.

A grande quantidade de lisina que pôde ser observada no homodímero a partir dos modelos gerados é favorável ao uso do glutaraldeído como reticulante. O glutaraldeído é um composto bifuncional principalmente usado em modificações químicas de proteínas e polímeros e liga-se covalentemente aos grupos amina de lisina ou hidroxilisina na proteína criando uma estrutura mais estável do que aquela alcançada pela agregação física de moléculas de proteína induzida pela adição de sais, solventes orgânicos ou polímeros não iônicos (SILVA et al., 2004).

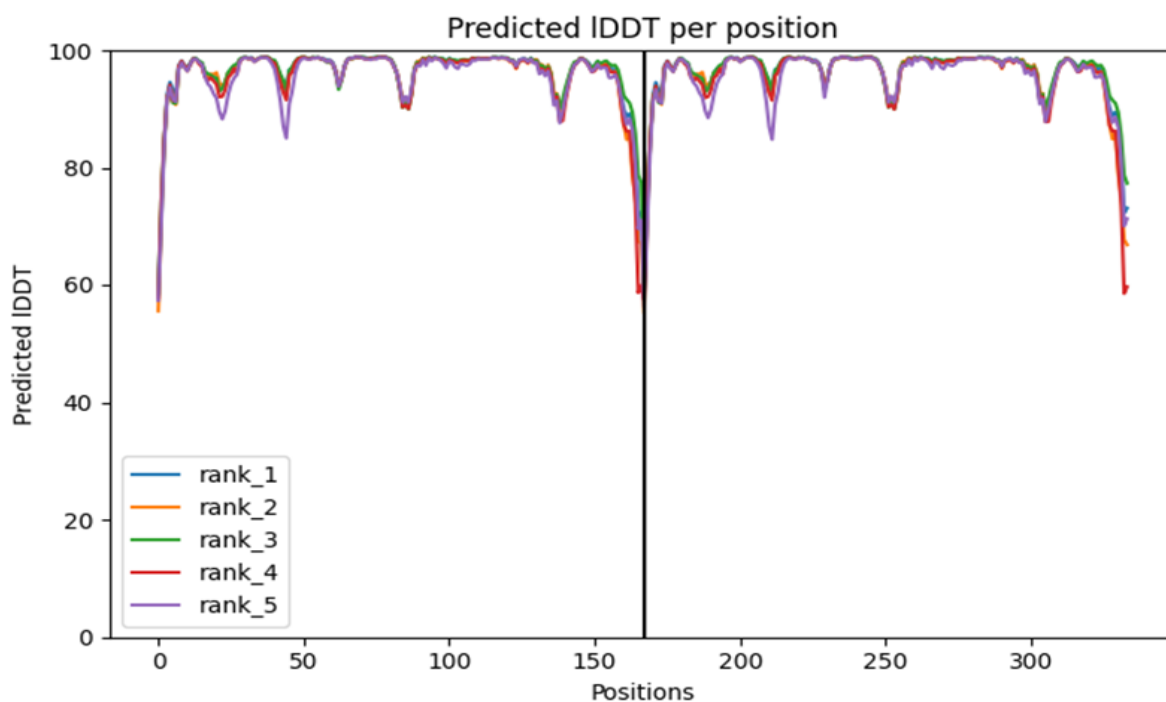
4.7.2 Modelos estruturais da FADase gerados por AlphaFold

Pelo AlphaFold foram gerados cinco modelos de dímeros, ou seja, cinco representações de como uma cadeia polipeptídica está ligada a outra.

A posição dos resíduos de aminoácidos (cadeias laterais) são responsáveis pelo mecanismo de ação das proteínas e a confiabilidade dessas posições é calculada pelo teste de diferença de distância local (IDDT), que avalia as diferenças de distância local de todos os átomos de um modelo (Figura 15).

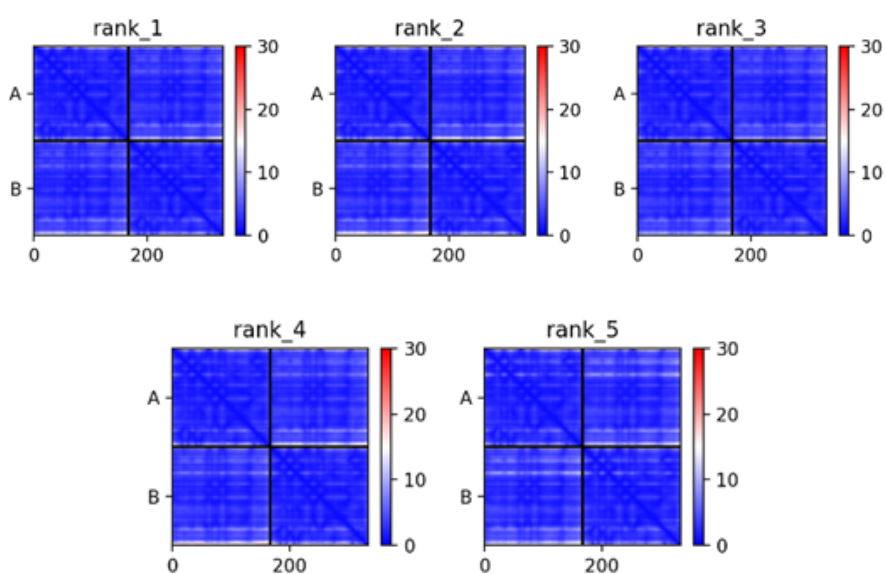
A confiabilidade dos modelos gerados também é demonstrada na Figura 16, a partir da avaliação da posição relativa dos resíduos de aminoácidos, onde o erro é medido nas posições de todos os pares de resíduos do dímero, e na Figura 17, onde é demonstrada a comparação da sequência alvo com sequências da base de dados UniRef. O comprimento das linhas (Figura 17) indica o segmento da sequência alvo que foi coberto pelas sequências achadas. Para ter bons modelos é preciso achar mais de 50 sequências para cada segmento da proteína alvo.

Figura 15 – Valores de IDDT para cada resíduo em cada modelo gerados por AlphaFold. A linha vertical indica o fim de uma cadeia e começo da outra. Valores maiores de 80 indicam alta confiabilidade do modelo.



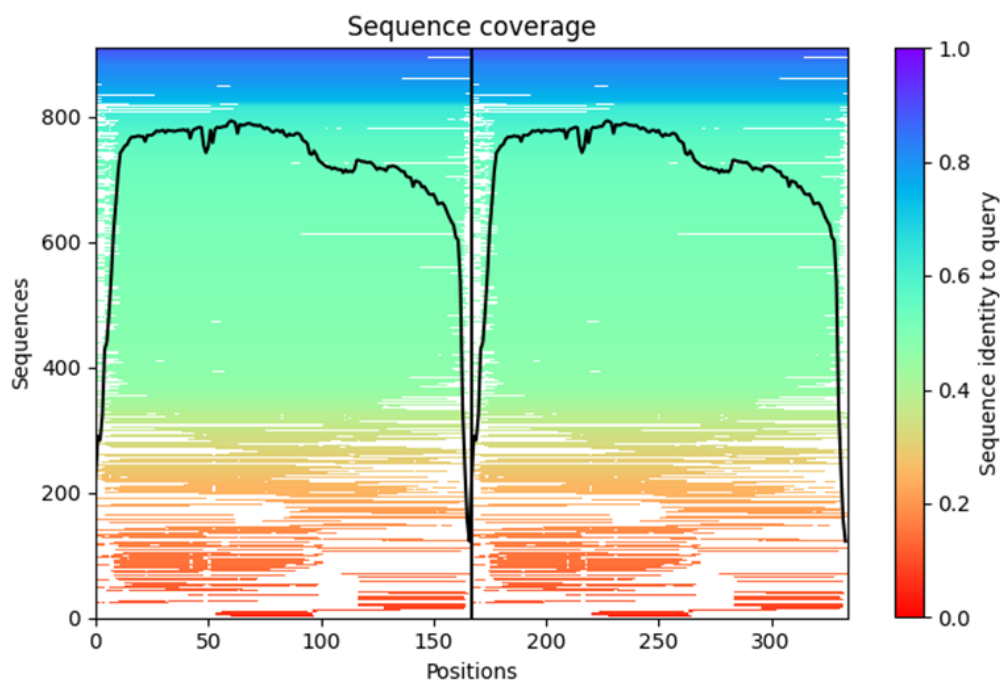
Fonte: Autora.

Figura 16 – Erro de alinhamento predito. Indica o erro esperado nas posições relativas de pares de resíduos nos cinco modelos de dímeros gerados. Regiões em azul indicam alta confiança.



Fonte: Autora.

Figura 17 – Número de seqüências homólogas abrangendo diferentes % de identidade (barra à direita) com a seqüência alvo. As linhas dentro do gráfico estão coloridas de acordo com a legenda de cores.



Fonte: Autora.

4.7.3 Modelo estrutural da FADase gerado por homologia

O modelo gerado por homologia foi feito a partir de uma base de dados de seqüências disponíveis (PDB) (Figura 18). A identidade demonstrada em seqüência é de 87.43% (muito elevada), o que indica que pode ser gerado um modelo por homologia de alta qualidade.

Figura 18 – Alinhamento da seqüência alvo com o molde (PDB 4UU2).

```

Model_01:A MSTFDKHDLSGFIGKHKKYTDNGWNYEIVYKIDGHTLDYRDSHGIVGNRRVVKDQAYIVE 60
Model_01:B MSTFDKHDLSGFIGKHKKYTDNGWNYEIVYKIDGHTLDYRDSHGIVGNRRVVKDQAYIVE 60
4uu2.1.AMNTFDKHDLSGFVGGKHLVYTYDNGWVEYEIVYKIDENITLDYRDSHGLVGNRRVVKDQAYIVR 60

Model_01:A VCESLYKISWDPEPTGTDVSLIVVLDGDLFHHGTIEPERWIMNNEEKTVCQNDH(IPLMNSY 120
Model_01:B VCESLYKISWDPEPTGTDVSLIVVLDGDLFHHGTIEPERWIMNNEEKTVCQNDH(IPLMNSY 120
4uu2.1.AVCESELYKISWDPEPTGTDVSLIVVLDGDSLFHHGTIEPERWVMNNEEKTVCQNDH(IPLMNSY 120

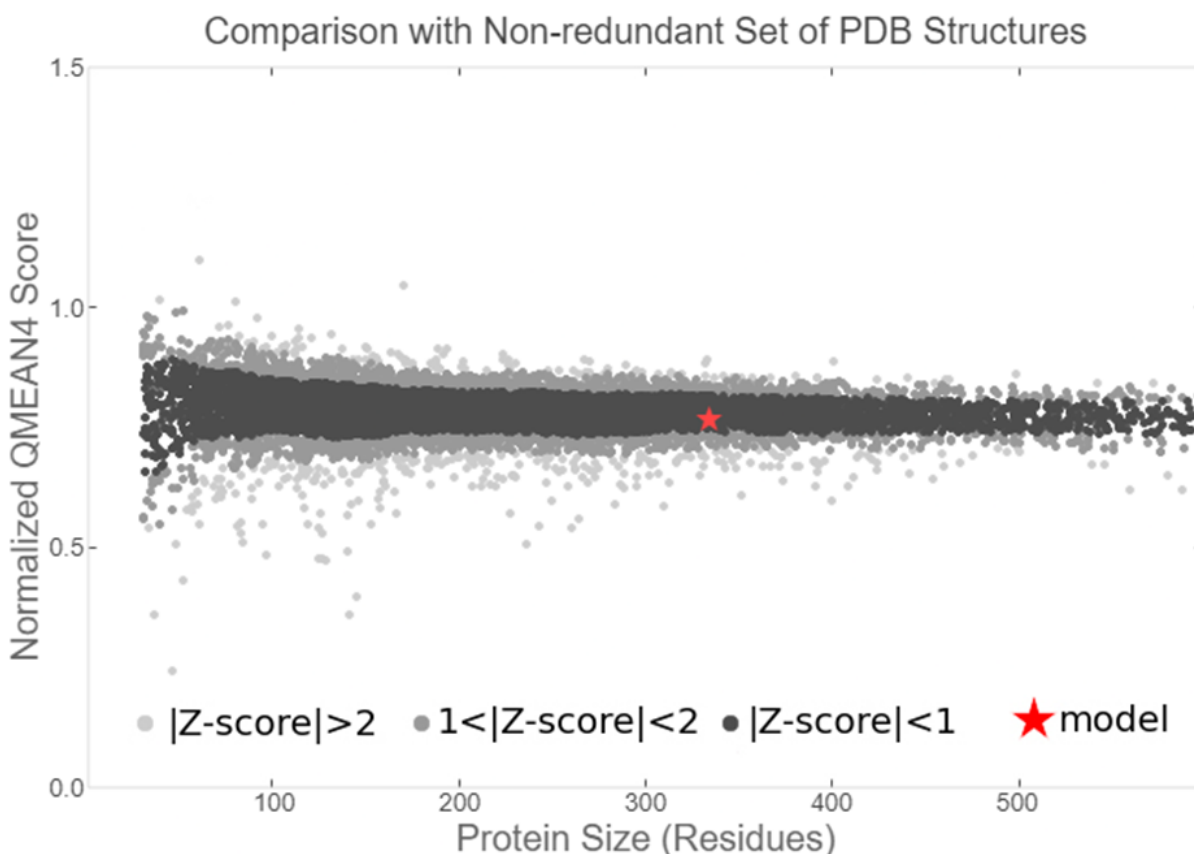
Model_01:A RDEGPAAYPTEVIDEFATITEIRDCGADNDEVINCPASELPADFPANI 167
Model_01:B RDEGPAAYPTEVIDEFATITEIRDCGADNDEVINCPASELPADFPANI 167
4uu2.1.ARDEGPAAYPTEVIDEFATITEVRRDCGANNESVIACRASELPKNFDPNL 167

```

Fonte: Autora.

Na Figura 19, podemos avaliar a qualidade do modelo a partir do valor de Z-score. Para o modelo proposto, o valor (estrela vermelha) se encontra dentro da distribuição de valores correspondentes a estruturas conhecidas de proteínas (região em preto), o que significa que o modelo é confiável.

Figura 19 – Valor de Z-score para o modelo gerado por homologia.

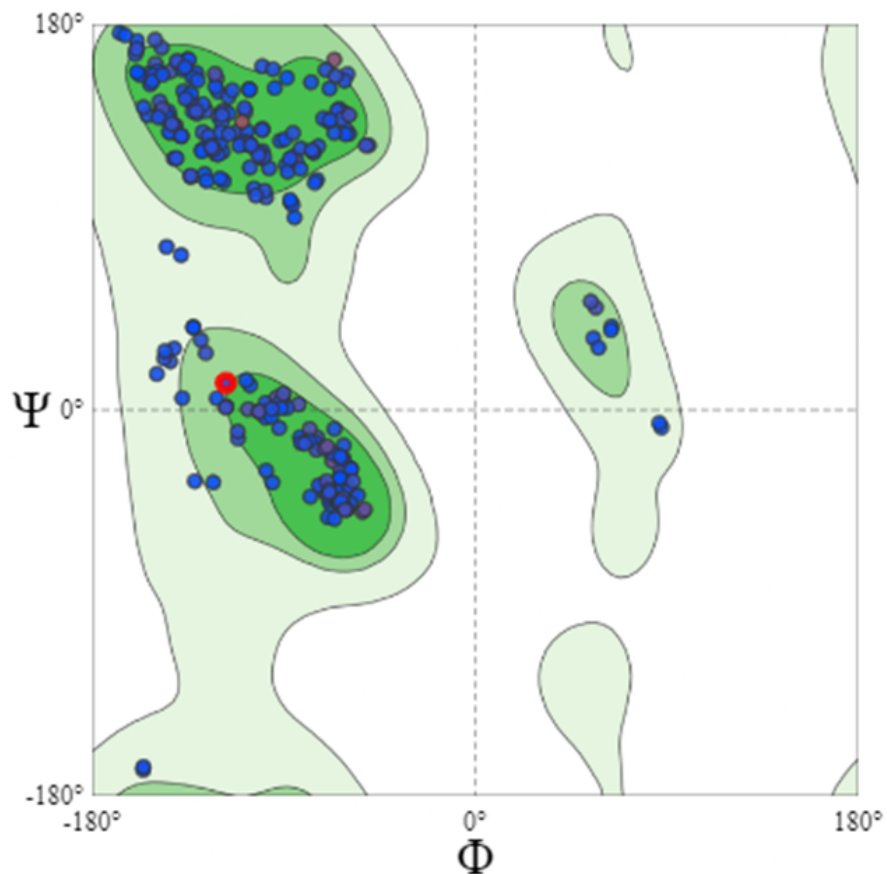


Fonte: Autora.

Para indicar a confiabilidade do modelo, também é possível recorrer ao Gráfico de Ramachandran (Figura 20). Ao falar de resíduos de aminoácidos, existem ângulos possíveis e ângulos impossíveis. As ilhas em cor verde na Figura 20 são ilhas de possibilidade de ângulo, ou seja, quando um aminoácido (em azul na Figura 20) se encontra dentro destas ilhas ele se encontra em uma angulação possível de acontecer. Todos os aminoácidos do proposto estão concentrados em regiões permitidas (em verde), indicando que é um bom modelo.

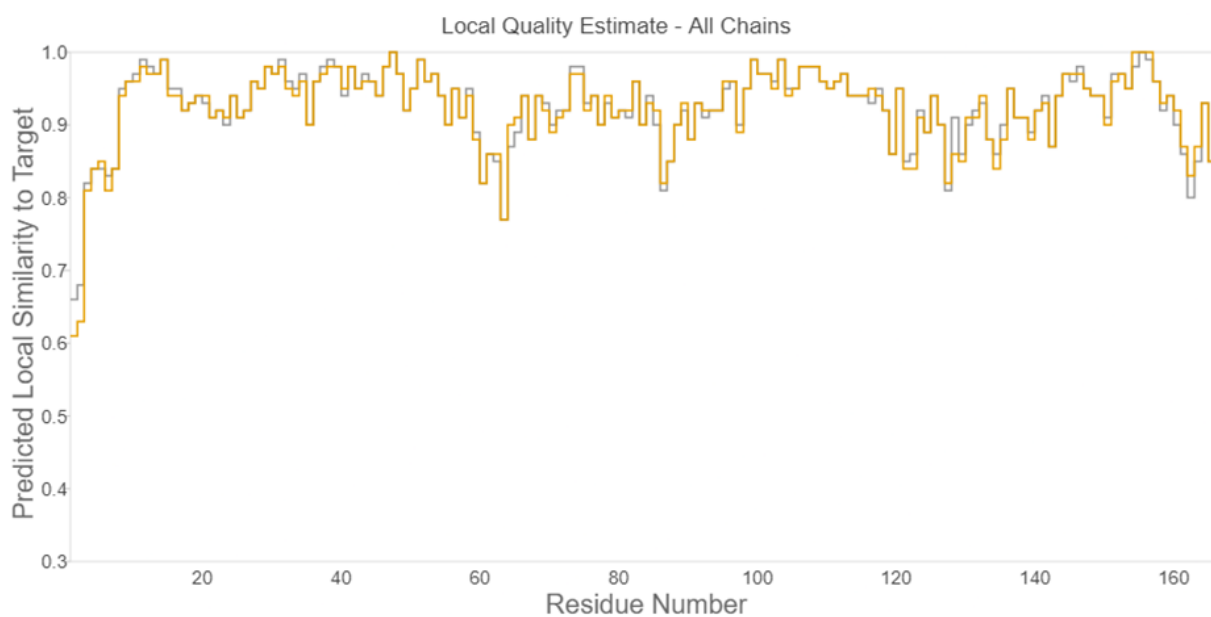
Ainda para verificar a qualidade e confiabilidade do modelo criado por homologia, os aminoácidos foram avaliados, resíduo por resíduo (Figura 21). Os altos valores indicam melhor qualidade do modelo.

Figura 20 – Gráfico de Ramachandran para os ângulos diedros Phi (eixo x) e Psi (eixo y) no modelo.



Fonte: Autora.

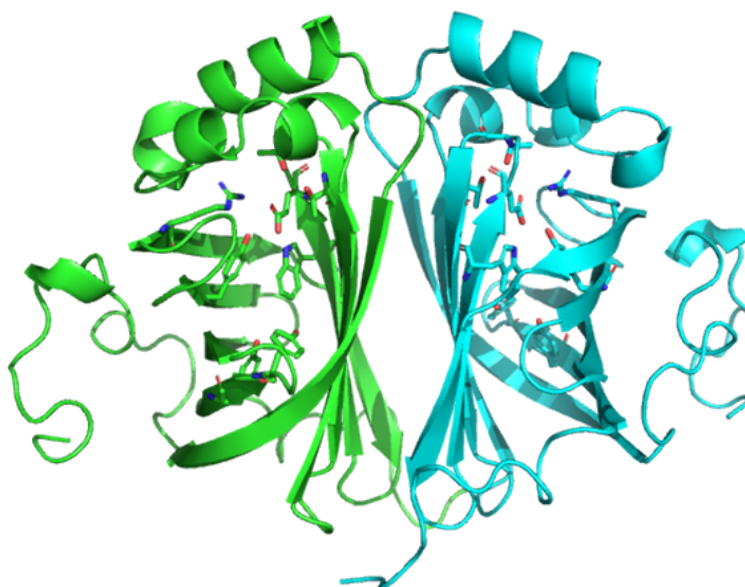
Figura 21 – Similaridade local com o molde. O eixo x representa os resíduos de aminoácidos e o eixo y representa a similaridade local com o molde.



Fonte: Autora.

O modelo gerado por homologia foi representado estruturalmente mostrando em *sticks* os resíduos catalíticos e os resíduos determinados a partir das proteínas da família com estruturas conhecidas (Figura 22).

Figura 22 – Representação estrutural da enzima mostrando em *sticks* os resíduos catalíticos.



Fonte: Autora.

O sítio catalítico representado no modelo corrobora com a literatura, onde este é descrito por Gu e colaboradores (2011) como um tambor de fundo semi-aberto com o sítio catalítico situado entre o centro (núcleo) do barril e o fundo helicoidal. Análises estruturais realizadas por este grupo ainda indicam que a FADase catalisa reações por um mecanismo de “abre-fecha”, que tem sua abertura induzida por análogos do substrato (ácido ferúlico). Embora diferentes abordagens tenham sido relatadas para a imobilização de biocatalisadores, não há literatura aprofundada disponível sobre o envolvimento de locais ativos da enzima durante a imobilização (ROCHA, 2021).

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nos experimentos *in vitro* apresentados neste capítulo foi possível purificar a enzima de forma efetiva e que, ao comparar a atividade relativa da FADase pura e do extrato bruto não é observada diferença significativa na quantidade de produto. Este resultado permite inferir que é possível

utilizar o extrato bruto de expressão da FADase heteróloga para produção de 4-vinilguaicol, um resultado positivo, já que o emprego do extrato bruto é uma forma economicamente mais viável considerando a produção em larga escala. Quanto ao tempo reacional, a enzima pura apresenta menor tempo de reação para produção de 4VG, apresentando tempo ótimo de 15 minutos enquanto o extrato bruto mostrou melhores resultados em 20 minutos.

De acordo com os testes de estabilidade e tolerância, a FADase heteróloga demonstrou atividade apenas na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 e a enzima perde atividade em temperaturas superiores a 50°C. Quanto à especificidade ao substrato, a enzima apresentou atividade não apenas em AF como também em ácido cafeico e *p*-cumárico. Este resultado possibilita estudos futuros a respeito do seu emprego na produção de 4-vinil derivados.

O *melting point* da FADase heteróloga foi estabelecido por DSC na temperatura de 50°C, e por CD confirmou-se que a enzima apresenta apenas dois estágios, enovelado e desenovelado.

A FADase também demonstrou ser tolerante aos precipitantes sulfato de amônio e polietilenoglicol. Dentre estes dois, o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se apresentou como melhor precipitante a ser utilizado em aplicações futuras, como imobilização enzimática. Quanto à imobilização da enzima, nos modelos gerados *in silico* também foi possível inferir que a enzima apresenta estrutura favorável a utilização de glutaraldeído como agente reticulante devido a grande quantidade de resíduos de lisina observados nos modelos gerados. Nos modelos computacionais também foi possível confirmar a estrutura homodímero da FADase e seu sítio catalítico.

REFERÊNCIAS

BAQUEIRO-PEÑA, I.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.; GONZÁLEZ-ZAMORA, E.; AUGUR, C.; LOERA, O.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., 2010. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaicol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. **Bioresource technology**, 101(12), pp.4721-4724.

BETTIO, G., 2020. **Avaliação da bioconversão de ácido ferúlico em aromas vaniloides por leveduras isoladas da biodiversidade latino-americana**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GU, W.; LI, X.; HUANG, J.; DUAN, Y.; MENG, Z.; ZHANG, K. Q.; YANG, J., 2011. Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the *Enterobacter sp.*

Px6-4 gene for ferulic acid decarboxylase. **Applied microbiology and biotechnology**, 89(6), pp.1797-1805.

HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P., 1994. Purification and characterization of a ferulic acid decarboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, 176(19), 5912-5918.

LEE, I. Y.; VOLM, T. G.; ROSAZZA, J. P., 1998. Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. **Enzyme and microbial technology**, 23(3-4), 261-266.

LI, L.; LONG, L.; DING, S., 2019. Bioproduction of high-concentration 4-vinylguaiacol using whole-cell catalysis harboring an organic solvent-tolerant phenolic acid decarboxylase from *Bacillus atrophaeus*. **Frontiers in microbiology**, 10, p.1798.

LUO, Y.; WANG, C. Z.; SAWADOGO, R.; YUAN, J.; ZENG, J.; XU, M.; TAN, T.; YUAN, C.S., 2021. 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**.

ROCHA, C. O. D., 2021. **Influência de campo magnético alternado em celulases imobilizadas em nanopartículas magnéticas: aplicação na hidrólise de bagaço de cana**. Tese de Doutorado em Química – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Câmpus Araraquara.

SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRÍGUEZ-SOLANA, R.; DOMÍNGUEZ, J. M., 2012. Purification of ferulic acid solubilized from agroindustrial wastes and further conversion into 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii* using solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, 39, 52-61.

SALGADO, J. M.; RODRÍGUEZ-SOLANA, R.; CURIEL, J. A.; DE LAS RIVAS, B.; MUNOZ, R.; DOMÍNGUEZ, J. M., 2014. 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**, 58, 22-28.

SANTOS, M. B. C., 2023. **Produção de ácido ferúlico usando descarboxilase heteróloga de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 e aplicação da enzima na produção de 4- vinilguaiacol**. Tese de Doutorado em Microbiologia – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto.

SANTOS, M. B. C., 2018. **Biotransformação bacteriana de ácido ferúlico obtido de resíduo lignocelulósico a 4-vinilguaiacol**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto.

SANTOS, M. B. C.; SCARPASSA, J. A.; MONTEIRO, D. A.; LADINO-ORJUELA, G.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E., 2021. Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7. **Brazilian Journal of Microbiology**, 52(3), 1181-1190.

SILVA, C. J.; SOUSA, F.; GÜBITZ, G.; CAVACO-PAULO, A., 2004. Chemical modifications on proteins using glutaraldehyde. **Food Technology and Biotechnology**, 42(1), 51-56.

SUN, L. H.; LV, S. W.; YU, F.; LI, S. N.; HE, L. Y., 2018. Biosynthesis of 4-vinylguaiacol from crude ferulic acid by *Bacillus licheniformis* DLF-17056. **Journal of biotechnology**, 281, pp.144-149.

TAŃSKA, M.; MIKOŁAJCZAK, N.; KONOPKA, I., 2018. 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**, 240, pp.679-685. GU, W.; YANG, J.; LOU, Z.; LIANG, L.; SUN, Y.; HUANG, J.; YI, X. L.; ZHAOHUI, C. M.; ZHANG, K. Q., 2011. Structural basis of enzymatic activity for the ferulic acid decarboxylase (FADase) from *Enterobacter sp.* Px6-4. **PloS one**, 6(1), e16262.

CAPÍTULO III

Imobilização de enzima ácido ferúlico descarboxilase heteróloga para aplicação na produção de 4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico

RESUMO

A bioconversão do ácido ferúlico (AF) em 4-vinilguaiacol (4VG) acontece por descarboxilação biológica não oxidativa do AF por ação da enzima ácido ferúlico descarboxilase (FADase) presente em microrganismos, principalmente bactérias. O 4VG é um composto fenólico volátil, muito utilizado por seu aroma picante de cravo bastante persistente mesmo em pequenas concentrações. A crescente demanda por processos industriais sustentáveis e as limitações na obtenção de produtos de importância industrial têm tornado a tecnologia enzimática uma alternativa cada vez mais oportuna, contando com diferentes protocolos de imobilização. A imobilização enzimática através de *cross-linking*, que forma agregados enzimáticos (CLEAs) se destaca devido à sua simplicidade e baixo custo, estabilidade e grande volume de atividade, armazenamento e reutilização. Através de ligação covalente, partículas magnéticas também têm sido amplamente usadas na imobilização, podendo ser facilmente recuperadas pela ação de um campo magnético. Os m-CLEAs são uma mistura homogênea de enzimas e partículas magnéticas, resultando em alta atividade e facilidade de separação em escala industrial. O presente trabalho objetivou a imobilização de enzima FADase bacteriana heteróloga para otimização dos parâmetros de atividade da enzima visando produção industrial de 4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico. As tentativas de imobilização da enzima se deram pelos métodos de CLEAs e m-CLEAS, utilizando glutaraldeído como reticulante. A atividade da FADase foi medida pela redução de AF e formação de 4VG quantificada por HPLC. Os dados de atividade indicaram uma perda de atividade da enzima na CLEAs. Para investigar a interação enzima-ligante foi utilizado o método de supressão em espectroscopia de fluorescência, nas temperaturas de 2°C, 4°C e 6°C, utilizando concentração de FADase heteróloga pura de 6µM em 2 mL e realizando titulações crescentes de glutaraldeído, ligante a ser analisado. O comprimento de onda para excitação dos triptofanos foi de 295 nm e o de coleta dos espectros foi de 305 a 500 nm. Com os dados obtidos no espectrofluorímetro foram confirmados dois sítios de ligação e uma constante de associação muito baixa para uma ligação estável, possível razão da baixa atividade observada. Estes dados ainda são inconclusivos e novos ensaios serão realizados.

Palavras-chave: Ácido ferúlico descarboxilase. 4-vinilguaiacol. Imobilização em CLEA. m-CLEA. Espectroscopia de fluorescência.

1 INTRODUÇÃO

A enzima ácido ferúlico descarboxilase (FADase) é um homodímero da família das liases responsável por catalisar a conversão do ácido ferúlico (AF) em 4-vinilguaiacol (4VG). A bioconversão do AF em 4VG acontece por descarboxilação biológica não oxidativa do AF por ação da FADase presente em microrganismos, principalmente bactérias (SANTOS, 2018; GU et al., 2011).

O 4VG é um composto fenólico volátil, muito utilizado em alimentos e bebidas por possuir o aroma picante de cravo bastante persistente mesmo em pequenas concentrações (BETTIO, 2020; LI; LONG; DING, 2019; SUN et al, 2018;). Também é utilizado nas indústrias cosmética, farmacêutica e química (LUO et al., 2021; LI; LONG; DING, 2019; TAŃSKA; MIKOŁAJCZAK; KONOPKA, 2018).

A crescente demanda por processos industriais sustentáveis e as limitações na obtenção de produtos de importância industrial têm tornado a tecnologia enzimática uma alternativa cada vez mais oportuna, contando com diferentes protocolos de imobilização que se diferenciam quanto ao tipo de suporte e eficiência (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020; SOUZA et al., 2017). A imobilização de biomoléculas envolve a ligação de um alvo de origem biológica (nesse caso, enzima) em uma matriz insolúvel (suporte), e pode ser dividida em três métodos tradicionais: aprisionamento, ligação a um suporte e *cross-linking* (FURLANI et al., 2020).

A imobilização enzimática através de *cross-linking*, que forma agregados enzimáticos (CLEAs), se destaca devido à sua simplicidade e baixo custo, estabilidade e grande volume de atividade, armazenamento e reutilização (CUI et al., 2017; SHELDON, 2011). Através de ligação covalente, partículas magnéticas também têm sido amplamente usadas na imobilização de enzimas, podendo ser facilmente recuperadas pela ação de um campo magnético (TURAL et al., 2013). Os m-CLEAs são uma mistura homogênea de enzimas e partículas magnéticas, resultando em alta atividade e facilidade de separação em escala industrial (SHELDON; SORGEDRAGER; KONDOR, 2016; SHELDON, 2019).

A partir dos avanços da tecnologia enzimática, o presente trabalho teve como objetivo a imobilização de enzima FADase bacteriana heteróloga para otimização dos parâmetros de atividade da enzima visando produção industrial de 4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico.

2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Imobilização da enzima FADase bacteriana heteróloga para otimização dos parâmetros de atividade da enzima visando produção industrial de 4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Imobilização enzimática

A enzima FADase heteróloga foi imobilizada utilizando os métodos de CLEAS (*cross-linked aggregates*) e m-CLEAs (*magnetic cross-linked aggregates*), de acordo com a metodologia utilizada por de Sousa e colaboradores (2020). Para a imobilização foram utilizados a enzima pura, purificada como descrito no Capítulo II, e o extrato bruto.

Os m-CLEAs foram preparados utilizando uma solução de 0,5 mg mL⁻¹ de FADase com precipitante adicionado sob baixa agitação. Antes do processo de reticulação foram adicionadas partículas magnéticas nas concentrações de 0,5 mg mL⁻¹, 0,2 mg mL⁻¹ e 0,1 mg mL⁻¹. Após 15 min da adição das partículas de magnetita, foram adicionados 80 µL de glutaraldeído (25%) e a solução colocada sob baixa agitação por 17 h a 4°C. Os agregados formados foram centrifugados por 30 min, a 5000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com tampão de fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. Os peletes foram ressuspensos e lavados em tampão de fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 e centrifugados por 10 min a 5000 rpm, 4°C, processo que foi repetido três vezes.

Os CLEAs foram preparados de forma semelhante à preparação dos m-CLEAs, com exceção da adição das partículas magnéticas. Após a adição do glutaraldeído a solução foi colocada sob baixa agitação por 17 h a 4°C. Os agregados formados foram centrifugados por 30 min, a 5000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com tampão de fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. Os peletes foram ressuspensos e lavados em tampão de fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 e centrifugados por 10 min a 5000 rpm, 4°C, três vezes.

3.2 Determinação da atividade da enzima

A atividade da FADase foi determinada através de ensaios conduzidos em triplicata, adicionando-se 50µL de solução enzimática a 450µL de uma solução composta de 300 mg L⁻¹ de ácido ferúlico em tampão fosfato de sódio 50mM de pH 5,5. A mistura reacional foi incubada a uma temperatura de 40°C por 15 minutos. A escolha da temperatura de incubação e pH do substrato foi baseada em testes realizados por Santos (2023), que estabeleceram estes como temperatura e pH ótimos para a FADase heteróloga. A atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase foi medida pela redução da concentração de AF e formação de 4VG em HPLC.

3.2 Análise dos compostos por cromatografia

O consumo de AF e a formação do 4VG foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Antes das injeções as amostras foram filtradas em filtros de Teflon de 0.22 µm. As amostras foram injetadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu Nexera XR com detector de arranjo de diodos na faixa espectral do UV/VIS, conforme descrito no Capítulo II.

3.3 Investigação da interação enzima-ligante por espectroscopia de fluorescência

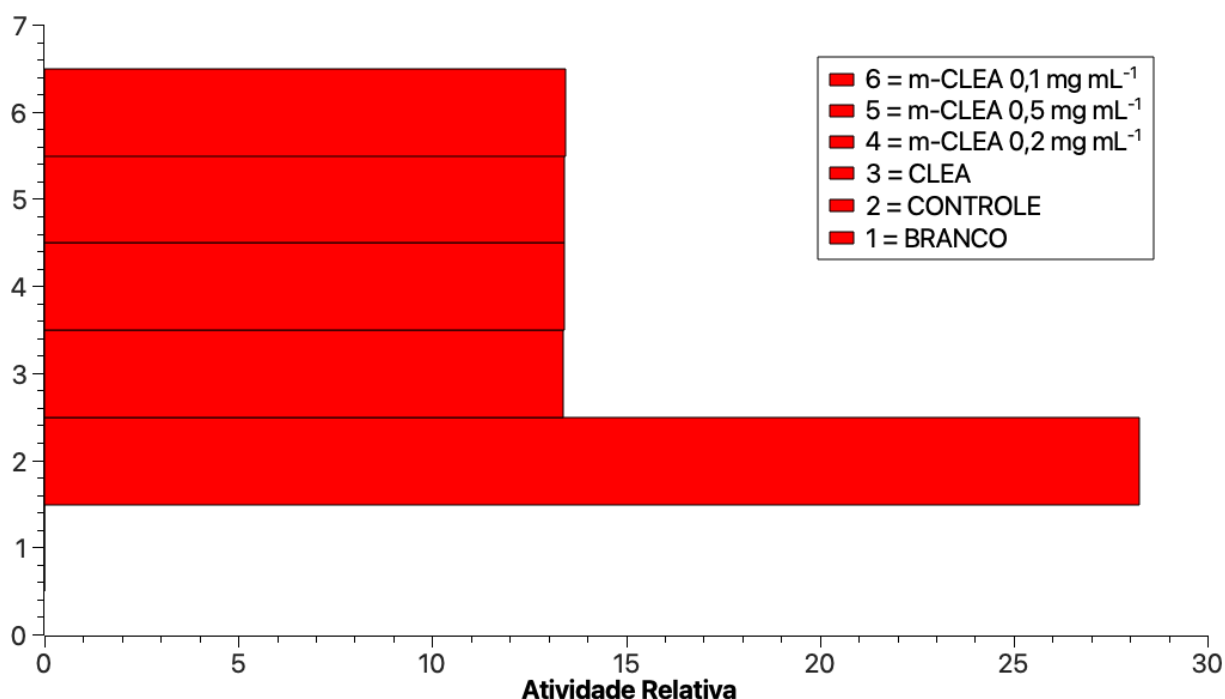
As medidas de espectroscopia de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro ISS PC1 (*Champaign, IL, USA*) equipado com banho térmico Neslab RTE-221 (*Thermo Electron Corporation, USA*). Foi utilizada uma cubeta de quartzo com caminho óptico de um centímetro. O comprimento de onda para excitação dos triptofanos foi de 295 nm e a faixa de comprimento de onda para coleta dos espectros foi de 305 nm a 500 nm.

As medidas foram realizadas nas temperaturas de 2 °C, 4 °C e 6 °C utilizando concentração de FADase heteróloga pura de 6µM em 2 mL, realizando titulações crescentes de glutaraldeído, ligante a ser analisado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos ao analisar a redução da concentração de AF e produção de quatro 4VG em CLAE após os ensaios de imobilização foi possível observar ausência da atividade da FADase em todos os testes, tanto de formação de CLEA como de m-CLEA (Figura 23).

Figura 23 – Atividade relativa da enzima FADase em diferentes tentativas de imobilização.



Fonte: Autora.

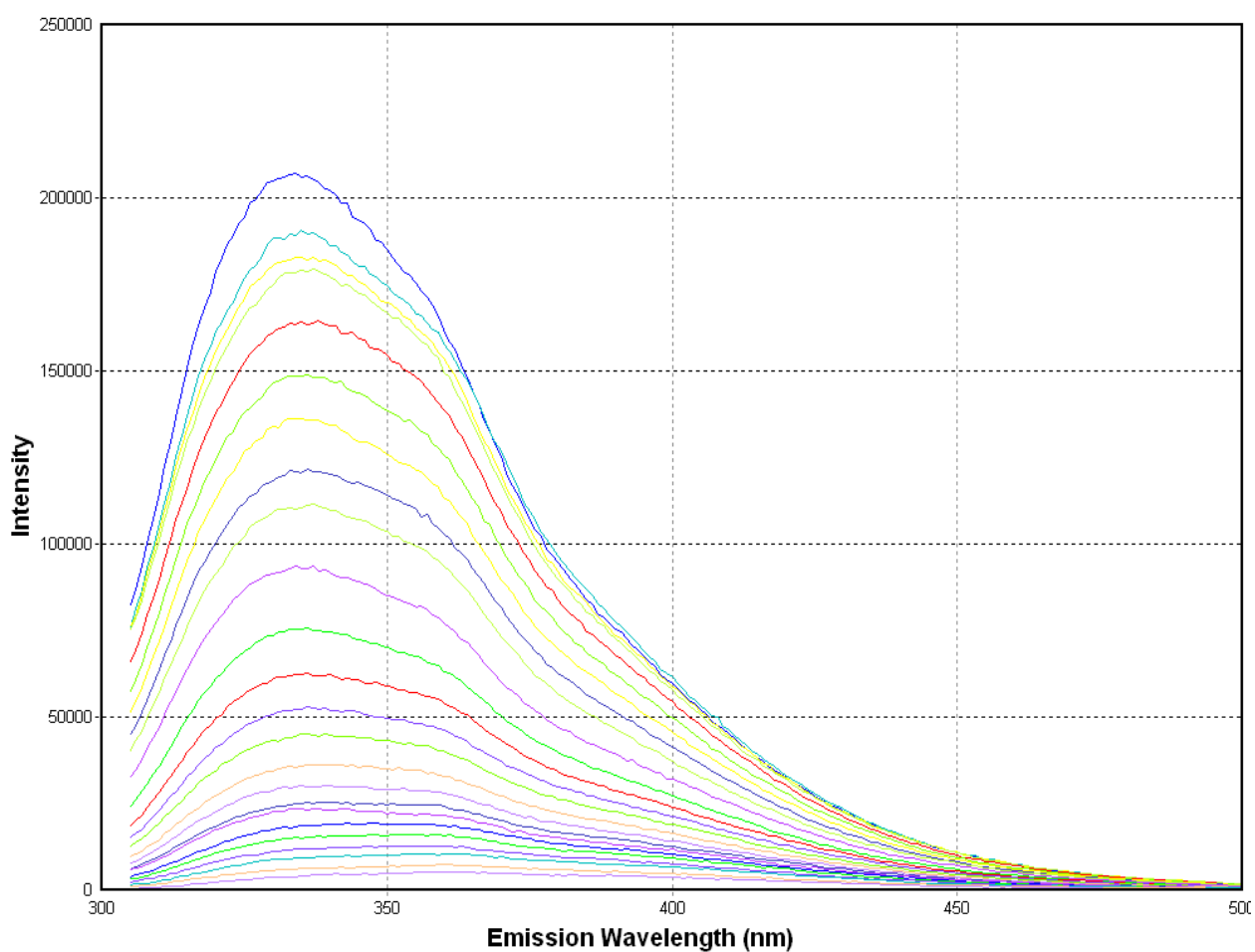
Para investigar possíveis motivos pelos quais a imobilização não foi bem sucedida em termos da formação de reticulados com atividade da enzima, a interação entre a FADase e o glutaraldeído, agente reticulante de escolha para a imobilização, foi analisada por espectroscopia de fluorescência (Figura 24). A espectroscopia de fluorescência se baseia na detecção da emissão de fótons para determinar a energia absorvida e emitida por diversas moléculas (CAVANAGH et al., 1996).

Na análise por supressão de fluorescência os resíduos de triptofano presentes na FADase heteróloga, que absorvem radiação na região ultravioleta, possibilitam monitorar as mudanças físico-químicas ocasionadas pela interação do glutaraldeído,

estando a supressão relacionada com qualquer processo de diminua a intensidade do espectro de emissão da amostra conforme adição do ligante (PEDRO, 2019; LAKOWICZ, 1983).

A partir do espectro de emissão da Figura 24 é possível inferir que há interação entre a enzima e o ligante, e que a atividade da FADase foi sendo suprimida com as consecutivas titulações crescentes de glutaraldeído (Apêndice F).

Figura 24 – Espectro de emissão de fluorescência da supressão da atividade da enzima FADase pela adição de glutaraldeído.

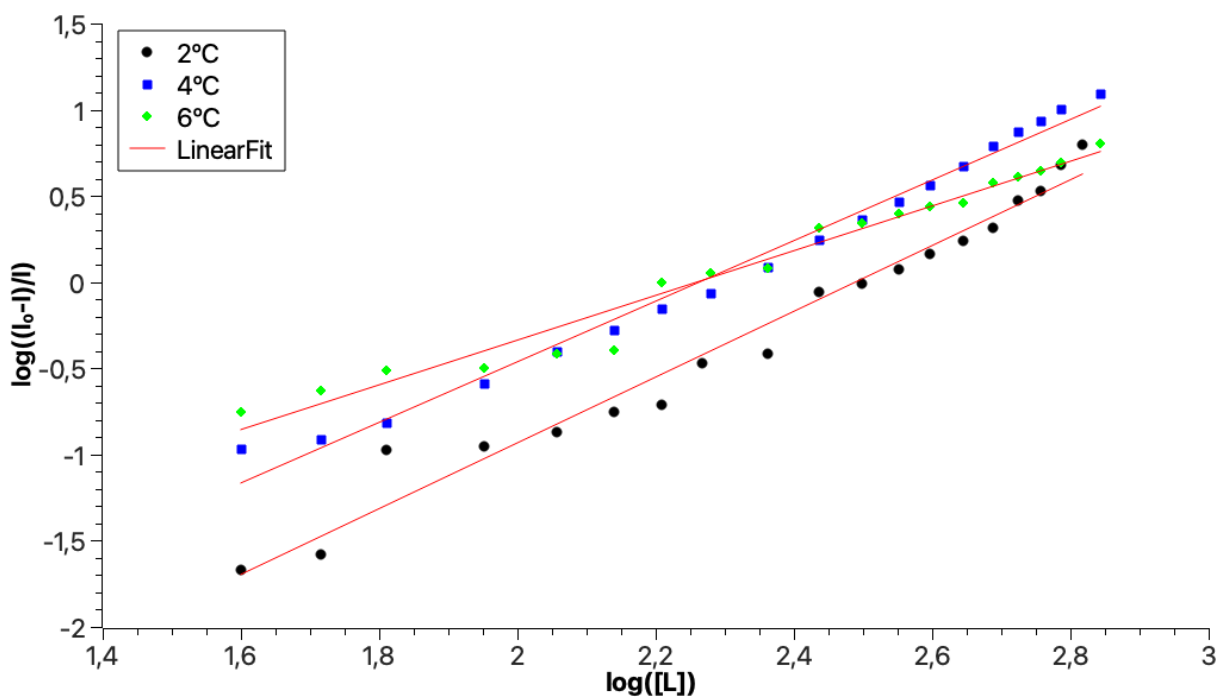


Fonte: Autora.

Com os dados obtidos do espectrofluorímetro foi possível identificar as intensidades de fluorescência. A partir dos dados da supressão de fluorescência, as constantes de associação K_a e o número de sítios de ligação (n) por enzima podem ser estimados de acordo com a equação de duplo-log (Anexo A). Essa equação

fornece uma relação logarítmica da razão da diferença entre a fração de enzima livre e ligada pela fração ligada em função da concentração de ligante (Figura 25).

Figura 25 – Gráfico de duplo-log gerado a partir dos dados obtidos da supressão de fluorescência nas temperaturas de 2°C, 4°C e 6°C.



Fonte: Autora.

Os valores de n e K_a (Tabela 2) são obtidos através da inclinação das retas do gráfico de duplo-log (Figura 25) ajustadas e das intersecções entre as ordenadas.

Tabela 2 – Número de sítios de ligação e constante de associação da interação FADase-glutaraldeído.

Temperatura	Sítios de ligação (n)	Constante de associação (K_a)
2°C	≈ 2	10^{-5}
4°C	≈ 2	10^{-4}
6°C	≈ 2	10^{-3}

Fonte: Elaborada pela autora.

Como é possível observar na Tabela 2, o número de sítios de ligação (n) é próximo a 2 em todas as temperaturas experimentais, o que pode ser explicado pela molécula ser um dímero que tem seu ponto de quebra a 57°C. Também é possível

observar os valores extremamente baixos da constante de associação (K_a), 0,00002 em 2°C, 0,00012 em 4°C e 0,0012 em 6°C, o que indica ligação instável na interação enzima-ligante.

A partir dos valores de K_a é possível afirmar que o glutaraldeído não é um ligante adequado para a enzima FADase. A instabilidade da ligação ainda pode sugerir competição entre o ligante e o substrato (AF), o que pode explicar o cessar da atividade enzimática de consumo de AF e produção de 4VG da enzima FADase na presença de glutaraldeído.

5 CONCLUSÃO

Nenhuma das tentativas de imobilizar a FADase heteróloga foi efetiva. Em todos os testes não se observou atividade enzimática nos reticulados. Ao investigar os possíveis motivos pelos quais a imobilização não foi bem sucedida, a interação entre a FADase e o glutaraldeído, agente reticulante de escolha para a imobilização, foi analisada por espectroscopia de fluorescência, a partir da qual foi possível concluir que a constante de associação (K_a) entre a FADase e o reticulante é muito baixa para que a ligação seja estável.

REFERÊNCIAS

BETTIO, G., 2020. **Avaliação da bioconversão de ácido ferúlico em aromas vaniloides por leveduras isoladas da biodiversidade latino-americana**. Tese Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CAVANAGH, J.; FAIRBROTHER, W. J.; PALMER III, A. G.; SKELTON, N. J., 1996. **Protein NMR spectroscopy: principles and practice**. Academic press.

CUI, J.; ZHAO, Y.; FENG, Y.; LIN, T.; ZHONG, C.; TAN, Z.; JIA, S., 2017. Encapsulation of spherical cross-linked phenylalanine ammonia lyase aggregates in mesoporous biosilica. **Journal of agricultural and food chemistry**, 65(3), pp.618-625.

DETERING, T.; MUNDRY, K.; BERGER, R. G., 2020. Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants. **PloS one**, 15(12), p.e0244290.

FURLANI, I. L.; AMARAL, B. S.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B., 2020. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, 43(4), pp.463-473.

GU, W.; YANG, J.; LOU, Z.; LIANG, L.; SUN, Y.; HUANG, J.; YI, X. L.; ZHAOHUI, C. M.; ZHANG, K. Q., 2011. Structural basis of enzymatic activity for the ferulic acid decarboxylase (FADase) from *Enterobacter sp.* Px6-4. **PloS one**, 6(1), e16262.

GU, W.; LI, X.; HUANG, J.; DUAN, Y.; MENG, Z.; ZHANG, K. Q.; YANG, J., 2011. Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the *Enterobacter sp.* Px6-4 gene for ferulic acid decarboxylase. **Applied microbiology and biotechnology**, 89(6), pp.1797-1805.

LACKEWICZ, J. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 1983.

LI, L.; LONG, L.; DING, S., 2019. Bioproduction of high-concentration 4-vinylguaiacol using whole-cell catalysis harboring an organic solvent-tolerant phenolic acid decarboxylase from *Bacillus atrophaeus*. **Frontiers in microbiology**, 10, p.1798.

LUO, Y.; WANG, C. Z.; SAWADOGO, R.; YUAN, J.; ZENG, J.; XU, M.; TAN, T.; YUAN, C.S., 2021. 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**.

PEDRO, R. P., 2019. **Caracterização biofísica da interação entre o domínio SH3 C-Terminal da Grb2 com cumarina**. Dissertação de Mestrado em Biofísica Molecular – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto.

SHELDON, R. A., 2011. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied microbiology and biotechnology**, 92(3), pp.467-477.

SHELDON, R. A.; SORGEDRAGER, M. J.; KONDOR, B., 2016. Clea Technologies BV. **Non-leachable magnetic cross-linked enzyme aggregate**. U.S. Patent 9,353,367.

SOUZA, L. T.; VERÍSSIMO, L. A.; PESSELA, B. C.; SANTORO, R. R.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A., 2017. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biociência Aplicada à Agro&Indústria**, 4, pp.529-568

SUN, L. H.; LV, S. W.; YU, F.; LI, S. N.; HE, L. Y., 2018. Biosynthesis of 4-vinylguaiacol from crude ferulic acid by *Bacillus licheniformis* DLF-17056. **Journal of biotechnology**, 281, pp.144-149.

TAŃSKA, M.; MIKOŁAJCZAK, N.; KONOPKA, I., 2018. 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**, 240, pp.679-685.

TURAL, B.; ŞİMŞEK, İ.; TURAL, S.; ÇELEBI, B.; DEMIR, A. S., 2013. Carbonylation reactivity of benzaldehyde lyase (BAL, EC 4.1. 2.38) covalently attached to magnetic nanoparticles. **Tetrahedron: Asymmetry**, 24(5-6), 260-268.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos estudos realizados no presente trabalho foi possível obter informações sobre as características bioquímicas e biofísicas da enzima FADase bacteriana heteróloga, produzida a partir do gene de uma bactéria *K. pneumoniae* expresso em *E. coli*, e estabelecer alguns parâmetros para sua aplicação na produção de 4VG a partir de AF.

Dentre os resultados observados, temos que é possível utilizar o extrato bruto de expressão da FADase para produção de 4VG, uma forma economicamente mais viável considerando a produção em larga escala pelo menor custo de produção. Também foi estabelecida a tolerância da enzima apenas na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 e perda de atividade em temperaturas superiores a 50°C, com *melting point* em 60°C.

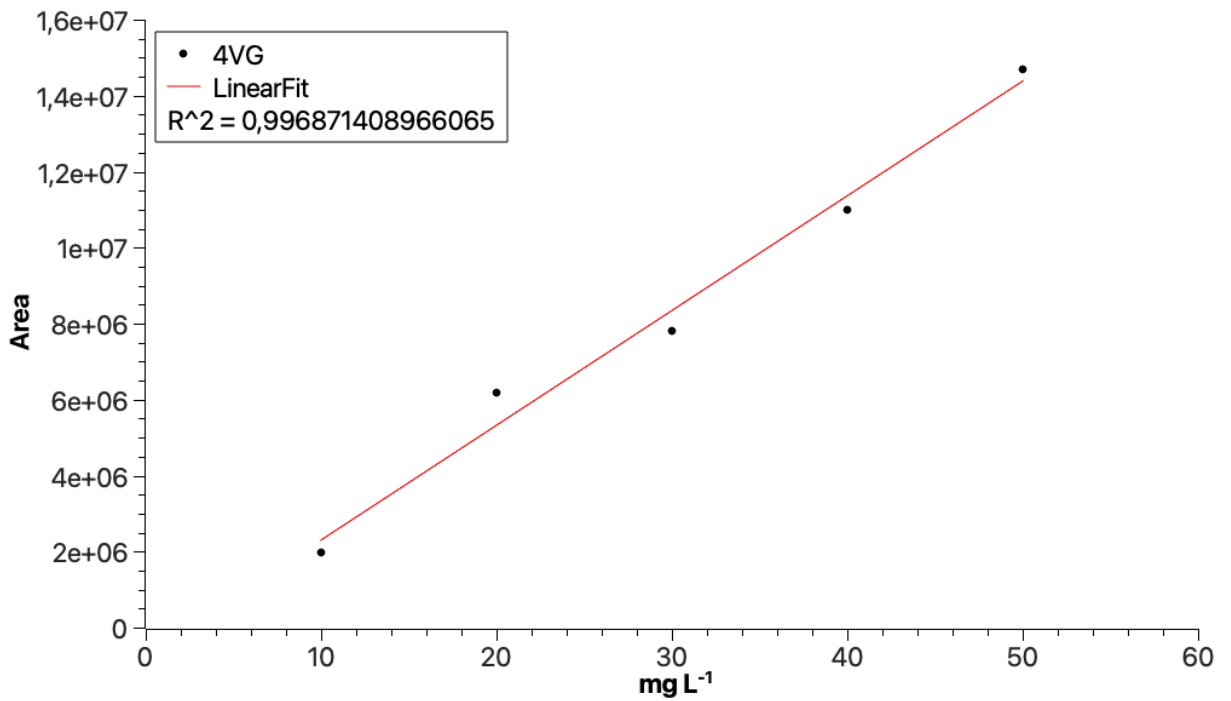
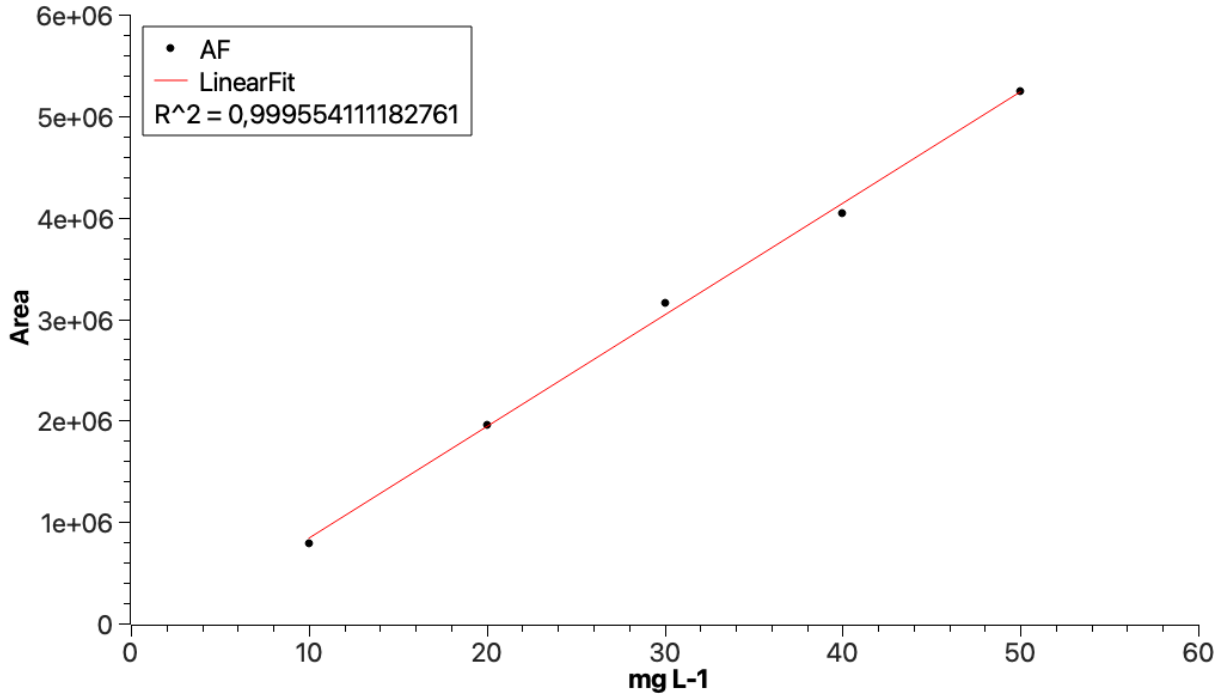
A enzima apresentou atividade em substratos análogos de AF, o que motiva mais estudos a respeito do seu emprego na produção de 4-vinil derivados, e demonstrou bons resultados com o uso dos precipitantes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e PEG.

Quanto à imobilização da enzima, apesar dos modelos gerados *in silico* sugerirem estrutura favorável a utilização de glutaraldeído como agente reticulante devido a grande quantidade de resíduos de lisina, nos estudos *in vitro* a atividade enzimática cessou em todos os testes de imobilização.

A constante de associação (K_a) entre a enzima e o glutaraldeído é extremamente baixa, o que indica ligação instável. A instabilidade da ligação ainda pode sugerir competição entre o ligante e o substrato (AF), o que pode explicar o cessar da atividade enzimática de consumo de AF e produção de 4VG da enzima FADase na presença de glutaraldeído.

Os resultados obtidos elucidam características estruturais e funcionais da enzima e preconizam futuros estudos acerca de estratégias para aplicação da FADase bacteriana heteróloga na produção de 4VG.

APÊNDICE A – Curvas dos padrões de AF e 4VG feitas a partir da quantificação por CLAE e utilizadas para quantificação dos compostos nas amostras



APÊNDICE B – Tabela com dados de capacidade de conversão de FADase heteróloga purificada e em extrato bruto obtidos por CLAE

	EXTRATO BRUTO			
	MÉDIA* ÁREA PICOS AF	MÉDIA* ÁREA PICOS 4VG	AF (mg L⁻¹)	4VG (mg L⁻¹)
0	8790674	28204	348	3
2 min	6576841	1431319	258	31
5 min	5767877	2031233	225	43
10 min	4453879	2793436	171	58
15 min	3742522	3349197	142	69
20 min	3060957	3798512	115	78
	ENZIMA PURA			
	MÉDIA* ÁREA PICOS AF	MÉDIA* ÁREA PICOS 4VG	AF (mg L⁻¹)	4VG (mg L⁻¹)
0	8539763	2303	337	3
2 min	5498035	2171854	214	46
5 min	4225586	2998220	162	62
10 min	2505456	4063054	92	83
15 min	1681796	4493240	59	92
20 min	1246636	4846408	41	99

*Todas as medidas foram feitas em triplicata, a média diz respeito a média entre as triplicatas das amostras.

APÊNDICE C – Tabela com dados de estabilidade de FADase heteróloga incubada por 60min à diferentes temperaturas obtidos por CLAE

	MÉDIA* ÁREA PICOS AF	MÉDIA* ÁREA PICOS 4VG	AF (mg L⁻¹)	4VG (mg L⁻¹)
4°C	1587988	1624991	159	44
35°C	2079639	1713645	167	48
40°C	1712844	1779363	161	45
45°C	1355155	1494232	182	41
50°C	1695946	1681809	163	44
55°C	196228	328642	282	18

*Todas as medidas foram feitas em triplicata, a média diz respeito a média entre as triplicatas das amostras.

APÊNDICE D – Tabela com dados de tolerância de FADase heteróloga à alteração de pH do substrato de obtidos por CLAE

	MÉDIA* ÁREA PICOS AF	MÉDIA* ÁREA PICOS 4VG	AF (mg L⁻¹)	4VG (mg L⁻¹)
pH 4,5	4777140	7975	252	13
pH 5,0	3803727	1659800	203	44
pH 5,5	2911019	1662155	161	45
pH 6,0	1559854	876736	191	29
pH 6,5	5070656	2303	267	13

*Todas as medidas foram feitas em triplicata, a média diz respeito a média entre as triplicatas das amostras.

APÊNDICE E – Tabela com dados do teste de precipitantes

	EXTRATO BRUTO			
	MÉDIA* ÁREA PICOS AF	MÉDIA* ÁREA PICOS 4VG	AF (mg L⁻¹)	4VG (mg L⁻¹)
CONTROLE	8475277	17205	335	3
(NH₄)₂SO₄ 50%	219000	5301431	0	107
(NH₄)₂SO₄ 66%	119525	5942066	0	120
(NH₄)₂SO₄ 75%	53227	5079158	0	103
PEG 50%	7851078	431287	309	12
PEG 66%	7760051	452277	306	12
PEG 75%	8201598	176763	324	7
	ENZIMA PURA			
	MÉDIA* ÁREA PICOS AF	MÉDIA* ÁREA PICOS 4VG	AF (mg L⁻¹)	4VG (mg L⁻¹)
CONTROLE	3242973	4543259	122	93
(NH₄)₂SO₄ 50%	412633	4951154	7	101
(NH₄)₂SO₄ 66%	4226445	2646362	162	55
(NH₄)₂SO₄ 75%	4587245	2440315	177	51
PEG 50%	2507011	3779443	92	78
PEG 66%	8500806	28204	336	4
PEG 75%	8421477	19721	333	4

*Todas as medidas foram feitas em triplicata, a média diz respeito a média entre as triplicatas das amostras.

APÊNDICE F – Tabela com as titulações de glutaraldeído (GL.) feitas na análise da interação enzima-ligante por espectroscopia de fluorescência nas temperaturas de 2°C, 4°C e 6°C.

	TITULAÇÕES GLUTARALDEÍDO	GLUTARALDEÍDO TOTAL EM µL	CONCENTRAÇÃO TOTAL GLUTARALDEÍDO
1	15 µL	15 µL	39,75 mM
2	5 µL	20 µL	51,96 mM
3	5 µL	25 µL	64,63 mM
4	10 µL	35 µL	89,61 mM
5	10 µL	45 µL	114,11 mM
6	10 µL	55 µL	138,15 mM
7	10 µL	65 µL	161,72 mM
8	10 µL	75 µL	189,88 mM
9	20 µL	95 µL	229,91 mM
10	20 µL	115 µL	273,32 mM
11	20 µL	135 µL	315,20 mM
12	20 µL	155 µL	355,63 mM
13	20 µL	175 µL	394,68 mM
14	25 µL	200 µL	441,62 mM
15	25 µL	225 µL	486,73 mM
16	25 µL	250 µL	530,00 mM
17	25 µL	275 µL	571,57 mM
18	25 µL	300 µL	611,54 mM
19	30 µL	330 µL	697,52 mM

APÊNDICE G – Tabela com dados de intensidades obtidas por análise de supressão por espectroscopia de fluorescência.

	INTENSIDADE (I) – Média das triplicatas de cada titulação		
	2°C	4°C	6°C
1	1,961e+05	1,858e+05	2,356e+05
2	1,952e+05	1,833e+05	2,247e+05
3	1,811e+05	1,785e+05	2,123e+05
4	1,803e+05	1,635e+05	2,103e+05
5	1,764e+05	1,473e+05	2,004e+05
6	1,701e+05	1,347e+05	1,976e+05
7	1,677e+05	1,208e+05	1,394e+05
8	1,499e+05	1,105e+05	1,306e+05
9	1,449e+05	9,226e+04	1,258e+05
10	1,068e+05	7,476e+04	9,048e+04
11	1,011e+05	6,208e+04	8,651e+04
12	9,134e+04	5,238e+04	7,952e+04
13	8,150e+04	4,444e+04	7,444e+04
14	7,339e+04	3,611e+04	7,143e+04
15	6,559e+04	2,889e+04	5,845e+04
16	5,031e+04	2,429e+04	5,452e+04
17	4,567e+04	2,143e+04	5,095e+04
18	3,445e+04	1,853e+04	4,663e+04
19	2,740e+04	1,533e+04	3,754e+04

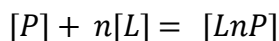
ANEXO A - Supressão de fluorescência

De acordo com *Principles of Fluorescence Spectroscopy* de Joseph R. Lakowicz, a supressão de fluorescência pode ser definida pela equação de Stern-Volmer:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q t_0 [Q]$$

Na equação, I_0 é a intensidade de fluorescência no estado estacionário na ausência de supressor [Q] e I são as intensidades de fluorescência na presença de supressor. K_q é a constante de supressão, t_0 é o tempo de vida do fluoróforo (triptofano) na ausência de supressor (glutaraldeído, neste caso) e K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, que será o coeficiente angular da razão I_0/I que apresenta um comportamento linear com a concentração do supressor.

O equilíbrio da reação é dado pela equação:



Na equação de equilíbrio [P] é a concentração da enzima FADase, n o número de sítios de ligação, [L] a concentração de ligante (glutaraldeído) e $[LnP]$ é o complexo enzima-ligante.

Através da equação de equilíbrio é possível obter a constante de associação K_a , que pode ser calculada por:

$$K_a = \frac{[LnP]}{n[L][P]}$$