



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
IMUNOLOGIA**

Renato Ramos Godoi

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA CUTINASE-LIKE DE *Cryptococcus flavus*
EXPRESSA EM *Komagataella phaffii* PARA DEGRADAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Belo Horizonte

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
IMUNOLOGIA**

Renato Ramos Godoi

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA CUTINASE-LIKE DE *Cryptococcus flavus*
EXPRESSA EM *Komagataella phaffii* PARA DEGRADAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem

Coorientador: Prof. Dr. Alexsandro Sobreira
Galdino (UFSJ)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Belo Horizonte

2022

- 043 Godoi, Renato Ramos.
Caracterização bioquímica da cutinase-like de *Cryptococcus flavus* expressa em *Komagataella phaffii* para degradação de biopolímeros e aplicações biotecnológicas [manuscrito] / Renato Ramos Godoi. – 2022.
165 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem. Coorientador: Prof. Dr. Alexsandro Sobreira Galdino.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. Biopolímeros. 3. *Cryptococcus*. 4. Enzimas. 5. Hidrolases. 6. *Pichia*. I. Nagem, Ronaldo Alves Pinto. II. Galdino, Alexsandro Sobreira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE RENATO RAMOS GODOI. Aos três dias do mês de outubro de 2022 às 13:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Caracterização bioquímica da cutinase de *Cryptococcus flavus* expressa em *Komagataella phaffii* para degradação de biopolímeros”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. João Ricardo Moreira de Almeida (EMBRAPA), aprovado; Dr. Mateus Gomes de Godoy (Universidade Federal de Rio de Janeiro), aprovado; Dr. Lucas Bleicher (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Erich Birelli Tahara (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Alexsandro Sobreira Galdino - Coorientador (Universidade Federal de São João Del-Rei), aprovado; Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

(x) APROVADO
 () REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 03 de outubro de 2022.



Documento assinado digitalmente
 JOAO RICARDO MOREIRA DE ALMEIDA
 Data: 04/10/2022 08:55:03-0300
 Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. João Ricardo Moreira de Almeida (EMBRAPA)



Documento assinado digitalmente
 MATEUS GOMES DE GODOY
 Data: 03/10/2022 18:15:16-0300
 Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. Mateus Gomes de Godoy (UFRJ)



Documento assinado digitalmente
 LUCAS BLEICHER
 Data: 04/10/2022 10:11:13-0300
 Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. Lucas Bleicher (UFMG)



Documento assinado digitalmente
 ERICH BIRELLI TAHARA
 Data: 04/10/2022 09:59:50-0300
 Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. Erich Birelli Tahara (UFMG)



Documento assinado digitalmente
 ALEXSANDRO SOBREIRA GALDINO
 Data: 04/10/2022 09:21:09-0300
 Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. Alexsandro Sobreira Galdino - Coorientador (UFSJ)



Documento assinado digitalmente
 RONALDO ALVES PINTO NAGEM
 Data: 03/10/2022 17:56:59-0300
 Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Orientador (UFMG)

Dedico:

com muito amor e gratidão

aos meus pais: Angela e Jorge

e avós: Maria Cecília, Joaquim e Sergia (*in memoriam*),

que me educaram, incentivaram e sustentaram cada passo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e Jesus Cristo que com infinita bondade e misericórdia me conduziram e permitiram viver este momento.

Agradeço a meus pais e avós pelo apoio, educação, carinho e pelo exemplo de perseverança e humildade.

Agradeço especialmente à Janini, minha noiva e companheira de jornada, por todo amor, carinho, compreensão, paciência e companheirismo dedicado durante todo esse tempo que estamos juntos.

Agradeço a minha irmã Vanessa e aos amigos mais próximos: Douglas, Adriel, Letícia, Ana Amélia, Bruna, Shaenny e Sara por me apoiarem, mesmo à distância e por estarem sempre à disposição para ouvirem e aconselharem.

Agradeço a todos os amigos feitos durante o tempo em que morei em Belo Horizonte, pelo apoio, companheirismo e suporte. Com destaque especial para: Arthur, Ludmila, Marina Camila, Alan e Gabriel.

Agradeço à UFMG pela estrutura e pelas oportunidades que me proporcionaram aprendizado e maturidade.

Agradeço a CAPES e ao CNPq pela bolsa de doutorado que me proporcionou as condições para me estabelecer em Belo Horizonte, além do suporte no desenvolvimento da pesquisa.

A todos os mestres que me instruíram e auxiliaram no meu crescimento acadêmico.

Agradeço em especial aos meus orientadores: o Professor Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem, Dr. Alexsandro Sobreira Galdino que confiaram em mim e abriram as portas de seus laboratórios para esta pesquisa.

Agradeço a Professora Dr.^a Marina Quádrio Raposo Branco Rodrigues, o Professor Dr. Daniel Bonoto Gonçalves e o Professor Dr. Tiago Antônio da Silva Brandão pelas importantes contribuições neste trabalho.

Agradeço aos companheiros de bancada e a todos que de alguma forma auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa: Arthur, Ludmila, Gondia, Aline, Karim, Fernandes, Mariana, Lorena, Marina, Brisa, Débora e Tarcísio.

Ao técnico Jamil Silvano de Oliveira pela dedicação e eficiência com que trabalha, pelos valiosos conhecimentos passados e pela amizade.

“Sempre antes de realizar um sonho, a Alma do Mundo resolve testar tudo aquilo que foi aprendido durante a caminhada. Ela faz isto não porque seja má, mas para que possamos, junto com o nosso sonho, conquistar também as lições que aprendemos seguindo em direção a ele.

...

Uma busca começa sempre com a Sorte de Principiante. E termina sempre com a Prova do Conquistador.”

O Alquimista – Paulo Coelho

RESUMO

Mais de 350 milhões de toneladas de plástico são produzidos anualmente no mundo, dos quais 76% são descartados de forma incorreta. Os biopolímeros são uma alternativa a este problema ambiental. No entanto, são necessárias décadas para completa degradação dos biopolímeros em condições ambiente. Neste contexto, as cutinases são capazes de catalisar a hidrólise de ésteres de poliésteres, possuindo várias aplicações biotecnológicas, dentre elas, a hidrólise de biopolímeros como PBS, PLA, PLC e outros. A cutinase extracelular de *Cryptococcus flavus* I-11 (CfCLE) apresenta propriedades catalíticas importantes como resistência a solventes orgânicos e surfactantes, que podem viabilizar a aplicação biotecnológica desta enzima no processamento de biopolímeros. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar bioquimicamente a enzima CfCLE, produzida em sistema de expressão heterólogo de *Komagataella phaffii*, clonado sob o controle do promotor AOX1, a fim de aplicar biotecnologicamente a referida enzima. *K. phaffii* recombinantes foram geradas e triadas baseados na atividade enzimática e quantidade de proteínas, com intuito de selecionar o melhor transformante. Foram obtidas preparações enzimáticas com alto teor de pureza e atividade específica, por meio de processos escalonáveis de fermentação e de purificação. Os resultados de caracterização bioquímica da CfCLE recombinante (CfCLER) demonstram que a proteína apresenta temperatura de atuação da enzima de 30°C e termo estabilidade até 50°C por 4 horas, pH de 8,5 e atividade na faixa de pH 6-11, resistência a vários solventes orgânicos como metanol e etanol, resistência a surfactantes como Triton e Tweens, aumento da atividade na presença de íons divalentes, maior especificidade para ésteres de 8 carbonos e triglicerídeos de 4 carbonos. Foi demonstrado neste trabalho que as preparações enzimáticas de CfCLER purificada são capazes de catalisar a hidrólise de filmes PETs e de 84% de policaprolactona (PLC), 52% de ácido polilático (PLA) e 32% de polihidróxidobutirato (PHB), o que abre uma perspectiva para aplicação industrial na melhoria da degradação dos biopolímeros.

Palavras chaves: Cutinase, *Cryptococcus flavus*, *Komagataella phaffii*, Biopolímeros

ABSTRACT

More than 350 million tons of plastic are produced annually in the world, of which 76% are disposed of incorrectly. Biopolymers are an alternative to this environmental problem. However, decades are required for complete degradation of biopolymers under ambient conditions. In this context, cutinases are able to catalyze the hydrolysis of polyester esters, having several biotechnological applications, among them, the hydrolysis of biopolymers such as PBS, PLA, PLC and others. The extracellular cutinase of *Cryptococcus flavus* I-11 (CfCLE) has important catalytic properties such as resistance to organic solvents and surfactants, which may enable the biotechnological application of this enzyme in the processing of biopolymers. The objective of the present work was to biochemically characterize the CfCLE enzyme, produced in a heterologous expression system of *Komagataella phaffii*, cloned under the control of the AOX1 promoter, in order to biotechnologically apply this enzyme. *K. phaffii* recombinants were generated and screened based on enzymatic activity and amount of proteins, in order to select the best transformant. Enzyme preparations with high purity and specific activity were obtained through scalable fermentation and purification processes. The results of biochemical characterization of recombinant CfCLE (CfCLER) demonstrate that the protein has an optimal temperature of 30°C and thermo stability up to 50°C for 4 hours, an optimal pH of 8.5 and activity in the pH range 6-11, resistance to various organic solvents such as methanol and ethanol, resistance to surfactants such as Triton and Tweens, increased activity in the presence of divalent ions, greater specificity for 8-carbon esters and 4-carbon triglycerides. It was demonstrated in this work that the enzymatic preparations of purified CfCLER are able to catalyze the hydrolysis of PET films and 84% polycaprolactone (PLC), 52% polylactic acid (PLA) and 32% polyhydroxybutyrate (PHB), which opens a perspective for industrial application in improving the degradation of biopolymers.

Keywords: Cutinase, *Cryptococcus flavus*, *Komagataella phaffii*, Biopolymers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de biopolímeros	17
Figura 2. Mecanismo de ação das cutinases	34
Figura 3. Estruturas comparativas de lipases, cutinases e PETase	38
Figura 4. Alinhamento das sequências de aminoácidos de cutinase-like de <i>C. flavus</i> e cutinase-like de <i>Cryptococcus sp s-2</i>	69
Figura 5. Resultado gráfico da predição de estrutura secundária	70
Figura 6. Modelagem Molecular.....	73
Figura 7. Hidrofobicidade superficial	73
Figura 8. Mapa do plasmídeo sintético pPicZαB-CfCLE.....	74
Figura 9. Esquema gráfico da otimização de códons para <i>K. phaffii</i>	76
Figura 10. Produto da otimização de genes para <i>K. phaffii</i> e respectiva tradução	75
Figura 11. Gel dos produtos de PCR de colônia utilizando diferentes pares de primer	77
Figura 12. Alinhamento dos produtos de sequenciamento com plasmídeo pPICZαB-CfCLE.....	77
Figura 13. Gel do produto da linearização com SacI.....	77
Figura 14. Gel do produto de PCR de DNA genômico utilizando como <i>template</i> o DNA genômico dos recombinantes de <i>K. phaffii</i>	79
Figura 16. Atividade enzimática ($\mu\text{mol pNP} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) sobre o substrato pNPB dos sobrenadantes de 24-120 horas de cultura dos recombinantes <i>K. phaffii</i> para o gene da CfCLer e cepa controle negativo.....	82
Figura 17. Dosagem de proteínas totais ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) dos sobrenadantes de 24-120 horas de cultura dos recombinantes <i>K. phaffii</i> para o gene da CfCLer e cepa controle negativo	82
Figura 15. Gel SDS-PAGE 15% corado com prata dos recombinantes cultivados em placas de deep-wells	81
Figura 18. Gráficos de atividade, proteínas totais e crescimento dos recombinantes selecionados ..	84
Figura 19. Resultados da purificação por afinidade.....	86
Figura 20. <i>Western blot</i>	86
Figura 21. Resultado da purificação por troca catiônica.....	88
Figura 22. Produção piloto em biorreator	91
Figura 23. Resultado da purificação por troca catiônica do sobrenadante de cultura.....	95
Figura 24. Produção melhorada em biorreator.....	99
Figura 25. Resultado da purificação por troca catiônica do sobrenadante de cultura.....	102
Figura 26. Espectrometria de massa total	105
Figura 27. Esquema de sequenciamento das proteínas	107
Figura 28. Esquema de identificação de N-Glicosilação	103
Figura 29. Esquema de identificação de O-Glicosilação	104
Figura 30. Gráfico de temperatura ótima da atividade enzimática	109
Figura 31. Gráfico da atividade residual frente diferentes temperaturas ao longo do tempo	110
Figura 32. Gráfico de pH ótima da atividade enzimática	114
Figura 33. Gráfico da atividade residual frente diferentes pHs ao longo do tempo	116
Figura 34. Avaliação da degradação de cutina	126
Figura 35. Gráfico de atividade relativa.....	127
Figura 36. Atividade relativa sobre triglicerídeos.....	130
Figura 37. Representação gráfica da hidrólise de biopolímeros	134
Figura 38. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) de filme PET	138
Figura 39. Atividade residual da cutinase na presença de detergentes	141
Figura 40. Cromatograma amostras vs biodiesel	142
Figura Suplementar 1. Gráfico da análise do peptídeo sinal gerado pela ferramenta Signal IP	160
Figura Suplementar 2. Gráficos de atividade, proteínas totais e crescimento dos recombinantes da segunda etapa de seleção.....	161

Figura Suplementar 3. Gráficos de atividade, proteínas totais e crescimento dos recombinantes da segunda etapa de seleção.....	162
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cinéticos das cutinases disponíveis na literatura	35
Tabela 2. Etapa das reações de PCR	48
Tabela 3. Primers e localização de anelamento no vetor pPICZ α B-CfCLE	48
Tabela 4. Quantificação do produto de Maxiprep em Nanodrop [®]	78
Tabela 5. Diferentes estratégias de transformação de <i>K. phaffii</i>	78
Tabela 6. Tabela de rendimento do processo de purificação	88
Tabela 7. Linhas de alimentação e valores de fluxo por fase do bioprocesso piloto.	92
Tabela 8. Taxas de produção e purificação de cutinases recombinantes produzidas em sistema heterólogo.....	93
Tabela 9. Variáveis observadas na fase de indução do processo piloto.....	94
Tabela 10. Parâmetros de controle da cascata de dO ₂ do biorreator.	98
Tabela 11. Dados de crescimento celular e produção obtidos por etapa no bioprocesso melhorado	98
Tabela 12. Atividade enzimática de proteína purificada ao longo do tempo armazenada em temperatura ambiente	108
Tabela 13. Temperatura ótima, termoestabilidade, pH ótimo e faixa de pH das cutinases descritas na literatura	111
Tabela 15. Atividade de CfCLer na presença de solventes orgânicos	117
Tabela 16. Atividade residual na presença de Solventes orgânicos, Surfactantes e Íons metálicos das cutinases descritas na literatura.....	118
Tabela 18. Atividade residual frente surfactantes	122
Tabela 20. Atividade enzimática na presença de íons metálicos	125
Tabela 21. Especificidade das cutinases descritas na literatura	128
Tabela 22. Especificidade de triglicerídeos das cutinases relatadas na literatura	130
Tabela 23. Parâmetros cinéticos de CfCLE	131
Tabela 24. Parâmetros cinéticos das cutinases descritos na literatura	132

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1	PLÁSTICOS, POLÍMEROS E SEUS DESAFIOS	14
1.2	BIOPLÁSTICOS E BIOPOLÍMEROS, UMA SOLUÇÃO?	17
1.2.1	Principais Biopolímeros	20
1.3	DEGRADAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS	22
1.3.1	Enzimas degradadoras de biopolímeros	27
1.4	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CUTINASES	31
1.5	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE CUTINASES	32
1.6	CUTINASE-LIKE DE <i>CRYPTOCOCCUS FLAVUS</i> I-11	38
1.7	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EM <i>Komagataella phaffii</i>	40
2	JUSTIFICATIVA	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	METODOLOGIA	45
4.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQUÊNCIA PROTEICA DA CfCLE I-11	45
4.2	PRODUÇÃO DE CFCLE RECOMBINANTE EM <i>K. phaffii</i>	46
4.2.1	Microrganismos e meios de cultura	46
4.2.2	Construção do vetor pPICZaB-CfCLE	47
4.2.3	Transformação de <i>K. phaffii</i> e seleção de transformantes para expressão da CfCLer	48
4.2.4	Ensaio de atividade hidrolítica sobre o substrato pNPB	51
4.2.5	Quantificação de proteínas totais	52
4.2.6	Seleção de recombinantes por expressão de CfCLer em escala de bancada utilizando <i>shaker</i>	52
4.2.7	Produção e purificação de CfCLer em escala de bancada (400 mL) utilizando <i>shaker</i>	53
4.2.8	Produção de CfCLer em Biorreator	53
4.2.9	Purificações	55
4.2.10	<i>Western Blot</i>	57
4.3	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	57
4.3.1	Espectrometria de massa	57
4.3.2	Avaliação de glicosilações	59
4.3.3	Atividade residual de armazenamento	59
4.3.4	Determinação da temperatura de atuação da enzima	59
4.3.5	Determinação da termoestabilidade	60
4.3.6	Determinação do pH de atuação da enzima	60
4.3.7	Determinação da atividade residual em diferentes pHs	60
4.3.8	Atividade residual na presença de Solventes Orgânicos	61
4.3.9	Atividade residual na presença de Surfactantes	61
4.3.10	Atividade residual na presença de íons metálicos	62
4.3.11	Avaliação da degradação de cutina	62
4.3.12	Especificidade de Substratos	63
4.4	ESTUDOS DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	63
4.5	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	64
4.5.1	Hidrólise de PLA, PCL e PHB	64
4.5.2	Hidrólise de filme PET	65
4.5.3	Atividade residual em detergentes de lavar roupa	66
4.5.4	Produção de Biodiesel	66
4.6	PROCESSAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	67

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
5.1	ANÁLISE <i>in silico</i> DA SEQUÊNCIA PROTEICA DE CfCLE I-11	68
5.1.1	Comparação da CfCLE I-11 com cutinases e lipases conhecidas	69
5.1.2	Predição da estrutura secundária de CfCLE I-11.....	69
5.1.3	Modelagem molecular da estrutura da CfCLE I-11	70
5.2	CONSTRUÇÃO DO VETOR PPICZAB-CfCLE PARA EXPRESSÃO DE CfCLER EM <i>K. phaffii</i>	74
5.3	TRANSFORMAÇÃO, REPLICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO EM <i>E. coli</i>	75
5.4	TRANSFORMAÇÃO DE <i>K. phaffii</i> E SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES PARA EXPRESSÃO DE CfCLER.....	78
5.4.1	Propagação de recombinantes por plaqueamento em concentrações crescentes de antibiótico e predição de fenótipo de crescimento em metanol	79
5.4.2	Seleção de <i>K. phaffii</i> recombinante com expressão e secreção de CfCLER funcional..	80
5.5	PURIFICAÇÃO.....	85
5.5.1	Purificação por afinidade a coluna de níquel	85
5.5.2	Purificação por troca catiônica	86
5.6	PRODUÇÃO DE CfCLER EM BIOREATOR	89
5.6.1	Produção em pequena escala em condições controladas: Estratégia I.....	89
5.6.2	Purificação do sobrenadante do Estratégia I.....	94
5.6.3	Estratégia de produção em biorreator com monitoramento do metanol em tempo real: Estratégia II	96
5.6.4	Purificação do sobrenadante da estratégia II	101
5.7	CARACTERIZAÇÃO DE CfCLER	102
5.7.1	Avaliação de glicosilações	102
5.7.2	Espectrometria de massa	104
5.7.3	Atividade residual de armazenamento	107
5.7.4	Temperatura de atuação da enzima de CfCLER	108
5.7.5	Termoestabilidade de CfCLER	109
5.7.6	pH de atuação da enzima de CfCLER	114
5.7.7	Atividade residual em diferentes pHs	115
5.7.8	Atividade residual na presença de Solventes Orgânicos.....	116
5.7.9	Atividade na presença de Surfactantes	122
5.7.10	Atividade na presença de íons metálicos	123
5.7.11	Avaliação da degradação de cutina	125
5.7.12	Especificidade	126
5.8	CINÉTICA ENZIMÁTICA	130
5.9	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	134
5.9.1	Hidrólise de PLA, PHB e PCL	134
5.9.2	Degradação de filme PET	136
5.9.3	Atividade em detergentes de roupa	140
5.9.4	Avaliação da produção de Biodiesel por CfCLER	141
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	143
	REFERÊNCIAS	145
7	APENDICE	160
8	ANEXO	163
8.1	MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGO	163
8.2	SOLICITAÇÃO DE PATENTE E REIVINDICAÇÃO TECNOLÓGICA	164
8.3	PARTICIPAÇÃO EM PROGRAMA DE ACELERAÇÃO DE STARTUP	165

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PLÁSTICOS, POLÍMEROS E SEUS DESAFIOS

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), plástico é um termo genérico para “materiais poliméricos formado por unidades com certa repetibilidade que podem conter outras substâncias para melhorar o desempenho e/ou reduzir custos”, sendo estes de origem sintética ou semissintética (Vert *et al.*, 2012). Nesse sentido, é importante diferenciar os termos polímero e plástico, pois o polímero é um material virgem caracterizado por longas cadeias moleculares formadas por unidades repetidas. Já o plástico é um polímero que foi modificado ou misturado com moléculas, aditivos, cargas e outros componentes para atender principalmente os desempenhos solicitados para uma aplicação específica. Portanto, um polímero tem uma composição muito simples em relação a um plástico. Essa diferença é importante, uma vez que as pesquisas geralmente se concentram nos polímeros e não nas estruturas complexas dos plásticos, devido a padronização e reprodutibilidade dos resultados (Gioia *et al.*, 2021).

Assim, o plástico se tornou indispensável à economia e vida moderna devido às suas propriedades químicas superiores, tais como resistência, leveza, ductibilidade, longevidade e baixo custo de produção (Sekhar *et al.*, 2016). Dessa forma, as necessidades humanas elementares como abrigo, vestimenta, proteção, comunicação e armazenamento de alimentos foram supridas, substituindo materiais naturais como papel, vidro, metais, fibras de tecidos etc. (Phuong *et al.*, 2016). Além disso, na área da saúde, os polímeros funcionais permitem a liberação controlada de medicamentos, protegem os seres humanos contra ataques bacterianos e são componentes de implantes, obturações dentárias, quadris artificiais, seringas descartáveis, bolsas de sangue, cosméticos e vários sensores (Hees *et al.*, 2018).

Embora existam cerca de 60.000 formulações plásticas diferentes, apenas seis polímeros correspondem por 90% da produção total de plástico: polipropileno (PP), polietileno de alta

densidade (HDPE), polietileno de baixa densidade (LDPE), poli(tereftalato de etileno) (PET), cloreto de polivinila (PVC), poliestireno (PS) e poliuretano (PU) (Ramkumar *et al.*, 2021). Neste sentido, o plástico se tornou uma importante *commodity* e sua produção global têm crescido rapidamente, atingindo 359 milhões de toneladas/ano em 2019 e com perspectivas para 1 bilhão de toneladas/ano até 2050 (European Bioplastics, 2019).

Contudo, a crescente demanda por plástico tem gerado consequências ao meio ambiente, devido à má gestão dos resíduos urbanos, aliado ao descarte incorreto e descontrolado do lixo plástico nos solos/lençóis freáticos, rios e oceanos. Chegando, por exemplo, a atingir mais de 150 milhões de toneladas de plásticos flutuando no mar (Kumar *et al.*, 2020). Neste ritmo, estima-se que até 2050 os oceanos terão mais plástico do que peixes (Getor *et al.*, 2020). Neste sentido, as características que tornaram os plásticos convenientes, como longevidade, têm provocado problemas devido a lenta degradação deste material no meio ambiente e sua deterioração em partículas tóxicas menores; tornando-se uma preocupação mundial, uma vez que este processo pode levar centenas de anos, causar malefícios à saúde de animais, além de desperdiçar preciosos recursos fósseis em embalagens descartadas após um único uso (Eriksen *et al.*, 2014). Em 2020, este problema foi agravado pelos plásticos de uso único e pelo aumento da produção de equipamentos de proteção individual provocados pela pandemia de COVID-19 (Mittal *et al.*, 2022). Neste contexto, em janeiro de 2018, a União Europeia (UE) lançou “Uma Estratégia Europeia para Plásticos em uma Economia Circular”, que inclui o compromisso de que, até 2030, “todas as embalagens plásticas colocadas no mercado da UE sejam reutilizáveis ou recicláveis de forma econômica e eficaz” (Comissão Europeia, 2018). Assim, a Economia Circular é baseada em três princípios fundamentais: (1) reduzir os resíduos plásticos e a poluição por meio do design do produto, (2) reter recursos e produtos em uso e (3) regenerar e preservar os sistemas naturais (Payne *et al.*, 2019). Além disso, em maio de 2020, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) divulgou a “Estratégia Nacional de

Reciclagem”, e um de seus objetivos foi “desenvolver e implementar definições, medidas, metas e indicadores de desempenho do sistema nacional de reciclagem” (USEPA , 2020).

Outra preocupação mundial, pública e científica, é a contaminação do solo e da água com micro (>5 mm) e nano plásticos (1-100 nm) (Veerasingam *et al.*, 2020). Estas partículas são formadas a partir da deterioração do plástico por ação das marés, mecânica, ultravioleta ou biológica, levando a ruptura do polímero em estruturas menores (Leonov e Tiunov, 2020). Seu pequeno tamanho permite que sejam absorvidos no solo por plantas superiores, potencializando sua entrada na cadeia alimentar através da via terrestre (Li *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020). No ambiente aquático, os micro e nano plásticos atraem animais marinhos pelo seu odor, cor e pelas algas que crescem à sua volta, sendo capazes de ultrapassar as barreiras biológicas, penetrar nos tecidos e se acumularem nos órgãos (Kashiwada, 2006 ; Von Moos *et al.*, 2012). Como resultado, essas partículas são prontamente biodisponíveis para corais, plânctons, crustáceos, moluscos, etc. e são bioacumuladas em várias cadeias alimentares (Browne *et al.*, 2008). Uma vez acumulados, os produtos químicos tóxicos presentes nos micro e nano plásticos causam graves problemas às formas de vida aquática como mortalidade ou efeitos subletais, danos físicos e modulações moleculares. Além disso, micro plásticos presentes no ar podem ser inalados diretamente por trabalhadores do setor de reciclagem mecânica, depositando nos pulmões e vias aéreas humanas e causando inflamação resultante da liberação de mensageiros intracelulares, espécies reativas de oxigênio e proteases (Gasperi *et al.* 2018). Devido às suas superfícies hidrofóbicas, os micro plásticos podem adsorver compostos bioacumulativos e tóxicos persistentes (PBT), incluindo poluentes orgânicos persistentes (POPs) e metais pesados, causando sérios problemas à saúde humana e animal (Chen *et al.*, 2020a ; Burrows *et al.*, 2020). Além disso, estes podem se acumular em diferentes tecidos do corpo, como fígado, rins e intestino, e podem alterar o metabolismo e o estresse oxidativo (Bui *et al.*, 2020 ; Yang *et al.*, 2019).

Em conjunto, esses dados demonstram que mudanças drásticas são necessárias para a alteração de uma economia linear para uma economia circular do plástico, visando a reutilização eficiente e degradação de resíduos plásticos, visto que apenas 14% do plástico mundial produzido é reciclado (Martinez *et al.*, 2022).

1.2 BIOPLÁSTICOS E BIOPOLÍMEROS, UMA SOLUÇÃO?

Diante deste contexto, a busca por alternativas biodegradáveis e biodegradação de resíduos plásticos convencionais assumiram crescente importância nos últimos anos (Haider *et al.*, 2019). Assim, desde 1980, pesquisadores vêm desenvolvendo diversos biopolímeros (Figura 1), os quais passaram a ser fabricados em toneladas, reduzindo os custos de produção e viabilizando a substituição dos plásticos convencionais (Schneiderman e Hillmyer, 2017).

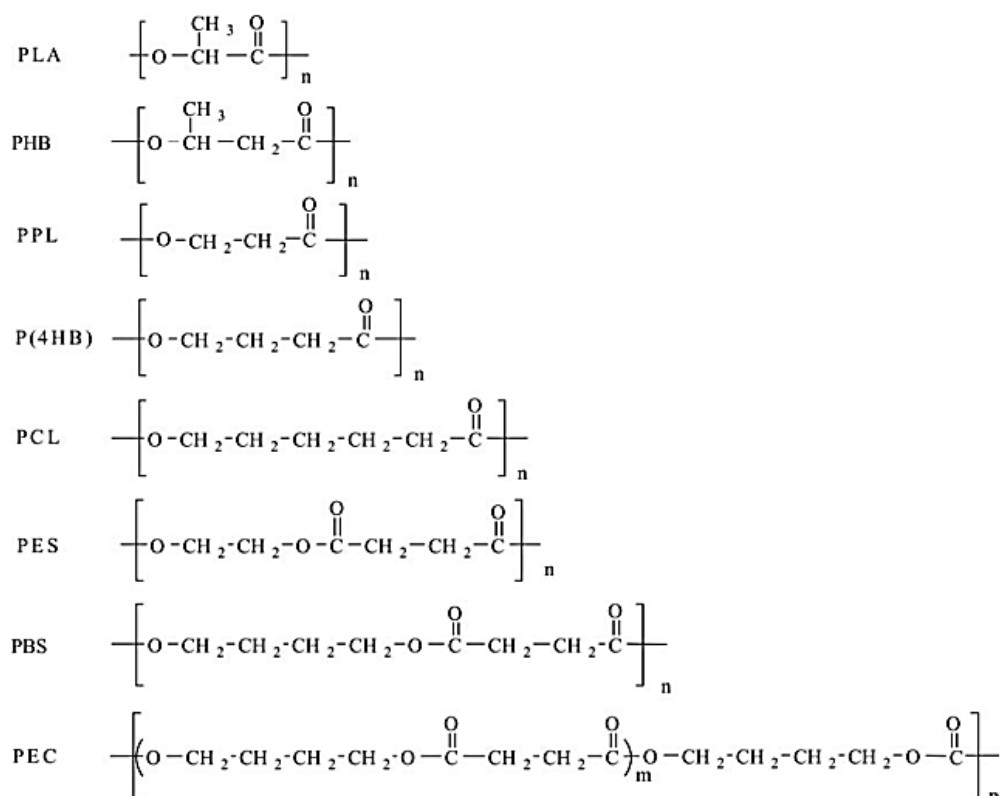


Figura 1. Estrutura química de biopolímeros. Poli (lactídeo) (PLA), poli (3-hidroxibutirato) (PHB), poli (propiolactona) (PPL), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), poli (succinato de etileno) (PES), poli (succinato de butilenos) (PBS), poli (3-hidroxibutirato- co -3-hidroxivalerato) (PHBV) e poli (carbonato de éster) (PEC) (Tokiwa e Calabia, 2004).

Como definição, segundo a IUPAC, os polímeros biodegradáveis ou bioplásticos são considerados “polímeros suscetíveis aos ataques microbianos, que se tornam degradáveis em

condições ambientais ou de compostagem” (McNaught e Wilkinson, 1997). Porém, outras definições exigem que um material biodegradável seja mineralizado em dióxido de carbono, água e biomassa durante a biodegradação (norma PD CEN/TR 15351:2006). Assim, estes polímeros precisam passar por testes de biodegradabilidade em condições laboratoriais padronizadas seguindo padrões internacionais (ISO), do Comité Europeu de Normalização (CEN) ou da Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM) para receber o selo de biodegradabilidade (García-Depraect *et al.*, 2021). De acordo com ASTM D6400 (2019), ISO 14855 (2013) e EN 13432:2000 (2005), a degradação biológica dos biopolímeros é definida pela quantidade de dióxido de carbono (CO₂) liberada durante o processo. Enquanto outros métodos de avaliação são: a medição do aumento da superfície, o crescimento microbiano, a mudança na massa molar, análise de elementos químicos ou uma comparação dos valores das características mecânicas (Kliem *et al.*, 2020).

Neste sentido, estes materiais podem ser classificados em quatro categorias:

- i) Polímeros convencionais não biodegradáveis e derivados de combustíveis fósseis como Polietileno (PE), Polipropileno (PP), Polietileno tereftalato (PET);
- ii) Biopolímeros biodegradáveis derivados de combustíveis fósseis como Polibutileno de tereftalato adipato (PBAT), Policaprolactona (PLC);
- iii) Biopolímeros Biodegradáveis derivados de biomassa (Bio-based) como: Ácido polilático (PLA), Polihidroxialcanoato (PHA), Polibutileno succinato (PBS), Bioplástico a base de amido, celulose, quitina e algas marinhas;
- iv) Biopolímeros não biodegradáveis e derivados de biomassa (Bio-based) como bio-PET, Poliamido (PA), bio-PE, Politrimetileno tereftalato (PPT) (Chong *et al.*, 2021).

Devido à evolução dos bioplásticos nas últimas décadas, a sua regulamentação tornou-se necessária (Melchor-Martínez *et al.*, 2022). Porém, mesmo quando existem padrões, eles não

são obrigatórios, sendo tratados como um conjunto de regras e testes para analisar o bioplástico. Assim, a parcela do setor da indústria que analisa o bioplástico é motivada a obter uma certificação para aprovação do cliente, principalmente quando seus clientes preferem marcas com compromissos sustentáveis (Filiciotto e Rothenberg, 2021). Dessa forma, as organizações mais requisitadas que oferecem esse serviço são o Biodegradable Product Institute, Tüv Austria (anteriormente Vinçotte), DIN Certco, a Australasian Bioplastics Association e a Japan BioPlastics Association (Melchor-Martínez *et al.*, 2022). Neste sentido, existem algumas controvérsias em relação à biodegradabilidade de alguns polímeros fora das condições de laboratório que serão exploradas adiante.

Com relação ao mercado, a indústria de bioplásticos é relatada como um setor jovem e inovador, possuindo um grande potencial econômico e ecológico para uma bioeconomia circular de baixo carbono que utiliza recursos de forma mais eficiente (Payne *et al.*, 2019). Neste contexto, a produção global de biopolímeros atingiu 2,11 milhões de toneladas em 2019 e prevê-se um crescimento de 15% até o ano de 2024 (European Bioplastics, 2020). Neste contexto, o Brasil é referência em biomassa e tem plena capacidade no desenvolvimento de produtos mais sustentáveis como o bioplástico (Chandal *et al.*, 2021). No entanto, ainda é preciso estimular o mercado de produtos de fontes renováveis. Uma vez que o mercado de bioplásticos no Brasil ainda é incipiente, com ausência de dados estruturados sobre sua produção, setores de maior uso, exportações e importações. No entanto, duas empresas pioneiras na produção desses materiais podem ser destacadas: a Braskem, que produz o eteno verde e o polietileno verde denominado 'eu sou verde' a partir da cana-de-açúcar, e a PHB Industrial, que atualmente produz o 'Biocycle', um plástico biodegradável também da cana-de-açúcar (Payne *et al.*, 2019).

Contudo, de acordo com o relatório do Banco Mundial de 2018, o Brasil é o quarto maior produtor de resíduos plásticos do mundo, com cerca de 11 milhões de toneladas por ano,

atrás apenas dos Estados Unidos, China e Índia. Além disso, o Brasil também é um dos países com baixo índice de reciclagem desse tipo de resíduo, apenas 1,2% (Kaza *et al.*, 2018). Porém o Brasil possui uma Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) – Lei nº 12.305/10 – que incentiva o país a praticar a reciclagem por meio da logística reversa, exigindo dos setores público e privado transparência na gestão dos seus resíduos. Embora a PNRS exista há mais de 10 anos, algumas leis específicas para o uso de materiais biodegradáveis em substituição aos plásticos convencionais tem sido elaboradas somente recentemente (Brasil, 2010). A ausência de maiores esclarecimentos nas leis que incentivam a Economia Circular aumenta os desafios da reciclagem de plásticos, assim como bioplásticos, no Brasil. Assim, dada as ações promovidas pelos países desenvolvidos, o Brasil está atrasado em suas políticas públicas para obter uma economia circular dos resíduos plásticos.

1.2.1 Principais Biopolímeros

Atualmente, os principais polímeros biodegradáveis empregados no mercado são o ácido polilático (PLA) (24% da produção global de biopolímeros), polímeros derivados de amido (44%), polihidroxibutirato (PHB) (5,6%) e outros (3,5%) como a policaprolactona (PCL) (Bioplastics market data, 2017). Os produtos gerados a partir da degradação destes biopolímeros são oligômeros, dímeros e unidades monoméricas que podem ser totalmente reciclados (Degli-Innocenti, 2014).

O PLA é um poliéster alifático linear sintetizado a partir da poli condensação do ácido láctico, o qual é produzido naturalmente pela moagem úmida do milho via fermentação do amido ou pela abertura do anel catalítico do grupo lactídeo (Fukuzaki *et al.*, 1989). Além disso, é um polímero hidrofóbico, semi-cristalino, com uma temperatura de transição vítrea (T_g) de cerca de 60°C (Ho *et al.*, 1999). Assim, acima do T_g , as cadeias nas regiões amorfas do polímero tornam-se flexíveis, aprimorando o processo de degradação na compostagem industrial. Além disso, o PLA tem três estruturas, nomeadamente o poli(L-lactido) (PLLA), o poli(D-lactido) (PDLA) e o

poli(D,L-lactido) (PDLA). Isso ocorre porque ele tem duas formas estereoisoméricas de ácido láctico que são ácidos levo- ou L-lácticos e ácidos dextro- ou D-lácticos. A proporção da combinação desses enantiômeros e suas sequências têm influência na cristalinidade, propriedades térmicas e mecânicas do PLA resultante (Song *et al.*, 2011). O aumento da concentração de D-lactídeo produz polímeros PLA de alto custo com estrutura mais cristalina e filmes com melhor estabilidade térmica, resistência mecânica e propriedades de barreira. O poli(D,L-lactido) com 88-90% de L-lactido tem sido amplamente utilizado para fins de embalagem, pois é fácil de processar por termoformagem e apresenta propriedades semelhantes ao poliestireno (Byun *et al.*, 2014). Assim, o PLA pode ser termoformado em copos, bandejas, recipientes, sacolas e caixas (Tomita *et al.*, 1999). Além disso, o PLA possui boas características de rigidez, permitindo a substituição de poliestireno e PET em algumas aplicações (Haider *et al.*, 2019).

Outro polímero biodegradável é o PHB, o polihidroxialcanoato (PHAs) mais empregado no mercado. Ele é um derivado biosintético produzido por bactérias em condições de nutrientes inorgânicos escassos e excesso de carbono orgânico derivado de fontes como celulose, sacarose e amido (Williams e Peoples, 1996). Assim, estes carboidratos são bioquimicamente convertidos em unidades de hidroxialcanoatos, polimerizados e armazenados na forma de corpos de inclusões no citoplasma da célula microbiana (Scott, 1999). O PHB apresenta propriedades físico-químicas muito similares ao polipropileno, com ponto de fusão ao redor dos 175 °C, temperatura de transição vítrea de 50°C e uma fase cristalina e outra amorfa (Haider *et al.*, 2019). Além de propriedades termoplásticas, que lhe permitem ser moldado ou transformado em filmes para aplicações diversas como garrafas, sacolas, filme de embrulho e fraldas descartáveis, o PHB é também biocompatível, com potencial para aplicações médico-veterinárias, como suturas, suportes de culturas e encapsulação de fármacos (Doi *et al.*, 1992).

O PLC é um poliéster alifático, semi-cristalino, obtido a partir da abertura e polimerização de ϵ -caprolactona (Oh *et al.*, 2007). O PLC possui temperatura de transição vítrea de 60°C e baixo

ponto de fusão (60°C), o que permite que seja moldado facilmente em protótipos, peças plásticas e materiais de artesanato (Abedalwafa *et al.*, 2013). Além disto, o PLC possui biocompatibilidade, permitindo o uso deste em biomateriais para implantes (Siddiqui *et al.*, 2018).

O PET (Polietileno tereftalato) é um polímero termoplástico que pode ser produzido a partir de combustíveis fósseis ou biomassa, também chamado de BioPET. Este é produzido industrialmente em duas etapas: pré-polimerização e a policondensação. A primeira etapa corresponde à fabricação do oligômero tereftalato de bis (2-hidroxi-etileno) (BHET), a partir de duas rotas: I) policondensação de dimetil-tereftalato (DMT) e o Etilenoglicol (EG) ou II) policondensação de Ácido tereftálico (PTA) e metanol. Na segunda etapa os monômeros de BHET são condensados formando PET e liberando o etileno glicol. Este polímero é um dos mais empregados no mercado, sua produção global é estimada em 87,16 milhões de toneladas até 2022 (Urbaneck *et al.*, 2021). Porém, apenas 9% do PET produzido em 2018 foi reciclado (Garcia *et al.*, 2021). Um dado preocupante, visto que os cálculos estimados para parâmetros de meia-vida do PET com base no método SSDR (taxa de degradação do substrato específico) mostraram que pode levar mais de 2.500 anos (Chamas *et al.*, 2020).

1.3 DEGRADAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

Em todo o mundo, cerca de 56% de todos os resíduos plásticos são descartados em aterros a cada ano, 25% são incinerados e apenas 14% são reciclados (OCDE, 2018 ; UNEP, 2020). A degradação de biopolímeros pode ocorrer por processos físicos, químicos e/ou enzimáticos. Nos processos físicos os biopolímeros podem ser triturados em partículas menores e utilizados para termoformar novos plásticos. Porém, isso pode alterar as propriedades físicas do material reduzindo sua resistência e nem todos os polímeros suportam esse tratamento (Kliem *et al.*, 2020). Além disso, do ponto de vista energético, o processo de trituração exige maior gasto de energia quando comparado aos demais (Piemonte *et al.*, 2013). Outro processo físico é a incineração, que pode utilizar o calor específico liberado do plástico para aquecer vapor de água em turbinas

elétricas, gerando energia. Porém, a combustão leva a liberação de compostos do efeito estufa como dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO), metano (CH_4), e outros dependendo dos aditivos (García-Depraect *et al.*, 2021). Além disso os polímeros podem sofrer ação de radiação Ultravioleta (UV), fragmentando as ligações químicas e alterando suas propriedades de rigidez (Piemonte *et al.*, 2013).

Nos processos químicos, ácidos, bases e outros agentes químicos promovem a quebra e liberação de oligômeros, dímeros e monômeros que podem ser reutilizados para produção de novos biopolímeros. Porém este tipo de reciclagem tem maior impacto ambiental, no que se refere aos resíduos químicos liberados dos aditivos dos plásticos e tem maior custo, pois são processos que exigem elevadas temperaturas (70-200°C) (Cosate *et al.*, 2016).

Nos processos enzimáticos, o processo de degradação microbiana de biopolímeros pode ser dividido em quatro etapas: i) biodeterioração, ii) despolimerização, iii) bioassimilação e iv) mineralização. (Lucas *et al.*, 2008). Na primeira etapa, a formação de um biofilme microbiano leva à degradação superficial, na qual o material polimérico é fragmentado em partículas menores. Os microorganismos do biofilme secretam enzimas extracelulares, que por sua vez catalisam a despolimerização da cadeia em oligômeros, dímeros ou monômeros. A captação das pequenas moléculas produzidas dessa maneira na célula microbiana e a produção de metabólitos primário e secundário é um processo chamado assimilação. Na última etapa, esses metabólitos são mineralizados em produtos finais como CO_2 , CH_4 , H_2O e N_2 que são liberados no ambiente (García-Depraect *et al.*, 2021).

Além do processo envolvendo microrganismos, é possível submeter o polímero a degradação utilizando apenas enzimas extraídas de culturas microbianas. Nesse processo é possível resgatar os monômeros formadores do polímero e sintetizar um novo polímero com as mesmas propriedades do original, permitindo reciclar completamente o biopolímeros a partir da

despolimerização e polimerização que pode ser efetuada pela mesma enzima ou por enzimas diferentes (Haider *et al.*, 2018).

Contudo, a biodegradação destes biopolímeros é altamente sensível e limitada por condições externas, devido à ausência de água e oxigênio em aterros ou elevado nível de salinidade em ambientes marinhos (Laycock *et al.*, 2017), além da concentração de enzimas, microrganismos, temperatura e valor de pH (Hees *et al.*, 2018). Além disso, quanto mais cristalina é a estrutura, mais recalcitrante torna-se a degradação, uma vez que as enzimas hidrolisam mais facilmente estruturas amorfas, em que a cadeia polimérica se encontra menos organizada (Carniel *et al.*, 2021). Nesse sentido, alguns processos buscam aquecer os biopolímeros até que atinjam a temperatura de transição vítrea (50-100°C), onde as estruturas cristalinas perdem seu nível de organização e se tornam amorfas, facilitando o acesso das enzimas (Boneta *et al.*, 2021). No entanto, nem todas as enzimas são termoestáveis, desnaturando-se antes que alguns polímeros cristalinos possam estar disponíveis (Urbanek *et al.*, 2020).

Em ambientes marinhos, o PHB provou ser um dos poucos plásticos biodegradáveis em elevadas concentrações de sais. Assim, em um ambiente de água do mar simulado a 25 °C, uma perda total de peso de 7% foi detectada após um ano usando filmes de 0,32 mm de espessura (Bagheri *et al.*, 2017). Por outro lado, as baixas temperaturas e a baixa densidade de bactérias na água do mar não são adequadas para biodegradar o PLA, PLC, PBS, PBAT e PET e outros biopolímeros. Desta forma, PLA, PLC e outros polímeros biodegradáveis demonstraram uma perda de peso irrisória durante 380 dias expostos a águas marinhas (Tsuji *et al.*, 2002; Bagheri *et al.*, 2017).

Em água doce, a degradação do PHB não difere significativamente da água do mar. Bagheri e colaboradores (2017) demonstraram uma perda de massa de 8,5% após um ano em condições simuladas análogas ao estudo em água do mar. Mergaert e colaboradores (1995) confirmam a biodegradabilidade em água doce, mas uma perda de massa total de 7% foi medida

após 180 dias e 35% após 358 dias. Novamente, o PLA, PLC, PBS, PBAT, PET e outros biopolímeros não apresentaram perda de massa sob condições simuladas a 25°C de temperatura da água doce (Bagheri *et al.*, 2017).

No solo, o trabalho detalhado de Mergaert e colaboradores (1993) investigou a degradação do PHB em vários solos com diferentes valores de pH em diferentes temperaturas e umidade durante um período de 200 dias. O resultado foi uma degradação fortemente dependente da temperatura com perda de massa de 0,05%/dia a 15°C, 0,12%/dia a 28°C e 0,45%/dia a 40°C. Este último forte aumento é atribuído em particular ao aumento da atividade fúngica em temperaturas de 40°C. Além disso, mais de 200 microrganismos diferentes foram detectados. Boyandin e colaboradores (2013) também confirmaram a biodegradação do PHB em solo tropical. Eles observaram uma perda de massa de 98% em folhas de PHB após um ano de observação. Para o PLA, após um ano a 25 e 37 °C nenhuma perda de massa foi detectada. No entanto, uma perda de massa de mais de 40% e uma redução significativa na massa molar foram detectadas após 8 semanas em temperatura acima 45°C. Da mesma forma, um aumento da temperatura para 50 °C reduziu o tempo para apenas 5 semanas (Karamanlioglu *et al.*, 2013). Em comparação direta, o PLC se degradou no solo lentamente (Bastioli *et al.*, 1995), o que pode ser explicado por uma baixa densidade populacional de microrganismos capazes de degradar este polímero. Já o PBS mostrou-se parcialmente degradável no solo, uma vez que após 180 dias observou-se apenas 11% da perda de massa nos pellets (Hoshino *et al.*, 2001) e 28% no caso de filmes (Teramoto *et al.*, 2004). Da mesma forma, o PBAT se degrada lentamente no solo, com uma perda de massa total de 22% em filmes de 1 mm de espessura em um período de 168 dias (Muroi *et al.*, 2016).

Em lodo de esgoto, a alta densidade de bactérias é vantajosa para a degradação biológica. Assim, a 35 °C, uma perda de massa completa é detectada após 12 semanas para PHB com espessura de 0,5 mm e após 19 semanas para uma espessura de laje de 3,5 mm

(Gutierrez-Wing *et al.*, 2010). Para o PLA observou-se uma degradação biológica de 43% que foi detectada após 277 dias à 37°C, enquanto que a 55 °C houve um aumento da biodegradação para 75% em apenas 75 dias (Yagi *et al.*, 2013). Já o PLC se degrada mais lentamente, perdendo 5% de massa em filmes de 3mm após 120 dias de tratamento (Rutkowska *et al.*, 2002).

Em aterros sanitários, Nishida e colaboradores (1993) investigaram a degradação do PHB, demonstrando que após 13 dias a 30 °C, houve uma perda de massa de cerca de 10%. Para o PLA, o teste de degradabilidade em aterro mostrou uma diminuição da massa dos filmes de PLA de 17%. A mudança de cor observada, de claro para branco-opaco, sugere uma fragilização com um aumento associado na cristalinidade. A fragmentação das folhas foi observada após 11 meses, mas esses fragmentos ainda eram detectáveis após 15 meses (Yosita *et al.*, 2008).

Em compostagens industriais, o PHB e PLC podem ser degradados em 28 dias e o PLA em 60 dias, em temperaturas que atingem até 65 °C (Haider *et al.*, 2019). Porém, estas condições estão muito longe das encontradas na biosfera, o que leva à persistência desses materiais ao longo de décadas poluindo o meio ambiente (Hees *et al.*, 2018). Desta forma, os polímeros biodegradáveis somente são degradados rapidamente dependendo do ambiente circundante.

Além disso, a degradação de biopolímeros está diretamente ligada aos grupos de enzimas produzidas pelos microrganismos do meio ambiente onde o lixo plástico se destina. Consequentemente, tem-se criado um considerável interesse sobre estudos a respeito da degradação enzimática de polímeros, especialmente aqueles que visam o aumento de atividade enzimática pela engenharia de proteínas e descoberta de enzimas capazes de degradar diferentes polímeros (Kumar *et al.*, 2020). Desta forma, faz-se necessário a descoberta de novas enzimas capazes de degradar biopolímeros e a compreensão dos mecanismos enzimáticos.

Em ambientes naturais, as enzimas desempenham um papel importante na catalisação da hidrólise dos polímeros, operando principalmente em temperaturas moderadas, pH neutro e

aumentando as taxas de degradação de 10^8 a 10^{20} vezes (Rittié e Perbal, 2008). Devido a sua massa molecular relativamente alta, as enzimas são incapazes de penetrar na matriz polimérica. Portanto, a hidrólise enzimática ocorre tipicamente por erosão da superfície (Laycock *et al.*, 2017). Neste sentido, o principal alvo do ataque enzimático são as ligações hidrolíticas, como ésteres, amidas, glicosídeos, anidridos, carbonatos e uretanos (Shah *et al.*, 2014). Assim, estas reações são promovidas por enzimas hidrolases que incluem cutinases, lipases, esterases, glicosidases, proteases, fosfatases, despolimerases e outras enzimas desta classe (Roohi *et al.*, 2017), as quais catalisam a hidrólise do substrato gerando cadeias mais curtas de oligômeros, dímeros e monômeros que podem ser metabolizados pelos microrganismos. Como exemplos destas enzimas têm-se: as cutinases de *Cryptococcus sp. s-2* capaz de degradar PLA, PLC e PBS (Masaki *et al.*, 2005); de *Thermomonospora curvata* capaz de degradar poliuretano (Islam *et al.*, 2019); de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* capaz de degradar poliéster (Haernvall *et al.*, 2017). Além das lipases de *Pseudomonas pelagia* capaz de degradar poliéster (Haernvall *et al.*, 2017); e as lipases sumarizadas por Roohi e colaboradores (2017) que são capazes de degradar poliuretano, e outras hidrolases revisadas pelo mesmo autor. Neste contexto, as cutinases se destacam como interessante alvo de pesquisa de grupos interessados na degradação de biopolímeros.

1.3.1 Enzimas degradadoras de biopolímeros

Algumas hidrolases já foram identificadas com a capacidade de degradar biopolímeros específicos em algumas condições. Dentre estas, as cutinases se destacam devido sua versatilidade e será explorada no próximo tópico dessa tese. Além desta, proteases, lipases, PLAs, PHA despolimerases e PETases são as principais enzimas relatadas na literatura.

Neste contexto, existem diferentes tipos de proteases que são divididas em seis classes com base em seus mecanismos de ação: proteases de serina, proteases de cisteína, proteases de treonina, proteases glutâmicas, aspartil proteases e metaloproteases (Rawlings *et al.*, 2011). Entre elas, as metaloproteases (EC 3.4.17) usam um centro metálico mono ou binuclear para

catálise e utilizam mecanismos independentes da água (Fontecilla-Camps, 2006). Com relação a degradação de biopolímeros, a neprilisina (NEP), uma metaloprotease mononuclear, ganhou destaque por ser capaz de degradar PET. Seu mecanismo de ação usa de ataque de hidróxido ligado ao Zinco (MH) e mecanismo de protonação reversa para clivar as ligações éster (Hu *et al.*, 2021).

Outro grupo importante de enzimas são as lipases (EC 3.1.1.3), que pertencem a família das α/β hidrolases e agem sobre ligações éster de triglicerídeos para formação de ácido graxo e glicerol (Wcisłək *et al.*, 2018). Seu mecanismo de ação se baseia em uma tríade catalítica de Serina – Histidina – Aspartato ou Glutamato (Ser-His-Asp ou Glu) que na presença de água promove a hidrólise da ligação éster (Khan *et al.*, 2017). Algumas lipases apresentam uma estrutura de tampa que recobre o sítio catalítico da enzima e se encontra “aberto” na interface óleo e água (Hermanova *et al.*, 2012). Esta estrutura de tampa de lipase tem duas funções principais: I) Manter a enzima solúvel antes que atinja as gotículas de triacilglicerol, mascarando o local de ligação dos lipídios; II) Um papel na especificidade do substrato (Carrière *et al.*, 1997). Neste contexto, as principais lipases utilizadas no mercado: *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa* e *Rhizopus oryzae*, foram incapazes de catalisar a hidrólise de ligações éster de PBS, PBSA, hidrolisando apenas PLA e PCL, enquanto a maioria das cutinases relatadas na literatura foram capazes de hidrolisar todos os *polímeros* citados acima (Lin *et al.*, 2019). Dentro deste contexto particular, as lipases microbianas exibem baixa atividade contra PET devido à sua estrutura de tampa que cobre o sítio ativo hidrofóbico que está enterrado na estrutura da enzima. Enquanto cutinases fúngicas e bacterianas não possuem essa estrutura e mostram um centro catalítico exposto próximo à superfície da proteína que aumenta sua acessibilidade para substratos poliméricos (Urbanek *et al.*, 2020). Porém existem exceções, em que lipases que não possuem tampa apresentam atividade sobre o PET. São

exemplos as lipases de *Aspergillus oryzae* (Wang *et al.*, 2008) e *Streptomyces exfoliatus* (Wei *et al.*, 1998).

Uma classe menos estudada de enzimas degradadoras de polímeros são as PLAases, um grupo de hidrolases que podem despolimerizar poliésteres alifáticos, com elevada especificidade a PLA (Li *et al.*, 2008). Estas enzimas apresentam uma similaridade relativamente alta com serina proteases e utilizam um mecanismo de ação baseado na tríade Ser-His-Asp (Urbanek *et al.*, 2020). As enzimas mais conhecidas deste grupo são as PLAase II e PLAase III de *Amycolatopsis orientalis* (Li *et al.*, 2008).

Outro grupo de enzimas capazes de degradar biopolímeros são as PHA despolimerases, que são carboxiesterases extracelulares (e-PHA depolimerases EC 3.1.1.75) ou intracelulares (i-PHA depolimerases EC 3.1.1.76) (Jendrossek e Handrick, 2002). Porém, poucos microrganismos degradadores de PHA foram encontrados no ambiente, como bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas sp.* e *Bdellovibrio bacteriovorus*), e actinobactérias Gram-positivas (*Streptomyces sp.*) (Urbanek *et al.*, 2020). Neste sentido, as estruturas primárias de algumas despolimerases extracelulares de PHA (e-PHA) foram elucidadas e depositadas no servidor NCBI. A análise de similaridade de sequência permitiu detectar dois domínios funcionalmente nessas enzimas: (1) um domínio catalítico, que inclui a tríade catalítica S-H-D em seu sítio ativo (resíduos de serina, histidina e aspartato como serina hidrolases), onde a serina catalítica está posicionada ao longo de uma sequência pentapeptídica consenso encontrada em lipases (Gly-X₁-Ser-X₂-Gly) com mesmo mecanismo de ação e (2) um domínio de ligação ao substrato (SBD), que geralmente está localizado na região C-terminal (Kasuya *et al.*, 1999). Ao contrário das despolimerases PHA, um domínio de ligação de substrato específico (SBD) está ausente nas cutinases (Wei *et al.*, 2014).

Por último temos as PETases (EC 3.1.1.101), uma nova classe de enzimas recém-descoberta. Em 2016, Yoshida e colaboradores (2016) isolaram com sucesso um consórcio

microbiano nº 46 que degradou PET amorfo de uma estação de reciclagem de resíduos à temperatura ambiente. Em seguida, uma bactéria capaz de degradar e assimilar PET denominada *I. sakaiensis* 201-F6 foi isolada do consórcio nº 46. Este microrganismo foi capaz de produzir as enzimas denominadas PETase e MHETase para degradar o PET e seu subproduto MHET, o que forneceu uma nova direção para a biodegradação do PET sob temperatura ambiente (Taniguchi *et al.*, 2019; Yoshida *et al.*, 2016). Ao analisar a estrutura desta enzima notou-se que a diferença entre a PETase e os homólogos de cutinase era uma fenda mais ampla no sítio ativo, que supõem-se ser necessária para acomodar poliésteres semiaromáticos cristalinos. A expansão é alcançada com um rearranjo mínimo das alças adjacentes e da estrutura secundária. Além disso, seu mecanismo de ação se baseia na tríade catalítica His-Ser-Asp, semelhante as lipases e cutinases. As cutinases possuem capacidade de hidrólise de PET devido às suas grandes bolsas de ligação ao substrato sem estruturas de tampa, o que é propício para a combinação de PET com seus centros ativos. No entanto, cutinases geralmente degradam PET em altas temperaturas (50-70 ° C), enquanto PETase e MHETase podem hidrolisar eficientemente e especificamente PET a 30°C (Yoshida *et al.*, 2016). A descoberta de PETase e MHETase foi útil para alcançar a biodegradação de alta eficiência do PET em temperatura ambiente. Porém, as hidrolases de PET identificadas na natureza apresentam baixa estabilidade, baixa atividade e baixos níveis de expressão, o que limita sua aplicação industrial em larga escala. Alguns estudos se concentraram no uso de estratégias de engenharia enzimática para melhorar a estabilidade e eficiência de biodegradação de PET (Cui *et al.*, 2021). Neste sentido, Tournier e colaboradores (2020) foram capazes de decompor 90% das garrafas plásticas PET trituradas a 72 °C por 10 h, um marco para reciclagem deste polímero. A partir de então, outras PETases tem sido relatadas, destacando-se a enzima LCC obtido com sucesso de *C. thermocellum*, capaz de degradar 60% de um filme de PET comercial a 60 °C após 14 dias (Yan *et al.*, 2021). Assim, a busca por novas enzimas similares às cutinases, capazes de degradar PET

e outros biopolímeros, demonstram o potencial da prospecção de novas enzimas no setor de reciclagem.

1.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CUTINASES

Cutinases (EC 3.1.1.74) são as menores serino esterases (<40 KDa) pertencentes a superfamília α/β hidrolases, à qual lipases e esterases pertencem (Nyyssölä, 2015). Porém, cutinases diferem das esterases por sua capacidade de hidrolisar poliésteres de alta massa molecular. Além disso, elas se diferem das lipases a nível estrutural, por não apresentarem uma estrutura de tampa hidrofóbica que cobre a serina catalítica (Chen *et al.*, 2013), com exceção da cutinase de *Trichoderma reesei* (Roussel *et al.*, 2014) que apresenta uma mini tampa hidrofóbica cobrindo o sítio catalítico. Assim, o sítio ativo da maioria das cutinases não está profundamente enterrada dentro de um canal, coberto por uma tampa hidrofóbica (Lawson e Brzozowski, 1992), permitindo uma maior exposição da tríade catalítica ao solvente. Consequentemente, as cutinases apresentam capacidade de hidrolisar substratos menores solúveis e acomodar substratos rígidos que apresentam impedimento estérico em lipases (Martinez et al., 1992). Além disso, a ausência da tampa hidrofóbica dispensa ativação interfacial (água/óleo), permitindo que a enzima realize a hidrólise em soluções aquosas, assim como em misturas bifásicas (Roohi *et al.*, 2017). Por fim, é possível também classificar uma enzima como “do tipo cutinase” (*cutinase-like*), quando esta possui características similares a uma cutinase, mas sua atividade de degradação sobre a cutina ainda não foi comprovada (Nyyssölä, 2015).

Inicialmente, genes codificadores de cutinases foram identificados em fungos patogênicos degradadores de cutina da folha das plantas (Schafe, 1993), mas atualmente foram identificadas em gêneros não patogênicos como *Cryptococcus* e em diversas bactérias e fungos (Urbanek *et al.*, 2020). Seu substrato primário é a cutina, um componente lipídico estrutural da cutícula das plantas, que cobre a epiderme das folhas e caules para protegê-las contra dessecação e microorganismos (Katazina *et al.*, 2022). Além disso, após diversos estudos as cutinases demonstraram a capacidade

de catalisar a hidrólise de uma variedade de polímeros, triacilgliceróis insolúveis e ésteres solúveis de baixa massa molecular, sendo capaz de despolimerizar e reutilizar as unidades formadoras dos polímeros. Além de catalisar reações de esterificação e transesterificação, sendo versáteis para várias aplicações industriais (Chen *et al.*, 2013). Dentre as aplicações industriais estão: (1) a produção de frutas desidratadas, produtos lácteos e ácidos graxos importantes na indústria de alimentos (Dutta *et al.*, 2009); (2) a produção de biodiesel, compostos fenólicos, surfactantes e produtos químicos quirais na indústria química (Carvalho *et al.*, 1999); (3) a utilização como aditivo de detergentes para roupa e louça (Mueller, 2006); e (4) a funcionalização superficial de polímeros, remoção de revestimentos, reciclagem de polímero, biodegradação de resíduos, incluindo PLA, PHB, PLC e outros (Urbanek *et al.*, 2020). Desta forma, as cutinases representam um grupo de enzimas de grande interesse industrial diante da diversidade de aplicações, em particular na biorremediação de resíduos plásticos derivados de biopolímeros, a qual é objeto de estudo deste trabalho.

1.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE CUTINASES

As cutinases descritas na literatura exibem características bioquímicas similares, dentre elas a afinidade a uma ampla gama de substratos, desde polímeros extensos (PET, PLA, PLC e PBS), triglicerídeos, lipídios de 4-18 carbonos até ésteres de baixa massa molecular (Chen *et al.*, 2013). Possuem temperatura de atuação da enzima entre 30 e 50°C e uma faixa de pH ideal entre 4,0-9,5 (Urbanek *et al.*, 2020). Entretanto, apesar de toda versatilidade destas enzimas, sua baixa termoestabilidade e quantidade de proteína obtida de forma nativa têm sido apontadas como as principais desvantagens para algumas aplicações industriais (Chen *et al.*, 2013). Com relação ao mecanismo de ação, as cutinases possuem uma tríade catalítica clássica composta de serina-histidina-aspartato, na qual a serina catalítica é exposta ao solvente. Na reação global de hidrólise do éster carboxílico gera-se um álcool e um ânion de ácido carboxílico. O mecanismo de reação se encontra descrito na Figura 2

Com relação a cinética enzimática, as cutinases apresentam afinidade por substratos menores (2-6 carbonos), no entanto são capazes de hidrolisar moléculas com 16-18 carbonos como cutina (Chen *et al.*, 2013). São enzimas de cinética de ordem zero, com K_m variando de 1-700 μ M, K_{cat} 0,01-5000 seg^{-1} (Tabela 1). Desta forma, cutinases são versáteis capazes de degradar tri, di e mono glicerídeos, assim como polímeros de alta massa molecular como PLA, PLC, PBS, PBAT e PET (Urbanek *et al.*, 2020). Assim, diversos substratos podem ser utilizados para definir parâmetros cinéticos como ésteres sintéticos de para-nitrofenóis, que ao serem hidrolisados passam a absorver luz a 405nm, exibindo uma cor amarela intensa (Katazina *et al.*, 2022). Outros substratos comumente utilizados são os triglicerídeos simples, desde tributirina (C4) ao tripalmitato (C16), que podem ser empregados na titulação de ácidos graxos (Maiti *et al.*, 1979), ou polímeros como PLA, PCL e PBS que reduzem a turbidez durante a hidrólise (Masaki *et al.*, 2005). Dentre estes últimos, os mais empregados e com metodologia consolidada estão os para-nitrofenóis (Bisceglie *et al.*, 2022).

Em relação aos interferentes da atividade enzimática em cutinases, poucos estudos têm se aprofundado e investigado suas causas (Bisceglie *et al.*, 2022). É reportado na literatura que a maioria das cutinases sofrem inibição por parte dos álcoois formados em suas reações de hidrólise como metanol, etanol e butanol (Corpet, 1988). Acredita-se que isso se deva ao efeito de sequestro de moléculas de água para hidratação destes solventes (Su *et al.*, 2018). Porém, Urbanek e colaboradores (2020) relatam isto como uma lacuna no estudo enzimático, demonstrando a escassez de informações a este respeito na área.

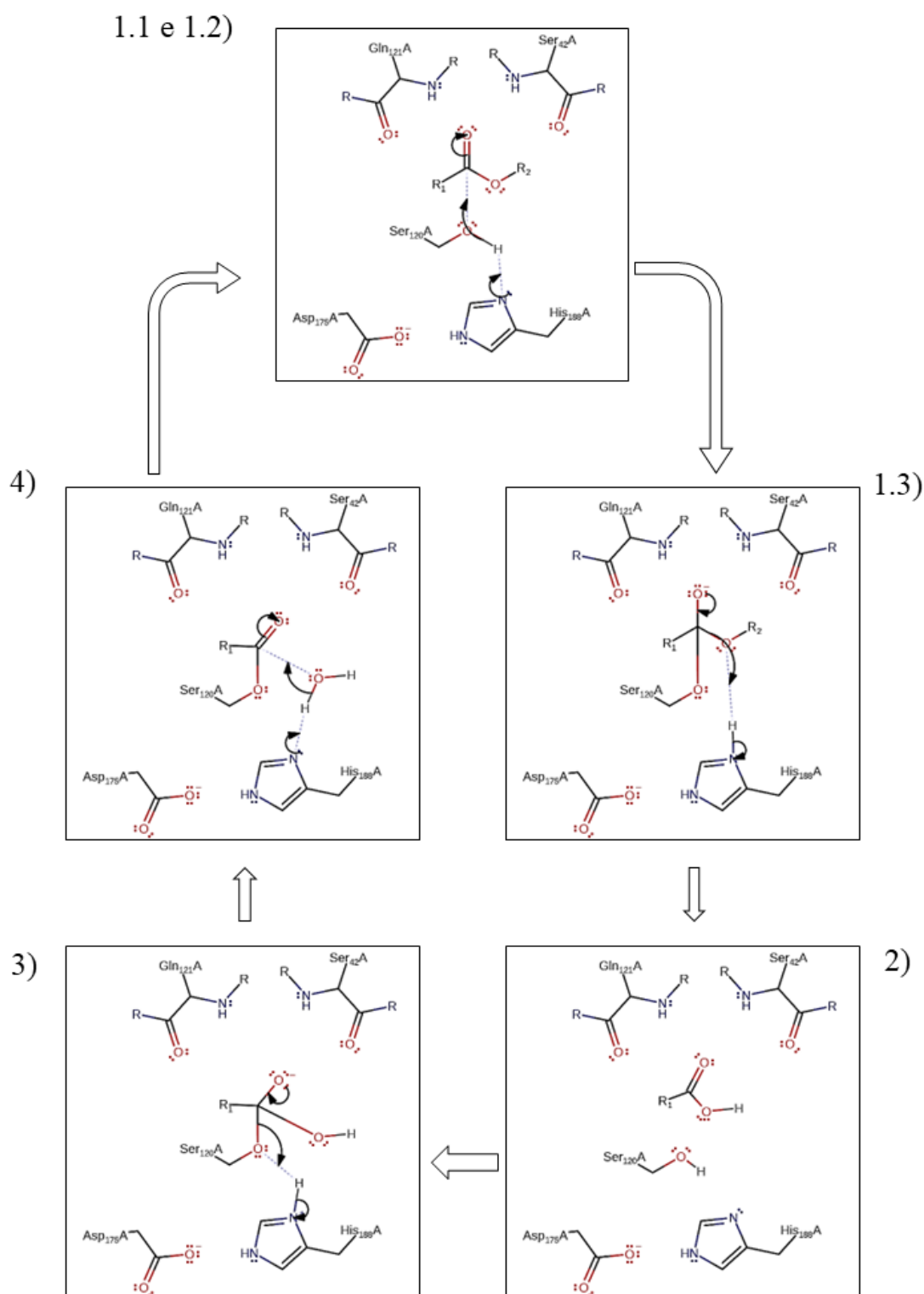


Figura 2. Mecanismo de ação das cutinases 1.1) A Histidina atua como uma base geral ativando o grupo hidroxila da Serina para ataque nucleofílico ao carbono carbonil. 1.2) O Aspartato atua para aumentar a basicidade da histidina. 1.3) O intermediário é formado e estabilizado pelos grupos amida de Glutamina e Serina. 2) O intermediário tetraédrico entra em colapso e um álcool é eliminado. 3) A Histidina ativa uma molécula de água para o ataque nucleofílico e outro intermediário é formado. 4) O intermediário tetraédrico entra em colapso e é eliminado, gerando como produto um ânion de ácido carboxílico, um álcool e íon hidrogênio.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos das cutinases disponíveis na literatura

Organismo Nativo	K _m (μM)	K _{cat} (seg ⁻¹)	K _{cat} /K _m (s ⁻¹ uM ⁻¹)	V _{max} (μmol pNP/h/g)	Substrato	Referência
<i>Bacillus</i> sp. KY0701	7,20	-	-	3,36	pNPB	Adigüzel and Tunçer, 2017
<i>Fusarium solani</i>	1,36	0,07	0,32	-	pNPB	Baker <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,29	0,01	3,40	-	pNPB	Baker <i>et al.</i> , 2012
<i>Alternaria brassicicola</i>	1,96	0,22	0,97	-	pNPB	Baker <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8,96	0,08	0,56	-	pNPB	Baker <i>et al.</i> , 2014
<i>Humicola insolens</i>	2,46	0,07	1,76	-	pNPB	Baker <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adeninivorans</i> LS3	1,6	-	-	-	pNPB	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adeninivorans</i> LS4	1,46	-	-	-	pNPB	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adeninivorans</i> LS5	1,93	-	-	-	pNPB	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Thermobifida fusca</i>	6,73	8,05	0,7	-	pNPB	Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>Thermobifida fusca</i>	5,05	12,36	1,5	-	pNPB	Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium solani pisi</i>	2,72	13,95	3,2	-	pNPB	Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium oxysporum</i>	7,00	1,86	1,52	-	pNPB	Dimarogona <i>et al.</i> , 2015
<i>Malbranchea cinnamomea</i> S168	2,70	0,46	1,70	-	pNPB	Duan <i>et al.</i> , 2017

<i>Pseudomonas cepacia</i> NRRL B 2320	2,30	5,00	-	-	pNPB	Dutta <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus nidulans</i>	6,88	4,03	3,52	1,99	pNPA	Garcia <i>et al.</i> , 2017
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,21	0,01	3,49	-	pNPB	Liu <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,22	0,3	1,36	1,51	pNPB	Maeda <i>et al.</i> , 2005
<i>Tropaeolum majus</i>	2,9	-	-	2,04	pNPB	Maiti <i>et al.</i> , 1979
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,2	0,19	9,3	-	pNPB	Nikolaivits <i>et al.</i> , 2016
<i>Sirococcous conigenus</i> VTT D-04989	1,70	-	-	-	pNPB	Nyyssola <i>et al.</i> , 2014
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> DSM 43304	9,9	1,46	-	1,51	pNPP	Dheeman <i>et al.</i> , 2011
<i>Glomerella cingulata</i>	7,2	0,12	-	-	pNPC	Wan <i>et al.</i> , 2014
<i>Thielavia terrestris</i> CAU709	1,1	0,01	0,77	1,11	pNPB	Xu <i>et al.</i> , 2015
<i>Thielavia terrestris</i> CAU709	1	0,01	0,62	1,46	pNPB	Yang <i>et al.</i> , 2012

Em termos de estrutura, as cutinases depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) diferem em certo grau, mas possuem como semelhança um núcleo hidrofóbico formado de folhas β e filamentos paralelos, ligeiramente torcidos, cercado por alfa hélices (Urbanek *et al.*, 2020). Além de uma fenda catalítica profunda e pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura (Liu *et al.*, 2019). Geralmente, são cristalizadas formando dímeros e possuem uma sequência consenso (Gly-X1-Ser-X2-Gly) altamente conservada, que é responsável pela interação com o substrato e especificidade (Jaeger *et al.*, 1994). A posição X1 é geralmente ocupada por uma histidina ou fenilalanina em cutinases e lipases, atuando como base geral, enquanto a posição X2 é geralmente ocupada por um triptofano que estende a superfície hidrofóbica adjacente ao sítio ativo (Austin *et al.*, 2018). Ademais, análises de RMN da dinâmica da cadeia principal mostram que o sítio de ligação do substrato na cutinase, incluindo o orifício de oxiânion, é móvel na escala de tempo de microssegundo a milissegundo, apesar da aparente rigidez do núcleo da cutinase (Prompers *et al.*, 1997, 1999a e 1999b). Além disso, estudos de mutagênese sítio-dirigida revelaram que o aumento da hidrofobicidade na superfície molecular da cutinase leva a uma maior atividade em substratos hidrofóbicos, como emulsões de azeite, bem como taxas correspondentes mais baixas em substratos de cadeia curta quando comparados com os substratos de cadeia longa (Mannesse *et al.*, 1995; Egmond *et al.*, 1996 e 2000).

Um número substancial de genes de cutinases já foi identificado, caracterizado e as estruturas tridimensionais das respectivas proteínas resolvidas, possibilitando a comparação e identificação das semelhanças entre as estruturas das lipases, cutinases e PETases, conforme descrito anteriormente (Figura 3). Desta forma foi possível estabelecer uma base firme para compreensão mais profunda de novas cutinases e enzimas relacionadas (Chen *et al.*, 2013).

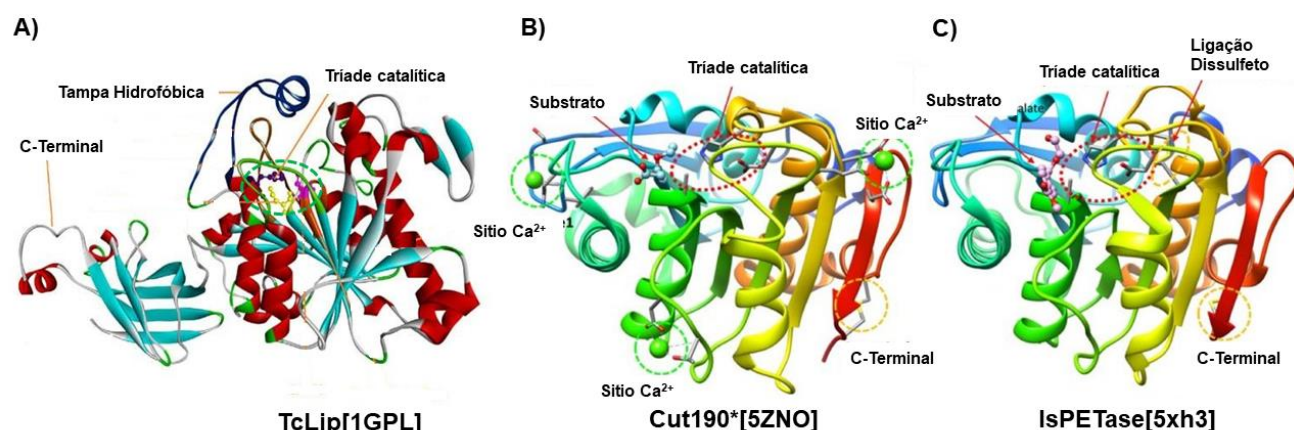


Figura 3. Estruturas comparativas de A) lipases de *Cavia porcellus* (1GPL) com tampa hidrofóbica destacada em azul, tríade catalítica destacada em tracejado em verde e porção C-terminal; B) cutinases de *Saccharomonospora viridis* (5ZNO) com tríade catalítica destacada em tracejado vermelho, sítios de ligação a cálcio destacada em tracejado verde, porção C-terminal destacado em tracejado amarelo, substrato, ausência de tampa hidrofóbica; C) PETase de *Ideonella sakaiensis* (5XH3) com sítio ativo destacado em tracejado vermelho, C-terminal destacado em tracejado amarelo; ponte dessueto destacado em tracejado laranja, substrato, ausência de tampa hidrofóbica e sítios de ligação ao cálcio.

1.6 CUTINASE-LIKE DE *Cryptococcus flavus* I-11

Dentre os organismos supracitados, as leveduras do gênero *Cryptococcus* têm ganhado relevância na produção de cutinases (Urbanek *et al.*, 2020). Neste contexto, as enzimas produzidas por *Cryptococcus flavus* despertaram interesse do nosso grupo de pesquisa por apresentarem características relevantes, tais como termoestabilidade em 60°C por 1 hora e diversidade de substratos como amido, celulose e xilose (Galdino *et al.*, 2008). Em termos de definição, o gênero *Cryptococcus* é constituído por fungos unicelulares (leveduras) pertencentes à família Tremellaceae, encontrados em frutos e insetos. *C. flavus* cepa I-11 foi isolada a partir de folhas e frutos do cerrado brasileiro (Wanderley, 2004) e investigada quanto à produção de enzimas α -amilase, xilanase e carboximetilcelulose (Galdino *et al.*, 2011; Parachin *et al.*, 2009). Da mesma forma, Godoi (2015) identificou na cepa *C. flavus* I-11 uma enzima lipolítica de 24,5 kDa resistente ao metanol e outros solventes orgânicos, uma característica importante para a indústria. Esta enzima de *C. flavus* se mostrou diferente da cutinase-like de *Cryptococcus* sp. s-2 (CLE), uma vez que esta última apresenta alta sensibilidade a solventes polares como etanol e metanol (Kamini *et al.*, 2000). Posteriormente, esta enzima de *C. flavus* foi reconhecida como uma cutinase-like

(CfCLE) através do sequenciamento de seu gene (Godoi, 2018). Neste contexto, dentro das publicações disponíveis na literatura, apenas Watanabe e colaboradores (2015) estudaram CfCLE nativa, relatando um aumento de atividade enzimática provocada por mutagênese não dirigida por exposição ao UV em cepas selvagens de *C. flavus* GB-1. Porém, os autores não caracterizaram as propriedades bioquímica e estruturais da enzima, ou avaliaram sua degradação de polímero ou outras aplicações, criando uma lacuna a ser preenchida.

Devido à escassez de informação sobre CfCLE, nosso grupo de pesquisa usou como modelo a CLE, por sua elevada similaridade. Esta enzima de 22 kDa foi caracterizada por Kamini e colaboradores (2000), apresentando atividade máxima em pH 7,0 a 37 °C, se mantendo estável em faixa de pH de 5,0-9,0 e temperaturas de até 50 °C. Porém, foi inibida por metanol em concentrações acima de 2,5% (v/v) (Kamini *et al.*, 2000). Posteriormente, sua estrutura cristalográfica foi resolvida a 1,05 Å, a qual é constituída de um núcleo hidrofóbico com 6 filamentos de folhas β paralelas, flanqueado por 4 α -hélices, uma estrutura típica de cutinases (Kodama *et al.*, 2009). Dentre as aplicações comprovadas deste modelo podemos citar a transesterificação de óleos vegetais e metanol para produção de biodiesel (Kamini *et al.*, 2001), enantiosseletividade em reações (Lin *et al.*, 2006), biorremediação de triglicerídeos no solo (Thirunavukarasu *et al.*, 2008) e biodegradação de PLA, PLC e PBS (Masaki *et al.*, 2005).

Assim, baseado nestas informações e a similaridade de 97% da sequência de cutinase de *Cryptococcus* sp. s-2 com *C. flavus*, acreditamos que pequenas diferenças na estrutura de CfCLE I-11 permitam que esta enzima seja resistente a solventes polares como metanol e etanol. Isso é um fator importante para a degradação de biopolímeros, uma vez que um dos produtos gerados na reação é um álcool, que na maioria dos casos é o metanol. Consequentemente, a CfCLE I-11 não seria inibida por um dos seus produtos.

Poucas informações sobre a resistência a metanol foram encontradas na literatura. Micaêlo e Soares (2007) realizaram trabalhos de modelagem de mecanismos de hidratação de

enzimas em solventes orgânicos apolares e polares. Neste trabalho foi possível concluir que solventes orgânicos determinam a estrutura e a dinâmica da água na superfície da enzima, uma vez que a água nos solventes orgânicos polares é fragmentada em pequenos aglomerados fracamente ligados à superfície da enzima (Cui *et al.*, 2020). Além disso, os íons parecem desempenhar um papel importante na estabilização de resíduos carregados expostos, principalmente em baixos níveis de hidratação (Micaêlo e Soares, 2007). Assim, solventes orgânicos miscíveis em água competem pelas regiões polares da enzima (Cui *et al.*, 2020). Consequentemente, esses solventes hidrofílicos podem dissolver proteínas, resultando na perda de sua estrutura terciária e consequentemente sua atividade biológica (Corpet *et al.*, 1988; Chin *et al.*, 1994). Quando as enzimas são utilizadas em solventes orgânicos, a água retém seu papel fundamental no controle das propriedades físicas da enzima, e provavelmente esse papel não pode ser desempenhado por outro solvente em enzimas como CLE (Bell *et al.*, 1997). Porém, em algumas enzimas como CfCLE, solventes como álcoois são capazes de substituir o papel da água ligada, agindo como 'substitutos da água' na promoção da atividade enzimática (Micaêlo e Soares, 2007). Apesar desta solvatação em solventes orgânicos ser capaz de colapsar a estrutura terciária de CLE, o mesmo não é observado em CfCLE.

Desta forma, este estudo poderia contribuir para o entendimento das diferenças entre ambas as enzimas, a fim de fornecer novos conhecimentos à literatura de proteínas cutinase. Além disso, a CfCLE tem grande potencial biotecnológico para degradação de biopolímeros, possibilitando a redução de custos industriais comparados com os processos de degradação mecânicos e químicos.

1.7 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EM *Komagataella phaffii*

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante uma variedade de sistemas de expressão de proteínas em bactérias (*Escherichia coli*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Komagataella phaffii*), fungos filamentosos, invertebrados, vertebrados e plantas foi desenvolvida (Sreekrishna, 2010). Dentro deste contexto, *K. phaffii* (conhecida como *Pichia pastoris*) constitui

uma plataforma de expressão de proteínas heterólogas atraente, por apresentar como vantagens: (1) a facilidade de manipulação genética, (2) o simples *design* de cultivo celular, (3) a capacidade de atingir densidades celulares elevadas, (4) a capacidade de secreção de elevados títulos de proteína recombinante corretamente enovelada e (5) a capacidade de realizar modificações pós-traducionais (Spohner *et al.*, 2015). Porém, este sistema possui como desvantagens: (1) a utilização de indutor (metanol) tóxico e inflamável para expressão e (2) a secreção de proteases (Davy *et al.*, 2017). Apesar disso, esta levedura se tornou nas últimas décadas o sistema preferencial para expressão de proteínas heterólogas em eucariotos (Zhang, 2020).

K. phaffii é classificada como uma levedura metilotrófica, devido à capacidade de crescer em meio contendo metanol como única fonte de carbono, em razão da presença da enzima álcool oxidase (AOX1) de elevada atividade e AOX2 de menor atividade, presente nos peroxissomos do microrganismo (Sreekrishna, 2010). Neste contexto, as duas principais estratégias de expressão em *K. phaffii* empregadas atualmente se baseiam no uso do promotor fortemente induzível AOX1 (Álcool oxidase 1/ P_{AOX1}) ou promotor constitutivo GAP (gliceraldeído-3-fostato desidrogenase/ P_{GAP}). A principal vantagem com relação ao P_{GAP} é não necessitar metanol para indução, mas a quantidade de proteína gerada é inferior a P_{AOX1} (Looser *et al.*, 2015). Em contrapartida, o P_{AOX1} é um promotor forte e bem regulado, induzido por metanol e reprimido por glicose, glicerol ou etanol (Davy *et al.*, 2017). Assim, a principal vantagem do P_{AOX1} é a possibilidade de desacoplar a fase de crescimento da fase de produção, de forma que a biomassa possa ser acumulada antes da expressão proteica (Spohner *et al.*, 2015).

Com relação a transformação, a principal estratégia empregada é a integração do vetor no genoma por recombinação homóloga (Zhang, 2020). Neste caso, a inserção do cassete de expressão ocorre na região 5' P_{AOX1} , via *single crossover*, com reconstituição do P_{AOX1} , gerando o fenótipo Mut^+ . Em caso de deleção da região promotora ou do gene que expressa AOX1, a cepa passa a crescer lentamente na presença de metanol por utilizar apenas AOX2 que é menos ativa,

gerando o fenótipo Mut^S. Posteriormente, esta região pode participar de múltiplos eventos de recombinação, o que permite a ocorrência da integração de múltiplas cópias do cassete de expressão no genoma da levedura. Eventos de integração múltipla ocorrem com frequência de 1-10% em transformações de *K. phaffii* (Life Technologies, 2010), e tem reflexo quantitativo direto na resistência à Zeocina e na produção da proteína recombinante. Neste contexto, o método mais empregado para a geração de cepas contendo múltiplas cópias é baseado na utilização de placas de seleção contendo concentrações crescentes de antibióticos (ex. 100 a 2000 µg/ml de ZeocinTM) e o repique dos transformantes nas referidas placas (Life Technologies, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, mais de 300 milhões ton/ano de plástico são descartados no meio ambiente, dos quais mais de 150 milhões de toneladas se encontram flutuando no oceano. Assim, graves problemas a saúde animal e humana são causados, devido a geração de micro e nano plásticos durante o processo de degradação. Neste contexto, os polímeros biodegradáveis são uma alternativa para a substituição dos plásticos convencionais e têm ganhado espaço no mercado, como, por exemplo, na produção de sacolas plásticas, garrafas e utensílios descartáveis, bem como no uso para materiais de longa duração como próteses e fibras. Todavia, apesar dos biopolímeros serem decompostos rapidamente nas compostagens industriais, o mesmo não é observado nos ambientes naturais. O desenvolvimento de tecnologia de processamento enzimático dos plásticos biodegradáveis tem sido apontado como alternativa para melhorar os processos industriais em condições amenas, próximas das encontradas no meio ambiente. Para tanto, faz-se necessário identificar novas enzimas, bem como encontrar e compreender o papel dos determinantes estruturais responsáveis pelas características bioquímicas destas proteínas, o que permite modificá-los a fim de gerar enzimas específicas, tolerantes e aplicáveis aos processos industriais.

O PLA, PLC e PHB são os polímeros biodegradáveis mais utilizados no mercado. Nesse contexto, as cutinases são as principais enzimas estudadas na degradação de tais biopolímeros,

graças a sua capacidade de catalisar a hidrólise de ésteres de poliésteres de alta massa molecular, o que resulta em ânions de ácido carboxílicos e álcoois de baixo impacto ambiental. Cutinases têm sido identificadas em fungos filamentosos patogênicos degradadores de cutina de plantas, leveduras do gênero *Cryptococcus* e bactérias. Dada sua ampla distribuição e funcionalidade, cutinases possuem diversas aplicações biotecnológicas, podendo-se destacar: a biodegradação de polímeros, a produção de biodiesel, o uso como aditivo de detergente, bem como diversas aplicações na indústria alimentícia. Dessa forma, o desenvolvimento de tecnologia para hidrólise de polímeros biodegradáveis pelo uso de cutinases seria de grande valia para a indústria de degradação de biopolímeros.

Nesse sentido, vários trabalhos têm identificado e caracterizado novas cutinases e/ou investigado a aplicação destas enzimas na hidrólise de polímeros biodegradáveis. As principais limitações observadas para aplicação das cutinases na indústria são a sua baixa termoestabilidade e a resistência a coprodutos gerados no processo de hidrólise, como metanol. Desta forma, existe pouca tecnologia de hidrólise enzimática de biopolímeros comercial e os trabalhos apresentados na literatura não contemplam o desenvolvimento de processos resistentes à formação de álcoois como metanol. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento de processo que utilize enzimas de baixo custo e que possuam alta eficiência de degradação e estabilidade. A cutinase extracelular de *C. flavus* I-11 (CfCLE) apresenta propriedades importantes para aplicação industrial na degradação de polímeros, podendo-se destacar dentre elas a alta resistência ao metanol quando comparada à cutinase de *Cryptococcus* sp. S-2 já bem caracterizada. Nesse sentido, espera-se que a expressão de CfCLE em *K. phaffii* mantenha a capacidade da enzima nativa em degradar polímeros biodegradáveis, resistir a concentrações elevadas de metanol, além de possibilitar o estabelecimento de um processo economicamente viável para a produção desta enzima e sua aplicação industrial.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar bioquimicamente a enzima cutinase de *C. flavus I-11* produzida em sistema de expressão heterólogo de *K. phaffii*, visando a aplicação na degradação de biopolímeros.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise *in silico* e estudar por modelagem molecular a estrutura da enzima CfCLE, visando direcionar a caracterização estrutural e a produção da proteína em sistema heterólogo de expressão;
- Produzir a proteína recombinante (CfCLEr) em sistema heterólogo de *K. phaffii* e padronizar o processo de purificação da referida enzima, visando a obtenção de proteína em quantidade e qualidade adequadas para caracterização e aplicação biotecnológica;
- Caracterizar as propriedades bioquímicas (cinética enzimática em condições bióticas e abióticas diversas) da enzima CfCLEr, visando o entendimento das propriedades bioquímicas (pH, temperatura, resistência a solventes, K_m , K_{cat} , etc.) que potencializam a aplicação biotecnológica da mesma;
- Estudar o potencial de aplicação biotecnológica da CfCLEr na degradação de biopolímeros.

4 METODOLOGIA

4.1 ANÁLISE *in silico* DA SEQUÊNCIA PROTEICA DA CfCLE I-11

A sequência nucleotídica codificadora da CfCLE da cepa I-11 de *C. flavus* foi obtida por Godoi (2018), através de PCR utilizado primers baseados na sequência gênica de *Cryptococcus sp.* S-2 (Masaki *et al.*, 2005). A sequência foi traduzida utilizando a ferramenta SIXFRAME do pacote de análises de proteínas da plataforma *on line* SDSC Biology Workbench¹. Dessa forma, a sequência proteica traduzida resultante foi utilizada para buscas por sequências similares em bancos de dados BLAST/NCBI², análises de predição de estrutura secundária e para modelagem molecular.

O peptídeo sinal foi identificado através da ferramenta Signal IP do pacote de análises de proteínas da plataforma *on line* Expasy³. Consequentemente, este peptídeo foi removido para posteriores análises da proteína madura.

A estrutura secundária da sequência madura para CfCLE I-11 (GODOI, 2018) foi predita utilizando-se o servidor Psi-Pred⁴, segundo parâmetros padrões do algoritmo.

A modelagem da CfCLER, utilizando como molde a estrutura 2CZQ da cutinase-like de *Cryptococcus sp.* s-2, foi realizada por meio da ferramenta Phyre2⁵ e I-TASSER⁶. Dessa forma, o modelo gerado foi submetido à sobreposição através do programa SuperPose⁷ e análises no PyMOL.

A predição de sítios de N-glicosilações e O-glicosilação foi realizada na plataforma *on line* Expasy³, através das ferramentas NetNGlyc e YinOYang, respectivamente.

¹ Disponível em <http://workbench.sdsc.edu/>

² Disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

³ Disponível em <https://www.expasy.org/>

⁴ Disponível em <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

⁵ Disponível em <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>

⁶ Disponível em <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

⁷ Disponível em <http://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose/>

Os dados obtidos na análise em *sílico* auxiliaram no desenho do gene sintético para expressão da enzima, descrito no item 4.2.2.

4.2 PRODUÇÃO DE CFCLE RECOMBINANTE EM *K. phaffii*

4.2.1 Microrganismos e meios de cultura

Bactérias *E. coli DH5α* foram utilizadas para amplificação e armazenamento dos vetores de expressão pPICZαB-CfCLE. As células estocadas em 30% de glicerol a -80°C foram ativadas por crescimento em meio LB (*Luria Bertani*) ágar a 37°C, por 16 horas.

Leveduras *K. phaffii* (*P. pastoris* GS115) (EasySelection™ *Pichia* expression Kit - invitrogen™/Life Technologies™) foram utilizadas como hospedeiras para a expressão heteróloga da enzima CfCLER, sendo a cepa não transformada utilizada como controle negativo em todos os experimentos. As células estocadas em 30% de glicerol a -80°C foram ativadas por crescimento em meio de cultura YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*) ágar a 30°C, por 48 horas.

4.2.1.1 Meios de cultura utilizados para crescimento bacteriano

- LB (triptona 1% p/v; extrato de levedura 0,5% p/v e NaCl 1% p/v)
- LB *low salt* (triptona 1% p/v; extrato de levedura 0,5% p/v e NaCl 0,5% p/v)
- LB e LB *low salt* ágar (composição do meio líquido acrescida de ágar 1,5% p/v)

4.2.1.2 Meios de cultura utilizados para crescimento de leveduras

- YPD (extrato de levedura 2% p/v; peptona 1% p/v e glicose 2% p/v)
- YPDS (extrato de levedura 2% p/v; peptona 1% p/v, glicose 2% p/v e sorbitol 1M)
- YPD e YPDS ágar (composição do meio líquido acrescida de ágar 1,5% p/v)
- BMGH (*Buffered Minimal Glycerol*) e BMMH (*Buffered Minimal Methanol*)

(Tampão fosfato de potássio 100mM pH6,0; YNB (*Yeast Nitrogen Base*) 1,34% p/v; biotina 4x10⁻⁵% p/v; histidina 0,004% p/v; glicerol 1% p/v (BMGH) ou v/v metanol 0,5% (BMMH))

-MDH ágar (*Minimal Dextrose with histidine*) e MMH ágar (*Minimal Methanol with histidine*) (YNB 1,34% p/v; biotina 0,2% p/v; histidina 1% p/v; ágar 2% p/v; glicose 2% p/v (MDH) ou metanol 2% v/v (MMH))

- BSM (*Basal Salt Medium*) (tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14,9g/L; CaSO_4 0,93g/L; solução PTM1 4,35ml/L)

- Solução PTM1 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6,0g/L; NaI 0,08g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 65,0g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3,0g/L; ZnCl_2 20,0g/L; CoCl_2 0,5g/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2g/L; H_3BO_3 0,02g/L; Biotina 0,3g/L e H_2SO_4 5ml/L).

4.2.2 Construção do vetor pPICZ α B-CfCLE

De acordo com as análises *in silico* realizadas com a sequência de aminoácidos da CfCLE I-11, foi construída a sequência de nucleotídeos desejada para expressão heteróloga da CfCLER. A sequência codificadora da CfCLER foi obtida pela otimização dos códons para expressão em *K. phaffii* sem o peptídeo sinal. A otimização foi realizada utilizando-se a ferramenta *on line* Codon Optimization Tool[®] (IDT)⁸ e a sequência otimizada resultante foi modificada a fim de evitar a presença de: (1) códons repetidos em sequência; (2) segmentos ricos em A e/ou T; (3) segmentos ricos em G e/ou C e (4) sítios de restrição de enzimas necessárias às etapas de construção do vetor de expressão. Dessa forma, foram adicionados à sequência otimizada: (1) os sítios de restrição para as enzimas *PstI*, e *XbaI*, necessários para manipulação *in vitro* da sequência nucleotídica e (2) dois nucleotídeos (GT na porção 5' e GG na porção 3') necessários para a clonagem da sequência alvo, *in frame* com a sequência codificadora do peptídeo sinal α -mating factor (α -MF) e a cauda de poli histidinas, no vetor de expressão pPICZ α B[®] (InvitrogenTM), clonado sob controle do promotor AOX 1. Os códons otimizados foram analisados na plataforma online Graphical codon usage analyser⁹ e a sequência nucleotídica otimizada para expressão da CfCLER foi

⁸ Disponível em <https://www.idtdna.com/CodonOpt>

⁹ Disponível em <http://gcua.schoedl.de/>

sintetizada quimicamente pela empresa Genone BiotechnologiesTM, sendo clonada nos sítios de restrição *Pst*I e *Xba*I do vetor comercial de expressão pPICZαB[®] (InvitrogenTM/Life TechnologiesTM).

4.2.3 Transformação de *K. phaffii* e seleção de transformantes para expressão da CfCLEr

O vetor pPICZαB-CfCLE liofilizado contendo 15µg de DNA, foi solubilizado em 100µL de água Milli Q[®] e incubados a 70°C por 10 minutos. Posteriormente, células de *E. coli DH5α* foram transformadas com pPICZαB-CfCLE por eletroporação e recuperadas por incubação em meio LB *low salt* a 37°C, 200 rpm por 1 hora. Em seguida, as células transformadas foram plaqueadas em meio LB *low salt* ágar contendo 25µg/mL de Zeocina[®] (InvitrogenTM/Life TechnologiesTM). Os clones foram confirmados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de colônia em 35 ciclos utilizando o kit de PCR da FermentasTM, nas condições descritas na Tabela 2 e utilizando os primers da Tabela 3. Os produtos de PCR foram monitorados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

Tabela 2. Etapa das reações de PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial	95	3
Desnaturação	95	0,5
Hibridização	50	0,5
Extensão	72	1,5
Extensão final	72	15
Temperatura de manutenção	4	∞

Tabela 3. Primers e localização de anelamento no vetor pPICZαB-CfCLE

Primers	Local de anelamento (pb)	Sequência
5' AOX F	855 a 875	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
α-MF F	1147 a 1164	5'-TATTGCCAGCATTGCTGC-3'
CfCLE EXT F	1213 a 1229	5'-TGCCCCAACTCCAGAAC-3'
CfCLE EXT R	1859 a 1875	5'-CCAGCAGATCCACCCAA-3'
CfCLE INT F	1331 a 1353	5'-TCCGGTTTCAGAACTATGAAGTC-3'
CfCLE INT R	1555 a 1573	5'-GAAGGCAGCACCAGAAGTA-3'
3' AOX R	2031 a 2051	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

Posteriormente os transformantes foram inoculados em meio LB *low salt*, contendo 25µg/mL de Zeocina[®] e incubados a 37°C com rotação 200 rpm por 16 horas para extração de DNA plasmidial e estoque de células a -80°C. A qualidade das extrações de DNA plasmidial foi monitorada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e os produtos destas extrações foram quantificados em Nanodrop[®].

A fim de certificar que a sequência codificadora da CfCLer estava em fase com o α -MF e a cauda de histidinas, foi realizada extração de DNA plasmidial seguida do sequenciamento do plasmídeo. Para a extração de DNA plasmidial foi utilizado o kit PureYield™ Plasmid *Miniprep* System (Promega-Ref:A1222) seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do produto de extração foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e quantificada em Nanodrop[®]. Consequentemente, alíquotas foram encaminhadas para empresa Milleus™ para sequenciamento Sanger do plasmídeo, utilizando primers diretos 5' AOX F, α -MF F e o primer reverso 3' AOX R (Tabela 3). As sequências nucleotídicas resultantes do sequenciamento foram verificadas e apuradas manualmente, seguido de alinhamento no BLAST/NCBI² com a sequência de nucleotídeos pPICZ α B-CfCLE fornecida pela empresa Genone Biotechnologies™.

O vetor pPICZ α B-CfCLE, propagado em *E. coli DH5 α* , foi extraído utilizando o kit Wizard[®] Plus Maxipreps DNA Purification System (PROMEGA), seguindo as recomendações do fabricante. O produto da extração foi submetido à reação de linearização com a enzima *SacI* (Fermentas™/Life Technologies™) por incubação a 37°C por 1,5 horas. O produto da linearização foi purificado conforme as recomendações do EasySelect™ Pichia Expression Kit. Na sequência, o produto da purificação foi dosado em Nanodrop[®] e diluído para concentração de 10µg/µL, sendo utilizado para transformação de *K. phaffii* por eletroporação, segundo as recomendações do EasySelect™ Pichia Expression Kit. As células submetidas à eletroporação foram recuperadas por incubação a 30°C por 1-2 hora em 1 mL sorbitol 1M ou 1mL YPD e plaqueadas em meio YPDS ágar contendo 100µg/mL de Zeocina[®]. As placas foram incubadas a 28°C por 3-10 dias e os

recombinantes resultantes foram transferidas para placas de meio YPD ágar contendo 100µg/mL de Zeocina[®].

4.2.3.1 Extração de DNA genômico e PCR de DNA genômico

As colônias foram consideradas putativos recombinantes e investigadas quanto à presença do cassete de expressão integrado no genoma via *PCR de DNA genômico*, com o uso de dois pares de *primers*: 5' AOX F e CfCLE INT R; α-MF F e 3' AOX R (Tabela 3), os quais amplificavam desde o promotor até a porção 3' da cauda de histidina. A extração de DNA genômico foi realizada através de cultivo de recombinantes isoladas em YPD a 30°C, 250 rpm por 24 horas, seguido de centrifugação. Em seguida, o *pellet* foi diluído em tampão de extração (2% v/v Triton X100; 10% p/v SDS; 10% v/v NaCl 1M; 10% v/v Tris-HCl 1M pH 8,0; 0,2% v/v EDTA 0,5M pH 8,0), transferido para micro tubo contendo *beads* (0,3g) e fenol:clorofórmio (1:1), seguido de mistura em vortex. Logo depois, a fase superior foi coletada, tratada com RNase (20mg/mL a 37°C por 30 min), seguida de adição de clorofórmio, mistura em vortex e coleta da nova fase superior. Após isso, o DNA genômico foi precipitado com 1/10 de volume de acetato de potássio 5M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Depois, o precipitado foi lavado com álcool 70%, centrifugado e solubilizado em água Milli Q. Em seguida, a *PCR* foi realizada utilizando o kit da FermentasTM, conforme as condições da Tabela 2. A qualidade da extração de DNA genômico e o resultado da *PCR* foram monitorados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e quantificados.

4.2.3.2 Propagação de recombinantes por plaqueamento em concentrações crescentes de antibiótico

Os recombinantes de *K. phaffii* com presença do cassete de expressão confirmadas via *PCR* foram replicadas, sequencialmente, em placas de meio YPD ágar contendo concentrações crescentes de Zeocina[®] (100, 500 1000 e 2000µg/mL), incubadas a 28°C por 48 horas. Com intuito de promover novas recombinações e selecionar recombinantes com múltiplas cópias do gene de interesse, promovendo uma maior expressão da enzima, conforme descrito no

manual da EasySelection™ *Pichia* expression Kit (Invitrogen™/Life Technologies™). Nesse contexto, os recombinantes crescidos em diferentes concentrações de Zeocina® foram tratadas como cepas diferentes.

4.2.3.3 *Predição de fenótipo por plaqueamento em metanol*

O fenótipo Mut⁺ ou Mut^S dos recombinantes de *K. phaffii* foi investigado em placas MDH e MMH, as quais foram incubadas a 28°C por 48 horas. Recombinantes capazes de crescer apenas em meio MDH foram consideradas Mut^S, enquanto recombinantes capazes de crescer em meio MDH e MMH foram consideradas Mut⁺, conforme descrito no EasySelect™ *Pichia* Expression Kit.

4.2.3.4 *Seleção de recombinantes em deep wells*

Os recombinantes crescidos em meio contendo 100, 500, 1000 ou 2000µg/mL de Zeocina® foram tratadas como cepas diferentes e investigadas quanto ao potencial de expressão da CfCLer funcional. Para tanto, as células de *K. phaffii* recombinantes e cepa controle, foram cultivadas por 16 horas em 3 mL de meio BMGH e inoculadas em placas *deep wells* de 10 mL contendo 3 mL de meio indutor BMMH em *optical density* a 600nm (OD₆₀₀) inicial de 1,0, sendo incubadas a 28°C, 250 rpm por 120 horas. Ao mesmo tempo, a expressão da enzima de interesse foi induzida por adição de metanol (0,5% v/v) às culturas a cada 24 horas e o crescimento acompanhado através da OD₆₀₀. Com isso, alíquotas dos sobrenadantes de cultura, obtidas por centrifugação a 9.600 xg por 5 minutos, foram submetidas a ensaio de atividade enzimática, quantificação de proteínas totais e eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (p/v).

4.2.4 **Ensaio de atividade hidrolítica sobre o substrato pNPB**

Para cada teste, 25 mM de *p*-nitrofenol-butirato (pNPB) diluído em isopropanol 100% foram gotejados lentamente, sob agitação em vortex, em solução tampão (0,02% p/v goma arábica, 0,04% p/v ácido deoxicólico de sódio, 0,1% v/v triton X100, tampão fosfato 50 mM pH 7) em proporção de 1:10. Posteriormente, foram aplicados sobre a placa de 96 poços 5 µL de diluições

das alíquotas coletadas anteriormente e 95µL da mistura reacional, seguido de incubação em leitora de placa de 96 poços a 37°C, com leitura cíclica no comprimento de onda 405 nm a cada 10 segundos, até completar 10 minutos. Amostras com enzimas inativadas por fervura a 100°C por 20 minutos foram utilizadas como controle negativo. O produto *p*-nitrofenol (pNP) foi utilizado como padrão para construção da curva de calibração (0,20µmol-0,01µmol). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que é requerida para liberar 1 µmol de pNP por minuto a partir de uma solução de pNPB 2,5 mM, a 37°C e pH 7,0.

4.2.5 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada através do método de Bradford, utilizando o reagente Protein Assay Dye Concentrate (Bio-Rad) segundo instruções do fabricante. Para tanto, foram aplicados sobre placa de 96 poços, 80 µL de diluições das alíquotas coletadas e 20 µL do reagente concentrado, seguido de incubação em leitora de placa a 37°C, agitação por 5 min e leitura à 595 nm. Utilizou-se como padrão a albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*, BSA) para construção da curva de calibração na faixa de 1,00 a 0,01 mg/mL.

4.2.6 Seleção de recombinantes por expressão de CfCLer em escala de bancada utilizando *shaker*

Com o intuito de selecionar o melhor recombinante para escalonamento da produção heteróloga da enzima CfCLer ativa, foram realizados testes de expressão com os recombinantes de *K. phaffi* que apresentaram maiores valores de atividade no sobrenadante de cultura em 50 mL de meio BMMH. Para cada teste, os recombinantes foram induzidos em intervalos de 24 horas com quantidades de metanol variando de 0,5-2% a cada ensaio. A fim de reduzir o número de recombinantes pela metade a cada teste e selecionar as mais resistentes ao metanol e que conservaram os valores de atividade enzimática, quantidade de proteína total e taxa de crescimento.

4.2.7 Produção e purificação de CfCLER em escala de bancada (400 mL) utilizando *shaker*

O recombinante de *K. phaffi* selecionado foi pré-cultivado em 50 mL (Erlenmeyer de 250 mL) de meio BMGH a 28 °C, 250 rpm por 16 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2.500 xg, por 5 minutos, a 4 °C, com o sobrenadante descartado e as células solubilizadas em 400 mL de meio indutor BMMH (Erlenmeyer de 2 L) em quantidade suficiente para OD₆₀₀ inicial igual a 1,0. Durante 96 horas de indução em meio BMMH (28 °C, 250 rpm), foi adicionado metanol (1,5% v/v) a cada intervalo de 24 horas, ao mesmo tempo que foram retiradas alíquotas das culturas para medida do crescimento celular e atividade enzimática, concentração total de proteínas e análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (p/v) do sobrenadante de cultura. Os ensaios foram conduzidos com três repetições.

4.2.8 Produção de CfCLER em Biorreator

A estratégia de cultivo para produção da CfCLER para o recombinante selecionado foi conduzida em modo de batelada alimentada, utilizando controles de temperatura (28 °C), pH 5,0 (por meio da adição controlada de NH₄OH) e oxigênio dissolvido (20-30 % de saturação - controle conjugado em cascata da velocidade de agitação e taxa de entrada de ar). A estratégia foi conduzida em biorreator 2L controlado pela torre Biostat[®] B-DCU e monitorado pelo analisador de gases BioPTA[®] Xgas (Sartorius Stedim[™]).

A estratégia de produção em biorreator foi executada tomando por base o trabalho de Wanderley e colaboradores (2013). Para tanto, o recombinante selecionado foi pré-cultivado em 100 mL (Erlenmeyer de 500 mL) de meio YPD, suplementado com biotina (4x10⁻⁵% p/v) e histidina (0,004% p/v), a 28 °C, 250 rpm por 48 horas em *shaker*. O cultivo foi utilizado para inóculo em 700 mL de meio BMGH pH 5,0 com 40 g/L de glicerol, no biorreator (OD₆₀₀ inicial igual a 1,0). Posteriormente, o cultivo foi conduzido em modo de batelada (fase I), sem alimentação até a estabilização do crescimento da cultura (esgotamento do glicerol), seguido pelo

esgotamento do glicerol (fase II) o qual foi observado pelo aumento súbito na concentração de oxigênio dissolvido e manutenção da OD₆₀₀ da cultura. Em seguida, a cultura foi alimentada com glicerol a 2,1 mL/h (Fase III). Sequencialmente, foi acompanhado o esgotamento do glicerol (fase IV), o qual foi observado pelo aumento súbito na concentração de oxigênio. A cultura foi alimentada com metanol 100% (v/v) (suplementado com 12 mL/L de solução PTM e 4x10⁻⁵% p/v de biotina), a uma taxa fixa de 2,1 mL/h. Esta fase (IV) constitui a fase de transição entre o metabolismo de glicerol e metanol. Em seguida, foi acompanhado de esgotamento do metanol para que o mesmo não fosse acumulado na dorna evitando toxicidade para as células, o qual foi observado pelo aumento súbito na concentração de oxigênio. Desta forma, esta fase (V) constitui uma etapa de segurança para evitar o acúmulo de metanol, que é tóxico para as células. Em seguida, nas fases de indução (VI), a cultura foi alimentada com metanol 100% (v/v) (suplementado com 12 mL/L de solução PTM1 e 4x10⁻⁵% p/v de biotina) em taxas variadas de fluxo de metanol, sendo reguladas manualmente diante da produção de dióxido de carbono e da taxa de rotação e aeração. Além disso, durante todo o processo de produção em biorreator, alíquotas foram retiradas da cultura para quantificação do crescimento celular em massa seca de células, através de centrifugação, secagem em estufa e pesadas em tubos plásticos, previamente pesados quando vazios. Além da análise do sobrenadante para atividade enzimática sobre o substrato pNPB, concentração total de proteínas e eletroforese em gel.

Na estratégia de produção melhorada a fase II e III de alimentação e esgotamento do glicerol (*feed bath*) foram excluídas. Além disso, o vapor de metanol eliminado durante a fase de alimentação foi monitorado utilizando um sensor de gás da série MQ implementado por Lobato (2022).

4.2.9 Purificações

4.2.9.1 Purificação em coluna de afinidade

O processo de purificação da CfCL_{Er} foi padronizado neste trabalho e constitui-se das seguintes etapas: (1) centrifugação (10.000 $\times g$ por 10 minutos à 4°C) para recuperação do sobrenadante; (2) correção do pH do sobrenadante para 7,0; (3) filtração do sobrenadante em membrana de 0,45 μm ; (4) concentração em filtração tangencial Viva-flow® 10 kDa MWCO (GE Healthcare Life Sciences); (5) cromatografia de afinidade ao níquel (AF); (6) concentração, por meio de ultrafiltração, do *pool* de frações obtidas da AF até 3% do volume da coluna de *dessalting*; (7) cromatografia de *dessalting* (DS). Inicialmente, o concentrado de proteínas resultante da etapa (4) foi submetido à AF, em sistema Akta Pure (caminho óptico igual a 10 mm) (GE Healthcare Life Sciences), constituída das seguintes etapas: (5.1) carregamento da amostra em coluna HisTrap™ HP saturada (5 mL) (GE Healthcare Life Sciences) pré-equilibrada com tampão A (20 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,4 e 500 mM de NaCl); (5.2) gradiente de eluição em imidazol com passagem de 25 mL (cinco volumes de coluna) de tampão B (20 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,4, 500 mM de NaCl e 500 mM de Imidazol (Sigma-Aldrich)) com fracionamento de amostras eluídas (frações de 1,8 mL) e fluxo de 5 mL/minuto; (5.3) lavagem da coluna com 25 mL de tampão A. Na sequência, as frações obtidas da AF foram separadas em *pools* de acordo com os perfis cromatográficos de concentração de proteínas e atividade enzimática. Posteriormente, os *pools*, foram concentrados por ultrafiltração em Vivaspin® 10 kDa MWCO (GE Healthcare Life Sciences) até volume máximo de 4,5 mL. As amostras concentradas foram submetidas a cromatografia de gel filtração específica para remoção de sais, aplicando-as em coluna HiPrep™ 26/10 *Dessalting* (GE Healthcare), previamente equilibrada com 240 mL tampão (50 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0 e 50 mM NaCl) e a cromatografia foi conduzida a fluxo de 1 mL/minuto em sistema Akta Pure®.

4.2.9.2 Purificação em coluna de troca catiônica

O processo de purificação da CfCLER foi padronizado neste trabalho e constitui das seguintes etapas: (1) centrifugação (10.000 $\times g$ por 10 minutos à 4 °C) para recuperação do sobrenadante; (2) filtração do sobrenadante em membrana de 0,45 μm ; (3) concentração em Viva-flow® 10 kDa MWCO; (4) correção da salinidade e do pH para 3,6 por diluição do concentrado em 1 L de tampão acetato 50mM; (5) concentração em Viva-flow® 10 kDa MWCO (6) cromatografia de troca catiônica; (7) concentração, por meio de ultrafiltração, do *pool* de frações obtidas da troca catiônica até 3% do volume da coluna de *dessalting*; (8) cromatografia de *dessalting* (DS) ou Gel Filtração (GF). Inicialmente, o concentrado foi submetido a cromatografia de troca de catiônica em coluna Capto S (GE Healthcare Life Sciences), em sistema Akta Pure® (caminho óptico igual a 10 mm) (GE Healthcare Life Sciences), constituída das seguintes etapas: (6.1) carregamento da amostra em coluna HiScreen™ Capto™ S 5mL (GE Healthcare Life Sciences) pré-equilibrada com tampão A (50 mM de tampão acetato pH 3,6); (6.2) gradiente de eluição com passagem de 25mL (cinco volumes de coluna) de tampão B (50 mM de tampão acetato pH 3,6 e 1 M NaCl) com fracionamento de amostras eludas (frações de 1,8 mL) a fluxo de 5 mL/minuto; (6.3) lavagem da coluna com 25 mL de tampão A. As frações obtidas da troca catiônica foram separadas em *pools* de acordo com os perfis cromatográficos de concentração de proteínas, atividade enzimática e submetidos à cromatografia *Dessalting* como descrito anteriormente ou por Gel filtração, no qual as amostras concentradas foram submetidas a cromatografia de gel filtração, aplicando-as em coluna HiLoad 16/60 Superdex 200 *prepgrade* (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão (50 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0 e 50 mM NaCl) e a cromatografia foi conduzida a fluxo de 1 mL/minuto em sistema Akta Pure®.

4.2.10 Western Blot

Com o objetivo de analisar o processo de purificação da proteína recombinante, foram realizadas análises por eletroforese em SDS-PAGE e análises de *Western Blot*. Assim, foi utilizada a técnica adaptada de Towbin e colaboradores (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Inicialmente, após a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE 15%, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm (BioRad®) utilizando o sistema de transferência Mini-PROTEAN (BioRad®). Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5% (m/v) de leite desnatado em solução salina tamponada (20 mM tris pH 7,4 e 200 mM NaCl–TBS) com 0,5% (v/v) Tween-20 (Sigma- Aldrich®) (TBS-T) por 1 hora. Após três lavagens com tampão TBS-T, a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo específico anti-histidina (Sigma®, St. Louis, USA) diluído 1:3.000 em TBS-caseína 0,25% (v/v). Posteriormente, foram executadas três lavagens com TBS-T, adicionando o anticorpo secundário anti-imunoglobulina conjugado com peroxidase (Anti-mouse IgG – whole molecule – peroxidase conjugate, Sigma®, St. Louis, USA) na diluição de 1:5.000 em TBS-caseína 0,25% (v/v) e incubado por 1 h. Em seguida, as bandas foram reveladas por reação de quimioluminescência com ECL Plus (GE Healthcare®).

4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Os ensaios apresentados a seguir foram realizados para analisar o produto da expressão heteróloga e caracterizar suas propriedades bioquímicas de interesse biotecnológico.

4.3.1 Espectrometria de massa

Com o intuito de identificar as proteínas obtidas pelos procedimentos descritos neste trabalho, as amostras foram submetidas a análise por espectrometria de massa.

A identificação da massa total das proteínas foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF. Assim, amostras de 1 mg/mL do produto de purificação foram submetidas à etapa de dessalinização por Zip-Tip, na qual ponteiros zip-tip foram lavadas com solução de Acetonitrila (ACN) 75%/Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,1%, seguido de lavagem com TFA 0,1%.

Posteriormente, as amostras foram adsorvidas na ponteira zip-tip, dessalinizadas com TFA 1% e eluidas com ACN 80%. Em seguida, o produto da eluição foi aplicado em placa AnchorChip com as matrizes α -ciano-4-hidrocinâmico, ácido sinapínico ou ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB), em diferentes proporções. Após a secagem da gota, adquiriram-se os espectros de massa total no equipamento Autoflex III (Bruker) com os programas Linear Positivo ProtMix com detector ajustado para 5.000-30.000 Da (LP_ProtMix) e Linear Positivo de 66 kDa (LP_66kDa).

A identificação dos peptídeos foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF LIFT por sequenciamento de peptídeos. Após eletroforese as bandas foram extraídas com o auxílio de um bisturi, transferidos para um tubo plástico. Posteriormente, realizou-se o processo de descorar a amostra com solução de acetonitrila 50%/bicarbonato de amônia 25 mM, pH 8,0. Em seguida, o gel foi desidratado com ACN 100% até ficar opaco. Na sequência, a ACN foi removida por centrifugação a vácuo em SpedVac. Posteriormente, os grupos tióis foram reduzidos com ditioneitol (DTT) 10 mM/bicarbonato de amônio 25 mM (pH8,0). Em seguida, foi acrescida de solução de iodoacetamida 55 mM para alquilação dos grupos tióis, protegido da luz. Na sequência, o gel foi lavado e acrescido de 20 ng/ μ L de tripsina (Promega cat#V511) diluídos em bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados ao gel e conservados no gelo. Posteriormente, o excesso de enzima foi removido e adicionado bicarbonato de amônio 50 mM. Assim, a reação foi realizada em banho seco à 37 °C por 24 horas. Depois, o sobrenadante contendo peptídeos foi recolhido e os demais peptídeos foram extraídos com ácido fórmico 5%/ACN 50% em agitação constante em vortex por 30 minutos. Em seguida, foi realizado o procedimento de dessalinização por Zip-tip e aplicação da amostra em placa AnchorChip com as matrizes α -ciano-4-hidrocinâmico como descrito anteriormente. Posteriormente, adquiriu-se os espectros de massas por MALDI-TOF/TOF LIFT em Autoflex III (Bruker) com os programas Refletido Positivo PepMix com detector ajustado para 500-4.000 Da (RP_PepMix), realizando a predição por Mascot e identificação dos peptídeos tripticos pelo sequenciamento DeNovo no programa PepSeq.

4.3.2 Avaliação de glicosilações

Para certificar-se de que a enzima estava livre de glicosilações foram realizados ensaios de deglicosilação e coloração diferencial de gel com fuccina. Inicialmente, para avaliar N-glicosilações, amostra purificada de CfCLER foi incubada com Endo H_f (New England Biolabs, Massachusetts, USA) à 37 °C por 16 horas em condição não desnaturante conforme recomendações do fabricante. A enzima livre de Endo H_f foi utilizada como controle negativo. Posteriormente, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel.

Para avaliar O-glicosilações foi realizado o método de Faribanks, Steck e Wallach (1971). Para tanto, foi preparado o reagente de Shiff diluindo fuccina em água, acrescido de ácido clorídrico 1 M e metabissulfito de sódio 0,68% (p/v). Posteriormente, uma amostra de CfCLER purificada e concentrada foi submetida a eletroforese em gel SDS-PAGE gradiente 12-15%, sendo fixada com ácido acético/metanol e água (10:35:55). Em seguida, o SDS foi removido com solução de ácido periódico (0,7% p/v) e solução de metabissulfito de sódio (0,2% p/v), seguido de coloração com reagente de Shiff que marca de rosa as proteínas glicosiladas.

4.3.3 Atividade residual de armazenamento

Com intuito de verificar a conservação da atividade enzimática ao longo do tempo, a enzima foi mantida em duas condições de armazenamento (4°C e temperatura ambiente ~25°C) durante 3 meses. Ao fim de cada semana a atividade enzimática residual foi mensurada com pNPB como descrito anteriormente.

4.3.4 Determinação da temperatura de atuação da enzima

Foram realizados ensaios para determinar a temperatura de atuação da enzima. Neste sentido, a enzima foi diluída para 2µM em tampão fosfato 100mM (pH 7,0) e incubada por 10 minutos em termociclador em diferentes temperaturas, na presença do substrato para-nitrofenil butirato (pNPB) 2mM. As reações foram interrompidas em intervalos de 10 segundos utilizando 100µL de Bicarbonato de sódio 100mM. O produto formado foi mensurado e a atividade

enzimática foi calculada conforme descrito em 4.2.4. Os resultados foram comparados estatisticamente conforme descrito em 4.6.

4.3.5 Determinação da termoestabilidade

Foi avaliado a atividade residual da enzima quando exposta a diferentes temperaturas. Para isso, a enzima foi diluída a uma concentração de 2 μ M em tampão fosfato 100mM (pH 7,0), incubada em termociclador em intervalos de tempo específicos (0, 10 e 30 minutos, 1, 2 e 4 horas). Posteriormente a enzima foi submetida a um ensaio de atividade enzimático à 37°C descrito em 4.2.4, sendo avaliado a atividade residual da enzima. Os resultados foram comparados estatisticamente conforme descrito em 4.6.

4.3.6 Determinação do pH de atuação da enzima

Foram realizados ensaios para determinar o pH de atuação da enzima. Para este propósito, a enzima foi diluída a uma concentração de 2 μ M em diferentes tampões, variando o pH (Tampão McIlvaine 100mM pH 2,0-8,0; Tampão Borato 100mM pH 7,5-10,0; Tampão CAPS pH 9,5-11,5). Em seguida, a solução foi incubada por 10 minutos em termociclador na presença do substrato para-nitrofenil butirato (pNPB) 2mM no pH do tampão avaliado. As reações foram interrompidas utilizando 100 μ L de Bicarbonato de sódio 100mM. O produto formado foi mensurado e atividade enzimática foi calculada conforme descrito em 4.2.4. Os resultados foram comparados estatisticamente conforme descrito em 4.6.

4.3.7 Determinação da atividade residual em diferentes pHs

Foi avaliado a atividade residual da enzima quando exposta a diferentes pHs. Neste sentido, a enzima foi diluída a uma concentração de 2 μ M em diferentes tampões variando o pH (Tampão McIlvaine 100mM pH 2,0-8,0; Tampão Borato 100mM pH 7,5-10,0; Tampão CAPS pH 9,5-11,5). Em seguida, a solução foi incubada em termociclador em intervalos de tempo específicos (0, 10 e 30 minutos, 1, 2 e 4 horas). Posteriormente a enzima foi submetida a um

ensaio de atividade enzimática à 37°C descrito em 4.2.4, sendo avaliado a atividade residual da enzima. Os resultados foram comparados estatisticamente conforme descrito em 4.6.

4.3.8 Atividade residual na presença de Solventes Orgânicos

Foi avaliado a atividade residual da enzima quando exposta a diferentes solventes orgânicos (Metanol, Etanol, Butanol, Isopropanol, Acetona, Hexano, Clorofórmio e DMSO). Para isso, a enzima foi diluída a uma concentração de 2 μ M em tampão fosfato 100mM (pH 7,0) contendo concentrações de solventes orgânicos variando de 0-90%. Em seguida, a solução foi incubada por 10 minutos em termociclador na presença do substrato para-nitrofenil butirato (pNPB) 2mM. As reações foram interrompidas em intervalos de 10 segundos utilizando 100 μ L de Bicarbonato de sódio 100mM. O produto formado foi mensurado e atividade enzimática foi calculada conforme descrito em 4.2.4. Os resultados foram comparados estatisticamente conforme descrito em 4.6.

4.3.9 Atividade residual na presença de Surfactantes

Foi avaliado a atividade residual da enzima quando exposta a diferentes surfactantes (Dodecil sulfato de sódio - SDS, ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA, fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF, Tween 20, Tween 80, Triton X100, ditioneitol - DTT, Beta-mercaptanol). Para tal, a enzima foi diluída a uma concentração de 2 μ M em tampão fosfato 100mM (pH 7,0) contendo surfactantes em concentrações de 1-10mM. Em seguida, a solução foi incubando por 10 minutos em termociclador na presença do substrato para-nitrofenil butirato (pNPB) 2mM. As reações foram interrompidas em intervalos de 10 segundos utilizando 100 μ L de Bicarbonato de sódio 100mM. O produto formado foi mensurado e atividade enzimática foi calculada conforme descrito em 4.2.4. Os resultados foram comparados estatisticamente conforme descrito em 4.6.

4.3.10 Atividade residual na presença de íons metálicos

Foi avaliado a atividade residual da enzima quando exposta a diferentes íons metálicos (Cloreto de Bário (BaCl_2), Cloreto de Cálcio (CaCl_2), Cloreto de Cobalto (CoCl_2), Cloreto de Cobre (CuCl_2), Cloreto de Ferro (FeCl_3), Cloreto de Potássio (KCl), Cloreto de Magnésio (MgCl_2), Cloreto de Sódio (NaCl), Cloreto de Níquel (NiCl_2), Sulfato de Cobalto (CoSO_4), Sulfato de Cobre (CuSO_4), Sulfato de Ferro (FeSO_4), Sulfato de Magnésio (MgSO_4), Sulfato de Manganês (MnSO_4), Sulfato de Níquel (NiSO_4), Sulfato de Zinco (ZnSO_4)). Neste sentido, a enzima foi diluída à concentração de $2\mu\text{M}$ em tampão fosfato 100mM ($\text{pH } 7,0$) contendo íons metálicos em concentrações de $1\text{-}10\text{mM}$. Em seguida, a solução foi incubada por 10 minutos em termociclador na presença do substrato para-nitrofenil butirato (pNPB) 2mM . As reações foram interrompidas em intervalos de 10 segundos utilizando $100\mu\text{L}$ de Bicarbonato de sódio 100mM . O produto formado foi mensurado e atividade enzimática foi calculada conforme descrito em 4.2.4. Os resultados foram comparados estatisticamente conforme descrito em 4.6.

4.3.11 Avaliação da degradação de cutina

A cutina de maçã foi extraída utilizando a metodologia de Sebastian et al (1987). Os frutos foram fervidos em água antes de serem descascados. Em seguida, as cascas de maçã foram fervidas com uma solução aquosa de ácido oxálico (4g/L) e oxalato de amônio (16g/L) para remoção da polpa. Posteriormente, a cutícula foi fisicamente separada da mistura passando por um pano de nylon e extraída com Cloroformio-Metanol ($2\text{:}1\text{,v/v}$) durante a noite. Em seguida, as folhas de cutina foram então extraídas com cloroformio por 24h, secas e tratadas com uma solução de celulase de *Aspergillus niger* (5g/L) e pectinase fúngica (Sigma Chemical Co.) (1g/L) em tampão de acetato 50mM $\text{pH } 4$ a 30°C durante 14 horas. As folhas de cutina brutas foram recuperadas por filtração e foram cuidadosamente lavadas com água. A extração com solvente seguida de digestão enzimática foi repetida duas vezes.

As folhas de cutina extraídas foram trituradas e fundidas em ágar bacteriológico (2%) com corante vermelho fenol 41g/L, um indicador de pH. Posteriormente, a cutina fundida em ágar foi exposta a cutinase de *C. flavus* e incubado em a 30°C por 24 horas. A hidrólise da cutina foi observada a partir da formação de um halo de coloração amarela, indicando o aumento de acidez devido a liberação de íons H^+ da reação enzimática.

4.3.12 Especificidade de Substratos

A especificidade de substratos foi realizada através da determinação da atividade enzimática em diferentes substratos sintéticos para-nitrofenil: Acetato (pNPA-2C – N20204 Sigma-Aldrich), Butirato (pNPB-4C – N9876 Sigma-Aldrich), Caprilato (pNPC-8C – 21742 Sigma-Aldrich), Laurato (pNPL-12C – 61716 Sigma-Aldrich), Miristrato (pNPM-14C – 70124 Sigma-Aldrich) e Palmitato (pNPP-16C – N2752 Sigma-Aldrich). A atividade relativa foi determinada para comparação entre os produtos.

A degradação de triglicerídeos Tributirina (C4 – W222322 Sigma-Aldrich), Trioctanoatina (C8 – 617121 Sigma-Aldrich) e Tripalmitina (C16 – NIST1595 Sigma-Aldrich) foi determinada pela titulação dos ácidos graxos liberados utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 10 mM. A degradação dos triglicerídeos ocorreu em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) contendo 0,1% (v/v) de Triton X-100 e 0,1% (p/v) de goma arábica a 30°C por 10 min. As concentrações do substrato foram todas ajustadas para 10 mM e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que exigia a liberação de 1 mol de ácido graxo por minuto nas condições de ensaio acima.

4.4 ESTUDOS DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ foram estimados para a catálise dos substratos sintéticos para-nitrofenil: Acetato (pNPA-2C), Butirato (pNPB-4C), Caprilato (pNPC-8C), Laurato (pNPL-12C), Miristrato (pNPM-14C) e Palmitato (pNPP-16C) em concentrações de 75, 150, 300, 600, 1200, 1800 e 3000 μM , usando 7 pontos em triplicata segundo as equações

de regressão linear (1) e modelo de Michaelis-Menten. Para tanto, as equações foram ajustadas para velocidade inicial de reação V_0 (mM/min) em função da concentração inicial do substrato (S_0) utilizando-se o Software GraphPad Prisma. A concentração de enzima $[E]$ utilizada em todos estes ensaios foi igual a 2,0 μ M, de modo a garantir a condição de $[E] \ll S_0$, necessária para estimativa dos parâmetros cinéticos pelo modelo de Michaelis-Menten. Todas as reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 a 30°C. Os parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ (mM/min), K_m (mM), K_{cat} (min⁻¹) e K_{cat}/K_m , foram obtidos a partir do ajuste de uma série de equações não-lineares, utilizando-se o modelo de Michaelis-Menten.

$$(1) \quad v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}.$$

4.5 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

4.5.1 Hidrólise de PLA, PCL e PHB

Para avaliar o potencial de CfCL_{Er} na degradação de biopolímeros utilizados na fabricação de plásticos biodegradáveis foram realizados ensaios baseados em Masaki e colaboradores (2005), Ramsay e colaboradores (1994), Kim, Nam e Rhee (2002). Para tanto, foram preparadas as suspensões dos polímeros, através da dissolução de 20 mg dos polímeros polihidróxido butirato (PHB) (363502-10G – Sigma Aldrich), ácido polilático (PLA) (440752-5G – Sigma Aldrich) e polímero de caprolactona (PLC) (8534-1G – Sigma Aldrich) separadamente em 10 mL de diclorometano com agitação por vortex por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 25 mL de água Milli-Q por lento gotejamento e contínua agitação para formação da mistura sem precipitação dos polímeros. Posteriormente, a mistura foi levada ao sonificador e submetida a pulsos de 30 segundos (de 40W) até completa homogeneização (3-10 minutos). Depois, o solvente foi removido por rotaevaporação à 50 °C por 1 hora.

Em seguida, em placa de 96 poços, as suspensões foram diluídas 1:1 com tampão fosfato 200 mM pH 7,0 para concentração final de 0,04% (m/v) e adicionadas amostras purificadas de

CfCLER para uma concentração final de 100 µg/mL de proteína em cada replicata. Posteriormente, a redução da turbidez da suspensão de polímeros foi monitorada incubando as placas de 96 poços à 37 °C, sob agitação e coletando leituras de absorbância nos comprimentos de onda 650nm para PLC, PHB e 580nm para PLA a cada 5 minutos por 2 horas. Amostras de enzima inativadas por fervura à 100 °C por 20 minutos foram utilizadas como controle negativo.

4.5.2 Hidrólise de filme PET

Para avaliar o potencial de degradação de polietileno tereftalato (PET), folhas de PET de 0,25mm de espessura (GF25214475-2EA-Sigma) foram lavadas com 1 L de etanol a 20% (v/v) por 10 min, seguido de 1 L de água MilliQ por 10 min e depois secas a 35°C por 24 h. As folhas secas foram cortadas com tesoura autoclavada em fragmentos de 10mm² e submersos em tampão fosfato 100mM (pH 7,0) contendo 2µM de CfCLER. Enquanto no controle negativo, os fragmentos foram submersos apenas em tampão. A digestão foi realizada à 30°C, com agitação de 150rpm por 120 horas. A reação foi encerrada por inativação enzimática por aquecimento a 85°C por 15 minutos. Os filmes tratados foram enxaguados com 1% (v/v) SDS, seguido de água MiliQ, e depois etanol e deixados em uma incubadora a 37 ° C para secar durante 18 horas.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) foi realizada usando um instrumento FEI Quanta 400 FEG sob baixo vácuo (0,45 torr) operando com um detector de estado sólido gasoso. A imagem foi realizada com uma voltagem de aceleração de feixe de 15 keV revestidos por sputter em ouro para fornecer boa condutividade do feixe de elétrons. Foi utilizada uma tensão de 25 kV e uma corrente de sonda de 90 µA. Os filmes foram revestidos com uma camada de 6 nm de ouro/paládio (Au/Pd) e analisados usando um instrumento de Microscopia Eletrônica de Campo Hitachi SU6600 (FESEM) empregado em uma aceleração de tensão de 5,0 kV, com distância de trabalho de 7,1 mm e corrente de feixe de 17µA.

Possibilitando a comparação entre o filme tratado e o não tratado, buscando por orifícios e fissuras.

4.5.3 Atividade residual em detergentes de lavar roupa

Para determinar a aplicabilidade da enzima na remoção de gorduras em detergentes de lavar roupas, foi realizada a avaliação da atividade residual após tratamento com detergentes baseado em Garcial *et al.* (2017). Os detergentes líquidos avaliados foram Ariel, OMO sabão líquido, UAU e foram diluídos 100 vezes para simular as condições de lavagem. Os detergentes sólidos avaliados foram Brilhante, OMO e foram diluídos com água Mili Q em uma concentração final de 5 mg/L para simular as condições de lavagem. No caso de detergentes biológicos (OMO), as enzimas contidas foram inativadas por aquecimento por 30 minutos a 80°C antes da adição da enzima. A cutinase purificada foi diluída a concentração de 2µM na solução de detergente comercial e incubada por 1 h a 30°C. Então, a atividade enzimática residual foi determinada sob condições de ensaio padrão 4.2.4. A atividade enzimática do controle (amostra sem detergente), incubada nas mesmas condições, foi considerada como 100%.

4.5.4 Produção de Biodiesel

A reação de metanólise foi realizada com uma mistura de óleo de soja e metanol (9,65/0,35 g, razão molar de 1:1) como material de partida. Cerca de 4 ml da solução enzimática contendo 500 U de CfCLer foi adicionado à mistura de reação em um frasco de 10 ml e incubado a 30°C por 96 horas com agitação a 160 rpm em um bioshaker. As amostras foram retiradas ao final e analisadas quanto aos produtos de metanólise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) pelo Laboratório de Ensaio de Combustíveis (LEC) da UFMG, conforme descrito abaixo.

A análise foi realizada para a comparação dos perfis cromatográficos da amostra em relação aos padrões, utilizando-se um equipamento cromatógrafo líquido (HPLC) com detector de espalhamento de luz (ELSD-LT-II). A Coluna cromatográfica e condições da análise foram:

- Cromatógrafo líquido, modelo LC-20AT, equipado com módulo de comunicação CBM-20A, degaseificador DGU-20A5, bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20AHT, forno da coluna CTO-20A, detector ELSD-LT II – Marca Shimadzu.

- Coluna cromatográfica – Shim-pack CLC ODS(M) – (25 cm x 4,6 mm d.i.) 5 μ m – Shimadzu.

- Pré-coluna - Shim-pack GVP-ODS (1,0 cm x 4,6 mm d.i.) 5 μ m – Shimadzu.

- Fase móvel (I): Metanol.

- Fase móvel (II): Isopropanol:Hexano 5:4 (v/v).

- Fase móvel (III): Água Milli-Q.

4.6 PROCESSAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa Microsoft Office Excel 2010 foi utilizado, quando necessário, para análise e cálculo de dados e obtenção de curvas padrão e outros ajustes lineares. Em adição, análises estatísticas, como ANOVA e testes de comparação de médias foram realizados com auxílio do *software* Prisma GraphPad 5.0 utilizando nível de significância de pelo menos 95% ($p > 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A cutinase extracelular de *C. flavus* I-11 (CfCLE I-11) tem sido extensivamente analisada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia de microrganismos/LABIOM/UFSJ CCO (Godoi, 2015; Godoi, 2018). Os estudos da proteína nativa demonstraram propriedades catalíticas interessantes para aplicação industrial na hidrólise de triglicerídeos e biopolímeros, para produção de biodiesel e processamento de plásticos biodegradáveis, respectivamente. Neste contexto, existe interesse em obter esta enzima de forma recombinante em qualidade e quantidade suficiente para aplicações laboratoriais, bem como processos escalonáveis e economicamente viáveis para a indústria. Além disso, a produção desta enzima e sua caracterização bioquímica e estrutural podem contribuir para elucidar os determinantes estruturais relacionados as propriedades catalíticas de CfCLEr. Assim, o presente trabalho estudou a sequência codificadora de aminoácidos da CfCLE I-11 para expressão da enzima recombinante (CfCLEr) em leveduras *K. phaffii*. Para tanto, foi projetado e construído um vetor de expressão contendo sequências que permitem a eficiente secreção e posterior purificação da enzima de interesse, com poucas modificações na sequência de aminoácidos. Com os objetivos de: 1) utilizar os códons de uso *Komagataella phaffii*, 2) para que o gene estivesse *in frame* com o promotor e a calda de histidina do plasmídeo, 3) retirar e 4) acrescentar os sítios de restrição usados na clonagem. Os resultados advindos desta estratégia são descritos a seguir.

5.1 ANÁLISE *in silico* DA SEQUÊNCIA PROTEICA DE CfCLE I-11

Inicialmente, CfCLE I-11 foi identificada e caracterizada por Godoi (2018), cujo trabalho obteve uma sequência de 720 pares de base a partir de PCR. Assim, com o uso da sequência de nucleotídeos, o grupo de pesquisa do LABIOM obteve a sequência de aminoácidos (240 aa) traduzida a partir da primeira, com uma massa molecular esperada de 25 kDa. Estas sequências foram analisadas no presente trabalho e utilizadas como base para a construção de uma sequência codificadora da CfCLEr a ser expressa em *K. phaffii*.

5.1.1 Comparação da CfCLE I-11 com cutinases e lipases conhecidas

A sequência de aminoácidos da CfCLE I-11 foi utilizada na busca por proteínas similares por meio do algoritmo BLASTp/NCBI. O maior valor de identidade observado foi o do alinhamento com cutinase-like de *Cryptococcus sp. S-2* (CLE), o qual apresentou 97% de identidade. Além disso, foi observado a ausência de 15 aminoácidos na porção N-terminal após a remoção do peptídeo sinal. A ausência desses 15 aminoácidos será mais bem explorada mais a frente. Assim, a partir da análise do alinhamento entre as enzimas (Figura 4), foi possível observar que todos os resíduos de cisteína participantes das pontes dissulfeto na estrutura da CLE se encontram conservadas na sequência traduzida da CfCLE I-11. Com isso, esta conservação reforça a ideia de que, para seu perfeito dobramento e atividade, CfCLE I-11 deve ser produzida em um sistema de expressão que realize modificações pós-traducionais, como *K. phaffii* (Zhang, 2020).

Cutinase_C_flavus	MLVSALALAVLSAASLGRAAPTPEPAEAEHELETRATSSACFPQYVLINTRGTGEPQGQSSG
Cutinase_C_sp_S2	ATSSACFPQYVLINTRGTGEPQGQSSAG *****:
Cutinase_C_flavus	FRTMNSQITAALSGGTIYNTVYTADFSQNSAAGTADIIRRINSGLAANPNVCYILQGYSQ
Cutinase_C_sp_S2	FRTMNSQITAALSGGTIYNTVYTADFSQNSAAGTADIIRRINSGLAANPNVCYILQGYSQ *****
Cutinase_C_flavus	GAAATVVALQQLGTSGAAFNAGVFLIGNPDHKSGLTCNVDSNGGTTTRNVNGLSVAYQ
Cutinase_C_sp_S2	GAAATVVALQQLGTSGAAFNAGVFLIGNPDHKSGLTCNVDSNGGTTTRNVNGLSVAYQ *****
Cutinase_C_flavus	GPIPSGWVSKTLDVCAYGDGVCDTTHGFGINAQHLSYPNDQGVQTMGYKFAVNKLGGSA
Cutinase_C_sp_S2	GSVPSGWVSKTLDVCAYGDGVCDTAHGFGINAQHLSYPNDQGVQTMGYKFAVNKLGGSA- *.:*****:***:*****:*****

Figura 4. Alinhamento das sequências de aminoácidos de cutinase-like de *C. flavus* e cutinase-like de *Cryptococcus sp s-2*.

Aminoácidos iguais indicados por “*”, Aminoácidos com similaridade fortes são indicados por “:”, Aminoácidos com similaridade fracas são indicados por “.”, Cisteínas se encontram sublinhadas em negrito, Aminoácidos polares marcados em cinza.

5.1.2 Predição da estrutura secundária de CfCLE I-11

A sequência de aminoácidos da CfCLE I-11 (Godoi, 2018) foi utilizada para predição da estrutura secundária da mesma através do servidor Psi-pred, e os resultados estão apresentados na Figura 5. Estes resultados de predição demonstram a presença de α -hélices ao longo de toda a estrutura e a concentração de fitas β na região N-terminal. Além disso, quando comparamos a estrutura de cutinases conhecidas com a sequência de aminoácidos da

CfCLE I-11, observa-se que estas regiões apresentam um perfil de conservação (Urbanek *et al.*, 2020). Assim, estas informações foram utilizadas durante o processo de modelagem molecular da estrutura da CfCLER apresentado posteriormente neste trabalho.



Figura 5. Resultado gráfico da predição de estrutura secundária para a sequência de aminoácidos da CfCLE com auxílio do servidor Psi-pred. Predições de α -hélices são representadas em rosa e fitas β em amarelo.

5.1.3 Modelagem molecular da estrutura da CfCLE I-11

Não são conhecidos os determinantes estruturais para a enzima CfCLE I-11, consequentemente esta proteína não possui estrutura tridimensional conhecida. Ao realizar a busca por sequências similares foi possível identificar apenas 3 sequências com estrutura cristalizadas, cujo alinhamento com a sequência alvo demonstram uma ausência de 15 aminoácidos na porção N-terminal das sequências cristalizadas, podendo estas estarem truncadas. Assim, uma aplicação deste estudo de modelagem é o direcionamento da estratégia de expressão e purificação da proteína recombinante; além de permitir alguma observação

teórica acerca da influência de uma nova estrutura na função e especificidades de CfCLE. Isso permite prever se a inserção de sequências de aminoácidos a serem reconhecidas para purificação e/ou modificação pós-traducional, nas regiões N e/ou C-terminais, teriam impacto significativo na estrutura e função da proteína. Com isso, foi realizada a modelagem molecular da CfCLEr contendo cauda de histidina na porção C-terminal, utilizando-se como molde a estrutura da CLE, disponível no banco de dados PDB com o código 2CZQ (Masaki et al., 2005). Além disso, a modelagem da CfCLEr foi realizada com uso da classe “auto modelagem” dos programas Phyre2 e I-TASSER, gerando o modelo tridimensional exibido na Figura 6A. Assim, a partir deste resultado é possível observar que o modelo conserva as características estruturais de cutinases observadas por outros autores, tais como um núcleo hidrofóbico formado de folhas β e filamentos em paralelos, ligeiramente torcidas, cercada por alfa hélice (Urbanek *et al.*, 2020). Além disso, a título de comparação, a estrutura cristalográfica da cutinase-like de *Cryptococcus sp. s-2* se encontra na Figura 6B. Posteriormente, avaliando o modelo através do programa PyMol (Figura 6C) é possível observar que tanto a porção C-terminal contendo a cauda de histidina quanto à porção N-terminal se encontram livres para interações com a resina de níquel. Em seguida, foi realizada a sobreposição do modelo para CfCLEr e CLE através do programa SuperPose, o qual apontou estruturas idênticas entre as enzimas (Figura 6D), com diferença na porção N e C-terminal e um valor de RMSD de 1.61, o que confirma a qualidade do modelo, uma vez que valores menores que 2 representam alta identidade (Hevener *et al.*, 2009). Além disso, no programa PyMol foi avaliado a localização dos aminoácidos de CfCLE que se diferem de CLE. Dessa forma, observa-se na Figura 6E-H que estes aminoácidos, destacados em ciano, não se encontram na fenda catalítica (em vermelho na Figura 6E), mas distribuídos ao longo da estrutura da enzima. Além disso, os aminoácidos destacados em cianos são polares, enquanto que em CLE estes aminoácidos são apolares (hidrofóbicos), favorecendo uma maior polaridade da enzima e conseqüentemente aumentando a hidrofília da enzima.

Também, outra estrutura observada foi a de alguns aminoácidos da porção N-terminal de CfCLE ausentes na estrutura cristalográfica de 2CZQ, destacados em rosa. Isso sugere que a CLE sofre um processamento alternativo que leva a perda de 15 aminoácidos próximos ao peptídeo sinal. Ao analisar a hidrofobicidade superficial de CfCLEr (Figura 7A-D) e comparar com a de CLE (Figura 7E-H) é possível observar um aumento da hidrofília da superfície de CfCLE graças a modificação dos aminoácidos (indicados pela setas) e pela presença de aminoácidos polares na porção N-terminal.

Em conjunto, essas informações sugerem que estes aminoácidos possam estar associados à estabilidade da enzima na presença de metanol, uma vez que interferem na polaridade e hidrofília da mesma. Resultados semelhantes foram observados por Xi e colaboradores (2021), em que 16 aminoácidos polares distribuídos na estrutura de BhrPETase aumentaram a resistência a solventes orgânicos. Em comparação, os respectivos aminoácidos apolares reduziam a resistência aos solventes orgânicos em LCC, uma cutinase que apresenta sequência similar a BhrPETase, exceto por esses aminoácidos. Assim, o estudo cristalográfico de CfCLE na presença do solvente poderia elucidar esses determinantes e trazer maiores esclarecimentos sobre a resistência aos solventes orgânicos.

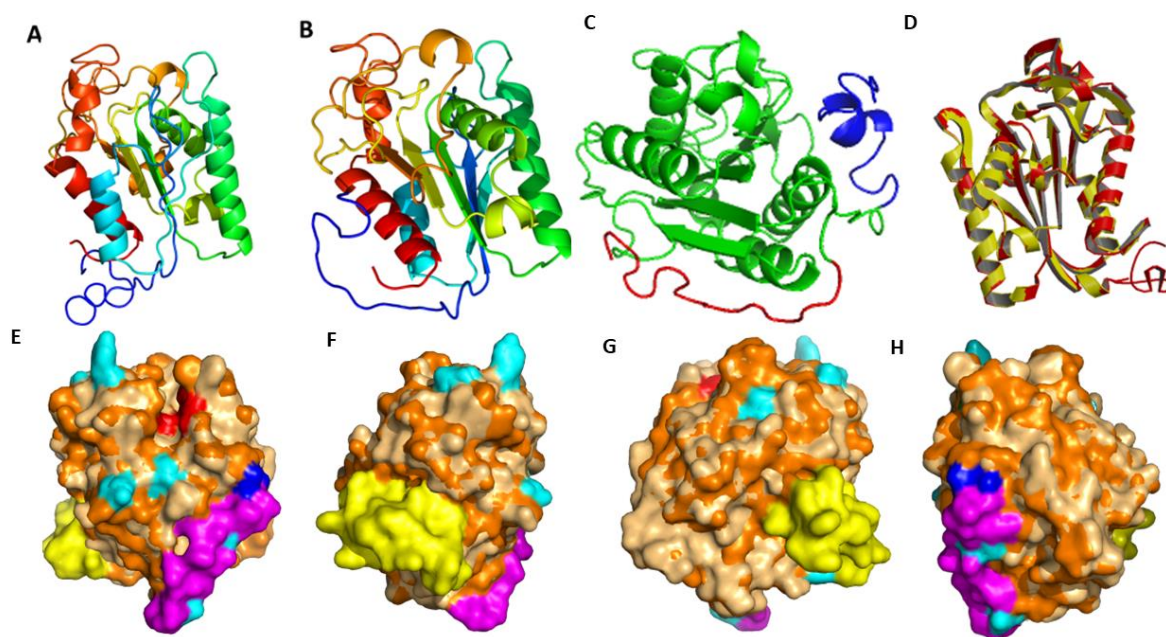


Figura 6. Modelagem Molecular. (A) Cutinase-like de *C. flavus*. (B) Cutinase-like de *C. sp S-2*, (C) Modelo de *C. flavus* com porções C-terminal destacado em azul e N-terminal em vermelho, (D) Sobreposição da cutinase-like de *C. flavus* e de *C. sp s-2* no programa SuperPose, (E-H) Sobreposição da cutinase-like de *C. flavus* e de *C. sp s-2* no programa PyMol. Resíduos catalíticos destacados em vermelho, Resíduos diferentes entre CLE e CfCLE destacados em ciano, Região N-terminal observada apenas na estrutura de CfCLE destacado em rosa, Resíduos da construção do vetor (Ala e Gly) destacado em azul, Resíduos do C-myc e cauda de histidinas destacado em amarelo, Resíduos em comum de CLE destacados em bege, Resíduos em comum de CfCLE destacados em laranja.

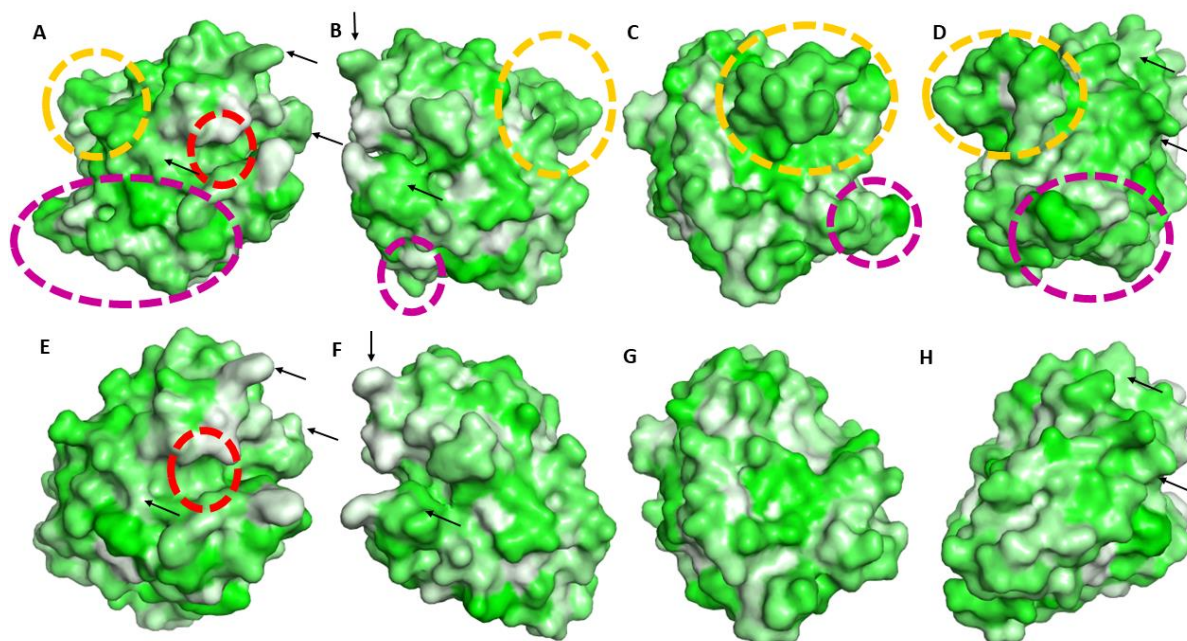


Figura 7. Hidrofobicidade superficial. (A-D) CfCLER; (E-H) Cutinase de *Cryptococcus sp. S-2*. Regiões hidrofóbicas destacadas em branco; Regiões hidrofílicas destacadas em verde; Sítio catalítico destacado em vermelho; Resíduos do C-myc e cauda de histidinas destacado em amarelo; Região N-terminal não observada na estrutura de CLE destacado em rosa; Setas indicam regiões de hidrofobicidade diferente devido a diferença entre aminoácidos

5.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR pPICZ α B-CfCLE PARA EXPRESSÃO DE CfCL α EM *K. phaffii*

phaffii

A partir das análises *in silico*, foi possível construir uma sequência de aminoácidos da proteína recombinante CfCL α , visando a expressão heteróloga, purificação, estudo bioquímico estrutural e aplicação biotecnológica desta proteína. Os estudos iniciais da estrutura tridimensional da enzima direcionaram a adição da calda de histidina na porção C-terminal para não interferir com os 15 aminoácidos presentes na porção N-terminal de CfCLE. Inicialmente, através da ferramenta Signal IP, o peptídeo sinal foi identificado (

Figura Suplementar 1) e removido para utilização do α -MF do vetor pPICZ α B[®]. Além disso, o códon de parada também foi removido para que a sequência codificadora estivesse *in frame* com a cauda de histidina do vetor (Figura 8).

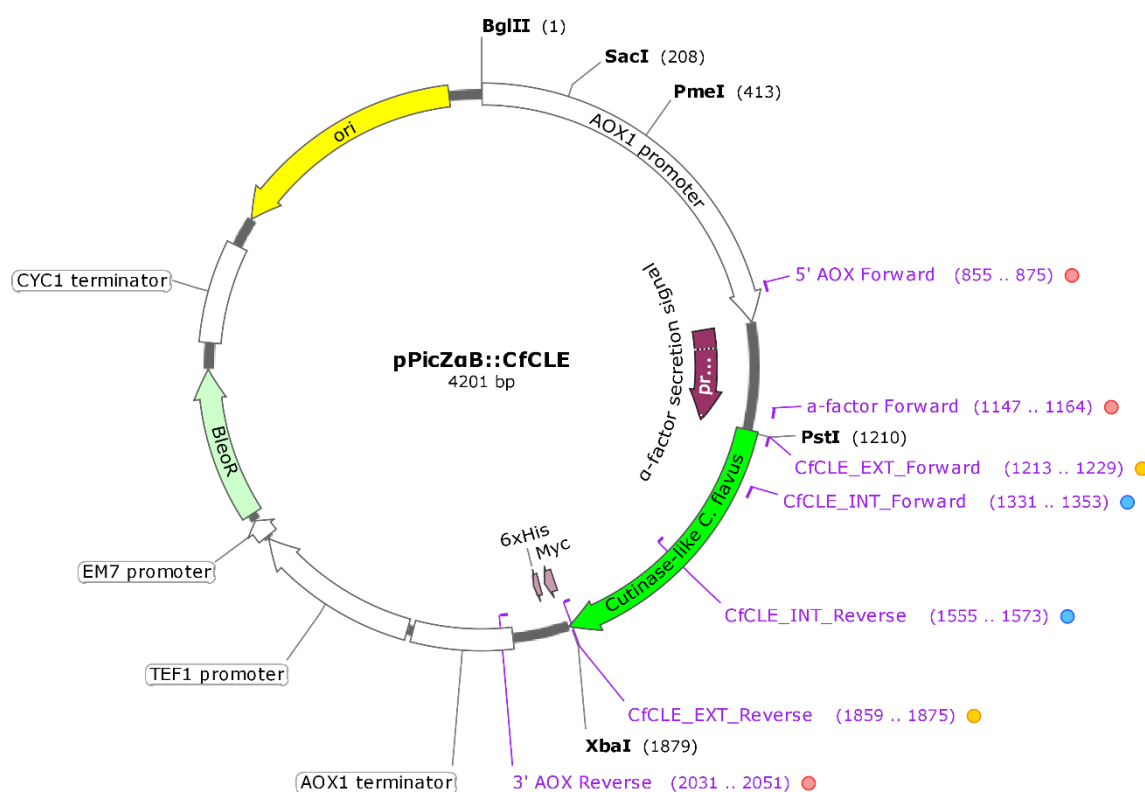


Figura 8. Mapa do plasmídeo sintético pPicZ α B-CfCLE.

Posteriormente, a otimização do gene foi realizada utilizando a ferramenta online GeneOptimizer e modificações conforme seção 4.2.2. Também, os códons otimizados foram analisados na plataforma online *Graphical Codon Usage Analyser*, o que forneceu a representação gráfica (Figura 10) dos códons de uso de *K. phaffii* para o gene nativo e otimizado de CfCL α .

Dessa forma, observa-se a otimização dos códons das estruturas secundárias e a conservação de códons nas estruturas de *loop*.

O produto final (Figura 9) foi enviado para síntese na empresa Genone Biotechnologies, a qual realizou a clonagem nos sítios de restrição *PstI* e *XbaI* do vetor pPICZ α B.

```
>cfcle_otimizada
PstI
CTGCAGGTGCCCCAACTCCAGAACCAGCTGAAGCTCATGAATTGGAACTAGAGCTACTTCTTCCGCTTGTCC
CAATACGTTTTGATCAACACTAGAGGTACTGGTGAACCACAAGGTCAATCTTCCGGTTTCAGAACTATGAACT
TCAAATCACTGCTGCCTTGTCTGGTGGAACTATCTACAACACTGTTTACACTGCTGATTTCTCTCAAACTCTG
TGCCGGTACTGCTGATATCATCAGACGTATCAACTCTGGTTTGGCTGCCAACCCAAACGTTTGTACATCTTGC
AGGTTACTCTCAAGGTGCTGCCGCTACTGTTGTCGCTTTGCAACAGTTGGGTACTTCTGGTGCTGCCTTCAACG
TGTTAAGGGTGTTTTCTTGATCGGTAACCCAGATCATAAGTCTGGTTTGACTTGTAACGTTGATTCTAACGGTG
AACTACCACTAGAAACGTTAACGGTTTGTCTGTTGCTTACCAAGGTCCTATCCCTTCTGGTTGGGTTTCTAAGA
TTTGGATGTTTGTGCTTACGGTGATGGTGTGTTGTGATACTACCCATGGTTACGGTATCAACGCTCAACATTTGT
TTACCCAAACGATCAAGGTGTTCAAACATATGGGTTACAAGTTCGCTGTTAACAAGTTGGGTGGATCTGCTGGT
GTCTAGA
XbaI
>Tradução CfcLE_otimizada
AGAPTPEPAEAHELETRATSSAC PQYVLINRGTGEPQQSGFRMTMNSQITAALSGGTIYNTVYTADFSQNSAAGT
DIIRINSGLAANPNVCYILQGYSGAAATVVALQQLGTSGAAFNKGVFLIGNPDHKSGLTCNVDSNGGTTTRN
NGLSVAYQGPISGWVSKTLDVCAYGDGVCDTTHGYGINAQHLSYPNDQGVQTMGYKFAVNKLGGSAGGL
```

Figura 9. Produto da otimização de genes para *K. phaffii* e respectiva tradução

Sequências destacadas em cinza representam os nucleotídeos adicionados para reconhecimento das enzimas de restrição. Sequências sublinhadas em negrito representam nucleotídeos adicionados para correção da fase de leitura (*frame*).

5.3 TRANSFORMAÇÃO, REPLICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO EM *E. coli*

O plasmídeo pPICZ α B-CfCLE foi utilizado para a eletroporação de células eletrocompetentes de *E. coli* cepa DH5 α , conforme descrito em 4.2.3. Consequentemente, diversos recombinantes foram obtidos e não foi observado crescimento no controle negativo.

A fim de certificar que a sequência codificadora da CfCLEr estava localizada entre o α -MF e a cauda de histidinas, foi realizado PCR de colônia utilizando diferentes pares de primers (Tabela 3). Assim, na Figura 11 é possível observar que a massa molecular das bandas dos produtos de PCR corresponde aos tamanhos esperados: 1196pb, 904pb, 662pb e 242pb para os amplicons 1, 2, 3 e 4 das diferentes PCRs, respectivamente.

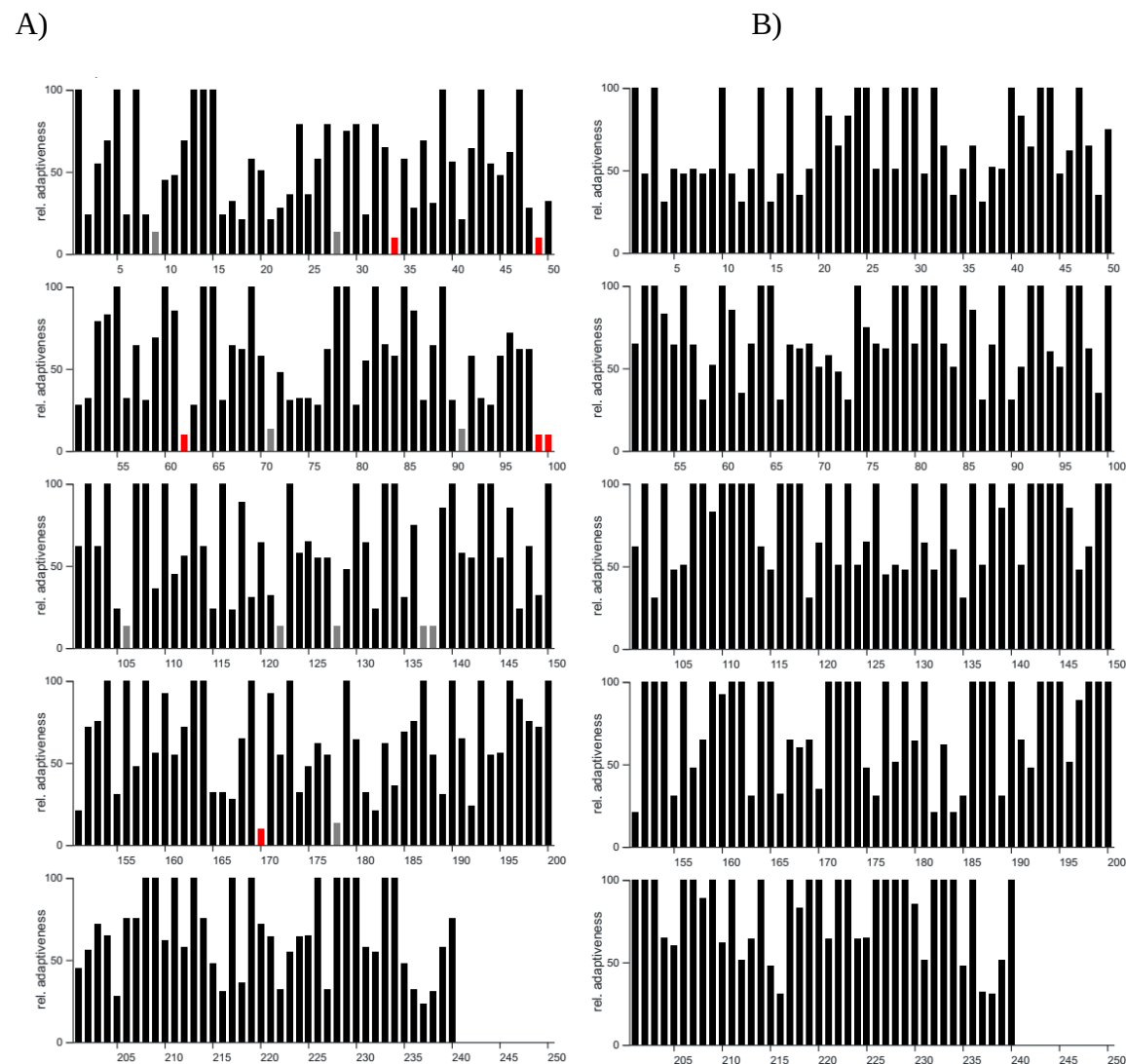


Figura 10. Esquema gráfico da otimização de códons para *K. phaffii* (A) Análise de códons de uso de *K. phaffii* para CfCLE nativa; (B) Análise de códons de uso de *K. phaffii* para CfCLE otimizada. Codons com frequência de uso abaixo de 25% estão em cinza e abaixo de 10% estão em vermelho.

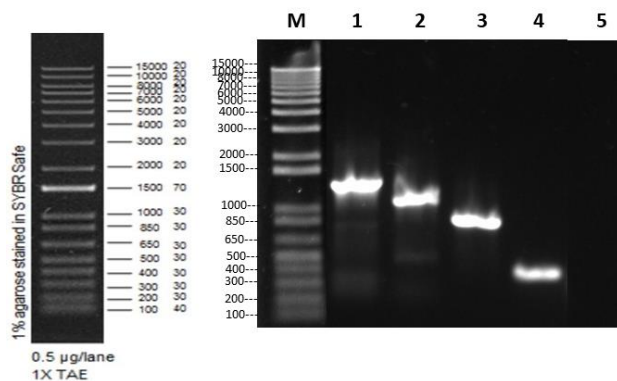


Figura 11. Gel dos produtos de PCR de colônia utilizando diferentes pares de primer. (M) padrão de massa molecular; (1) pPICZ α B-CfCLE amplificado com 5' AOX F e 3' AOX R; (2) pPICZ α B-CfCLE amplificado com α Factor F e 3' AOX R; (3) pPICZ α B-CfCLE amplificado com EXT F e EXT R; (4) pPICZ α B-CfCLE amplificado com INT F e INT R; (5) controle negativo.

Em seguida, o plasmídeo purificado foi encaminhado para a empresa Milleus para sequenciamento utilizando os primers diretos 5' AOX, α -MF e o primer reverso 3' AOX. A análise do resultado de sequenciamento revelou que as sequências apresentaram alinhamento correto com o plasmídeo (Figura 12), confirmando que o gene CfCLer está em fase com o promotor AOX I, com o peptídeo sinal α -MF e a cauda de histidinas.

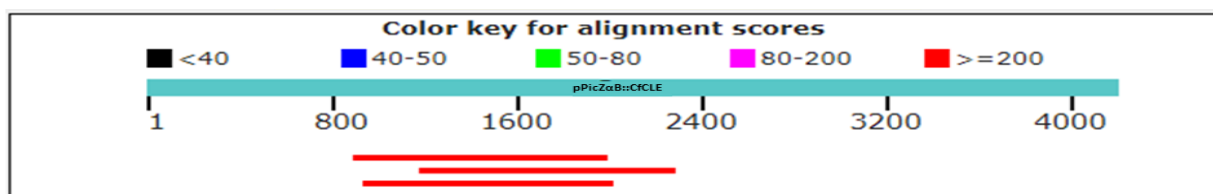


Figura 12. Alinhamento dos produtos de sequenciamento com plasmídeo pPICZ α B-CfCLE.

Em seguida, foi realizada a extração e linearização do plasmídeo com enzima SacI. Após isso, o produto da linearização foi submetido a eletroforese (Figura 13) e quantificado em Nanodrop[®] (Tabela 4).

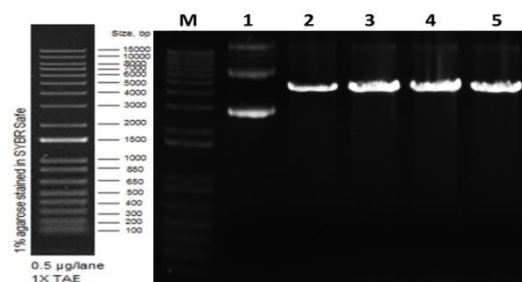


Figura 13. Gel do produto da linearização com SacI. (M) padrão de massa molecular 1Kb, (1) Plasmídeo não linearizado (controle), (2-5) produto da linearização

Tabela 4. Quantificação do produto de Maxiprep em Nanodrop®

Amostra	Concentração (ng/μL)	260/280	260/230	Total (μg)
L1	1844,7	1,97	2,36	18,45
L2	2643,9	1,94	2,4	26,44
L3	2572,9	1,97	2,43	25,73
L4	2071,2	1,97	2,33	20,71

5.4 TRANSFORMAÇÃO DE *K. phaffii* E SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES PARA EXPRESSÃO DE CfCLEr

Seguindo as recomendações do kit EasySelect™ Pichia Expression descritas anteriormente, foram realizadas seis tentativas de transformação que não resultaram em transformantes. Diante disto, foram utilizadas seis novas estratégias de transformação (Tabela 5) baseadas em Piva (2015), Gonçalves (2009) e Arruda (2008) que consistiam em recuperar as células eletroporadas em meio rico com YPD, biotina e/ou histidina e em intervalos longos de 1-2 horas. Posteriormente, a partir do número de transformantes obtidos com as novas estratégias, foi possível observar que a adição de biotina, histidina e YPD possibilitou a recuperação das células; situação bastante diferente se comparada a utilização apenas do sorbitol, conforme recomendado pelo kit. Isso sugere que para a recombinação com o vetor pPICZαB-CfCLE, o meio mais complexo de YPD suplementado com histidina e biotina promove uma melhor recuperação dos transformantes, uma vez que fornece nutrientes essenciais para GS115, sendo esta cepa escolhida pela facilidade de manipulação em escala de bancada. Além disso, resultados similares foram observados nos trabalhos de Paiva (2015), Gonçalves (2009) e Arruda (2008).

Tabela 5. Diferentes estratégias de transformação de *K. phaffii*

Protocolo Eletroporador (Código/V/ms)	Medições Eletroporador (V)	Medições Eletroporador (ms)	Tempo de Recuperação (h)	Meio de Recuperação (gelado)	Número de Transformantes (após 10 dias)
Sc2/1500/-	1500	5,1	1	S+B+H	1
Sc2/1500/-	1500	5,1	2	S+B+H	25
Sc2/1500/-	1500	5,0	1	YPD+B+H	0
Sc2/1500/-	1500	4,7	2	YPD+B+H	29
Sc2/1500/-	1500	5,1	1+1	S+B+H à +YPD*	7

Sc2/1500/-	1500	5,0	1+1	YPD+B+H à +YPD**	13
------------	------	-----	-----	---------------------	----

S = Sorbitol; B = Biotina; H = Histidina

*Após eletroporação, as células foram ressuspensas em sorbitol e crescidas sem agitação por 1h, seguido do acréscimo de YPD e crescidas por mais 1h sob agitação 250rpm.

**Após eletroporação, as células foram ressuspensas em YPD e crescidas sem agitação por 1h, seguido do acréscimo de YPD e crescidas por mais 1h sob agitação 250rpm.

Posteriormente, os transformantes plaqueados em YPDS contendo 100 µg/mL de Zeocina foram submetidos a extração de DNA genômico para confirmação da transformação por *PCR* de DNA genômico utilizando primers que anelavam ao promotor AOX I, α -MF de secreção e cauda de histidinas. Isso a fim de certificar que, após recombinação homóloga, o cassete de expressão havia sido incorporado com os elementos transcrpcionais. Na Figura 14 é possível observar bandas com massa molecular correspondentes ao esperado: 498 pb para o par de primer 5' AOX F e CfCLE INT R, 904 pb para α -MF F e 3' AOX R. Os resultados são apresentados apenas para transformantes selecionados nas etapas posteriores.

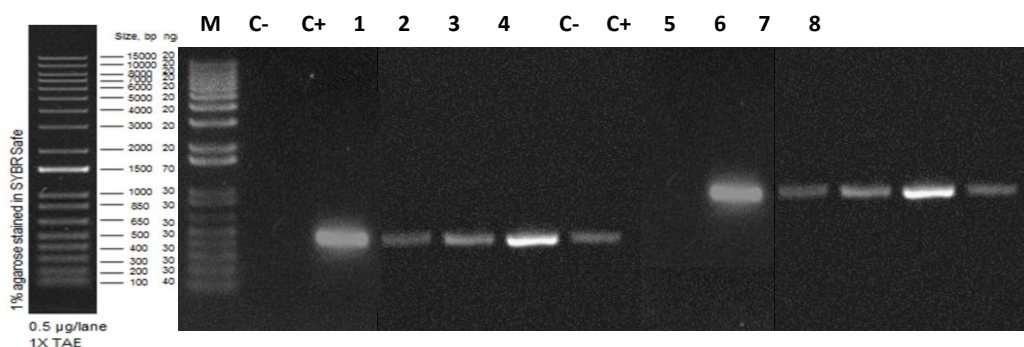


Figura 14. Gel do produto de *PCR* de DNA genômico utilizando como *template* o DNA genômico dos recombinantes de *K. phaffii* (M) padrão de massa molecular; (C-) Controle negativo; (C+) Controle positivo (plasmídeo); (1-4) utilizando os primers 5' AOX F e CfCLE INT R; (1) recombinante 11; (2) recombinante 26; (3) recombinante 29; (4) recombinante 39; (5-8) utilizando os primers α -MF F e 3' AOX R; (5) recombinante 11; (6) recombinante 26; (7) recombinante 29; (8) recombinante 39.

5.4.1 Propagação de recombinantes por plaqueamento em concentrações crescentes de antibiótico e predição de fenótipo de crescimento em metanol

Conforme descrito anteriormente, o plaqueamento em diferentes concentrações de antibiótico pode promover a recombinação homóloga de múltiplas cópias do cassete de expressão. Neste sentido, os recombinantes de *K. phaffii* foram repicados em placas de meio YPD contendo concentrações crescentes de Zeocina[®] (100, 500, 1000 e 2000 µg/mL) e incubadas por 48 horas a 28°C. Desta forma, as células originadas deste repique foram tratadas como recombinantes

diferentes e investigadas quanto ao potencial de expressão e secreção da CfCL_{Er}. Como resultado, 33% dos recombinantes foram capazes de crescer em 500 µg/mL de Zeocina[®], 11% em 1000 µg/mL e 1% em 2000 µg/mL. Resultados semelhantes foram observados pelos desenvolvedores do kit, que descrevem que menos de 10% dos clones são capazes de realizar múltiplas recombinações (Life Technologies, 2010).

Outro aspecto importante avaliado foi o perfil fenotípico de crescimento na presença de metanol. Neste sentido, apenas 8% dos recombinantes apresentaram fenótipo Mut^S e os demais recombinantes apresentaram fenótipo Mut⁺. Este fato indica que a maioria dos recombinantes promoveu uma recombinação homóloga sem a deleção do gene AOX1, responsável pelo rápido crescimento em placas contendo metanol como fonte de carbono (Sreekrishna, 2010).

5.4.2 Seleção de *K. phaffii* recombinante com expressão e secreção de CfCL_{Er} funcional

Os recombinantes de *K. phaffii* para o gene da CfCL_{Er} foram investigados quanto à capacidade de expressão e secreção da enzima recombinante funcional. Dessa forma, os valores de atividade enzimática e proteína total dos sobrenadantes, coletados em intervalos de 24 horas até 120 horas de cultura dos recombinantes e da cepa controle não transformada, são apresentadas nas Figura 16 e 16, respectivamente. De acordo com estes resultados, os sobrenadantes de cultura de todas os recombinantes investigados apresentaram atividade enzimática sobre o substrato sintético pNPB, o que confirma a capacidade de expressão e secreção da CfCL_{Er} funcional. Enquanto que a cepa controle expressou enzimas para sobrenadante sem atividade para hidrólise de pNPB. Além disso, diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foram observadas nos recombinantes 3, 5, 6, 11, 18, 26, 29 e 39 quando comparadas por ANOVA. Corroborando este resultado, o controle negativo não apresentou atividade sobre pNPB. Adicionalmente, observa-se que os recombinantes 52, 53, 62, 63, 76, 77, 79 e 97 apresentaram maior concentração de proteínas totais com diferença significativa ($p \leq 0,05$) por ANOVA. Nesse ponto, é importante destacar que estes recombinantes, em sua maioria, são

Mut⁺ e derivam de repiques em placas com 100 e 500 µg/mL de Zeocina[®], podendo possuir até duas cópias do cassete de expressão, segundo manual Easy Pichia selection (Life Technologies, 2010). Neste contexto, Aw e Polizi (2013) destacam que alguns problemas no cultivo de cepas contendo múltiplas cópias estão relacionados à instabilidade do cassete de expressão. Além disso, Marx e colaboradores (2009) relatam que altos níveis de expressão podem afetar de forma negativa o metabolismo celular. A Figura 15 mostra o perfil eletroforético obtido para os sobrenadantes de cultura dos recombinantes 29 e 26 e da cepa controle não transformada, respectivamente. Também, o sobrenadante de cultura das cepas 39 e 26 apresentam uma proteína, com massa molecular estimada de 25 kDa, em concentração muito superior às demais, com perfil de banda dupla no gel de poliacrilamida corado por prata. Além disso, esta proteína não está presente no sobrenadante de cultura da cepa controle, o que sugere uma correspondência entre a banda e a expressão CfCLE.

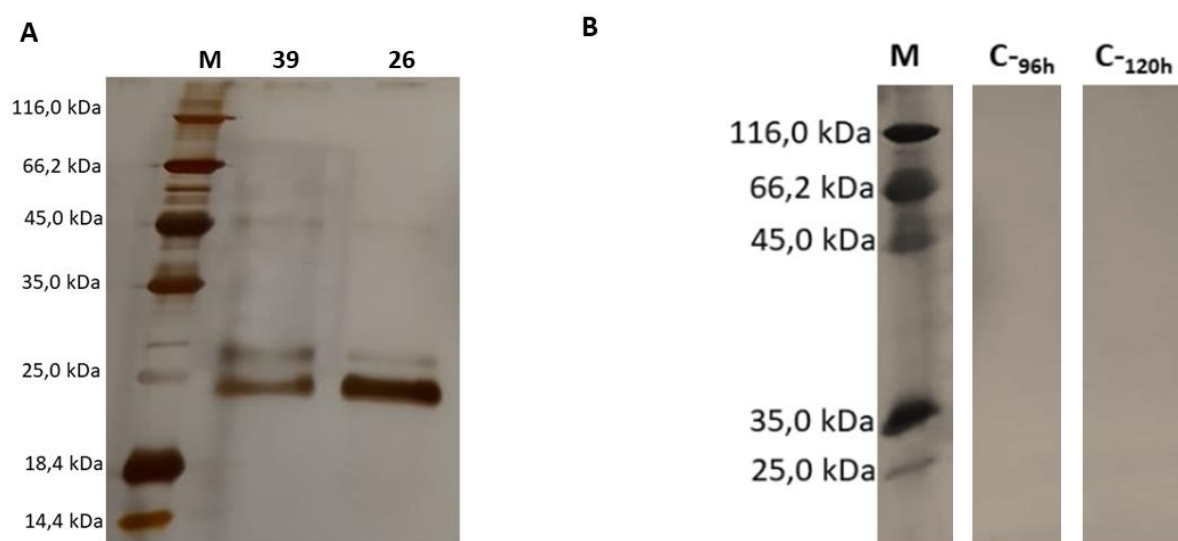


Figura 15. Gel SDS-PAGE 15% corado com prata dos recombinantes cultivados em placas de deep-wells. (A) (M) marcador de massa molecular; (39) sobrenadante do recombinante 29 com 120h de indução; (26) sobrenadante do recombinante 26 com 120h de indução; (B) (M) marcador de massa molecular; (C- 96-120h) sobrenadante do controle negativo ao longo de 120 horas de indução com 0,5% metanol

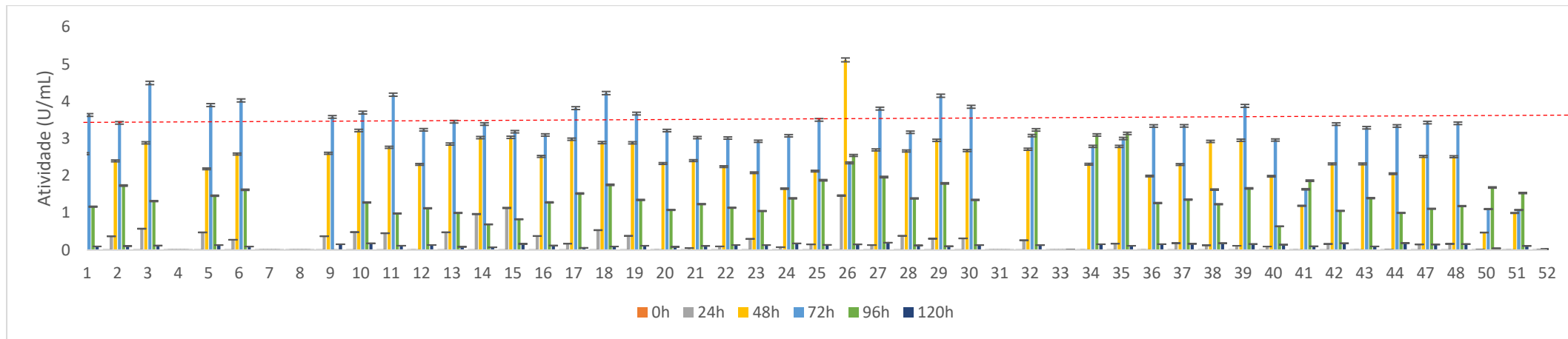


Figura 16. Atividade enzimática ($\mu\text{mol pNP} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) sobre o substrato pNPB dos sobrenadantes de 24-120 horas de cultura dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLer e cepa controle negativo. Os valores plotados são médias de três repetições dos ensaios de expressão com os respectivos desvios padrão. Linha tracejada mostra o ponto de corte. Foram testados 150 clones, sendo apresentado apenas os resultados negativos e positivos relevantes.

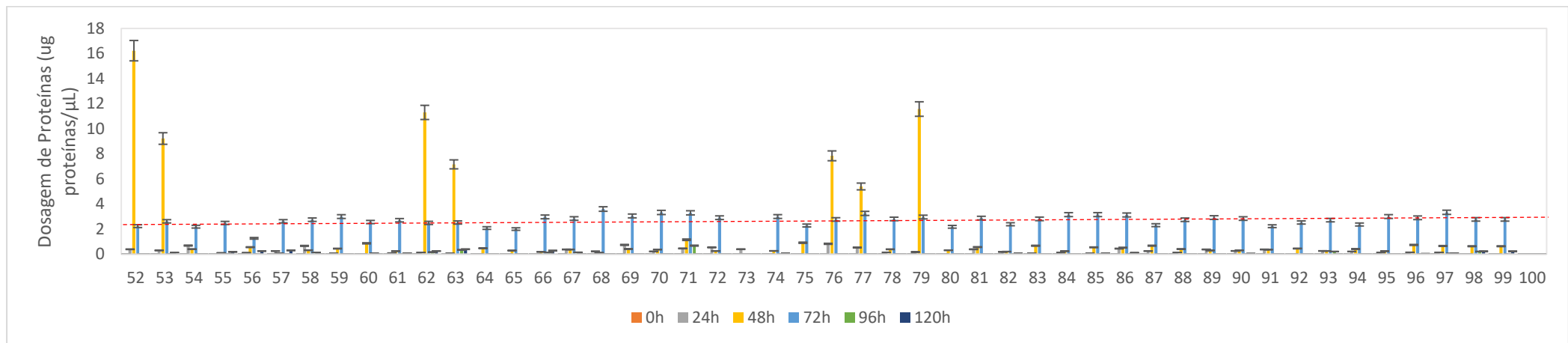


Figura 17. Quantificação de proteínas totais ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) dos sobrenadantes de 24-120 horas de cultura dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLer e cepa controle negativo. Os valores plotados são médias de três repetições dos ensaios de expressão com os respectivos desvios padrão. Linha tracejada mostra o ponto de corte. Foram testados 150 clones, sendo apresentado apenas os resultados negativos e positivos relevantes.

Apesar dos diversos métodos de cultivo em pequena escala, Ahmad e colaboradores (2014) relatam que os recombinantes selecionados podem não ter o mesmo desempenho quando cultivados em biorreatores, devido principalmente as diferenças nas condições de cultivo. Assim, uma nova triagem de recombinantes para cultivo em maior escala é necessária em alguns casos. Diante destes resultados, os recombinantes 3, 5, 6, 11, 18, 26, 29, 39, 52, 53, 62, 63, 76, 77, 79 e 97 foram selecionados para expressão de bancada em maior volume com base nas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) quando comparadas por ANOVA apresentadas pela linha de corte da atividade enzimática e quantidade de proteínas.

Assim, visando a seleção dos melhores transformantes, foi realizado o cultivo dos 16 recombinantes selecionadas anteriormente em 50 mL de meio BMMH. Como resultado, oito recombinantes de *K. phaffi* (6, 11, 18, 26, 29, 39, 53 e 79) apresentaram melhor desempenho em termos de atividade enzimática, produção de proteínas totais e crescimento, com diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparadas por ANOVA (Figura Suplementar 2).

Em seguida, estes oito recombinantes foram utilizados para selecionar os transformantes capazes de produzir CfCLer em maior concentração de metanol (1% v/v). Como resultado, quatro recombinantes (11, 26, 29 e 39) apresentaram melhor desempenho, com diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparadas por ANOVA (Figura Suplementar 3).

Posteriormente, estes 4 recombinantes foram utilizados para selecionar os transformantes mais robustos, capazes de conservar a produção de CfCLer em elevadas concentrações de metanol (0,5-2%). Desta forma, o recombinante 26 apresentou o melhor desempenho, com diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparada por ANOVA (Figura 18). Uma vez que apresentou maior atividade em pequenas concentrações de metanol (0,5%) quanto em elevadas concentrações (2%), além de maiores concentrações de proteína e crescimento semelhante aos demais recombinantes.

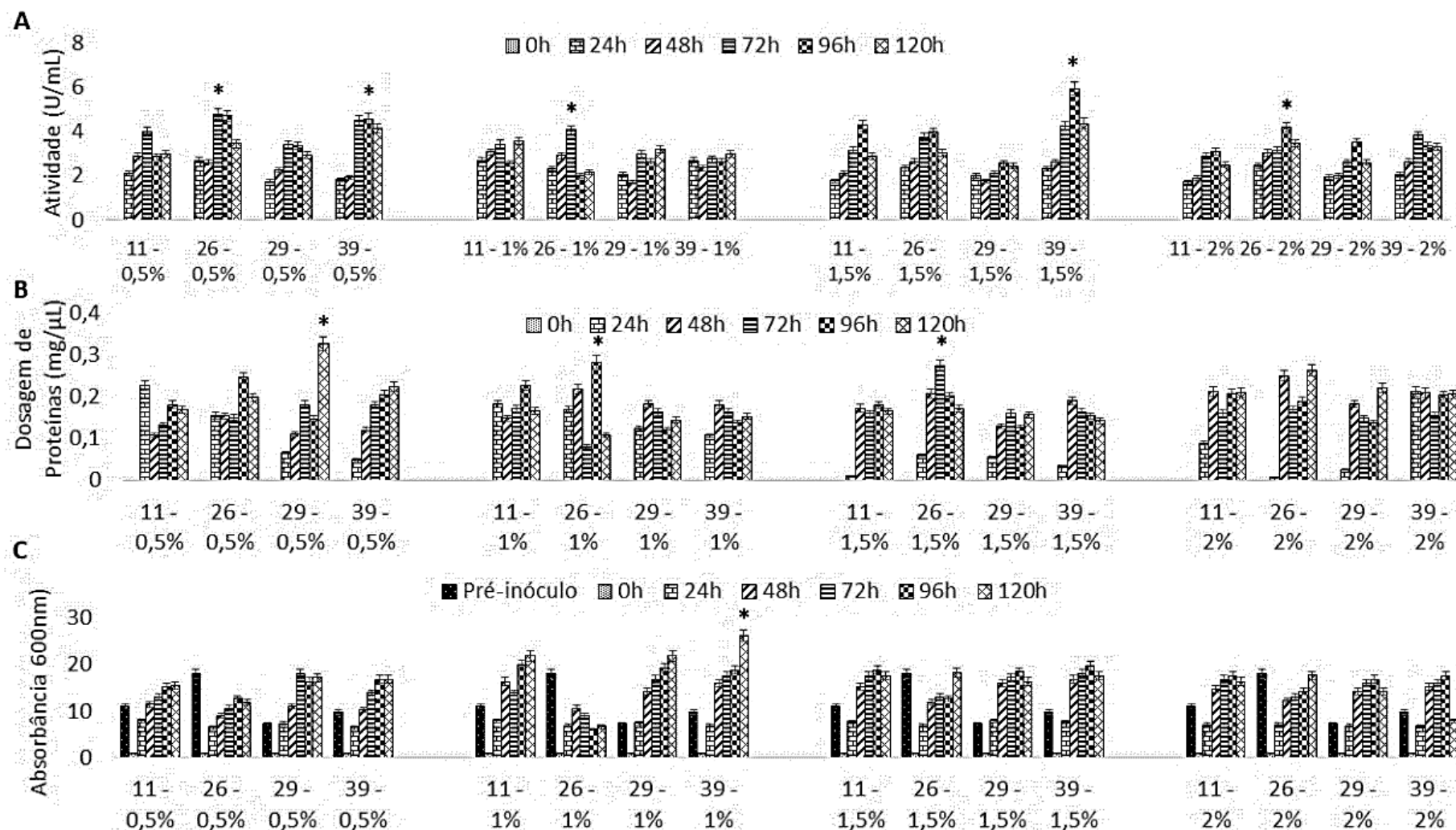


Figura 18. Gráficos de atividade, proteínas totais e crescimento dos recombinantes selecionados. (A) Atividade enzimática ($\mu\text{mol pNP} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) sobre o substrato pNPB dos sobrenadantes de 24-120 horas de cultura dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLER. (B) Quantificação de proteínas totais ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) dos sobrenadantes de 24-120 horas de cultura dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLER. (C) Densidade ótica a 600nm de 0-120h do cultivo dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLER. Os valores plotados são médias de três repetições dos ensaios de expressão com os respectivos desvios padrão. * representam valores com diferença significativa ($p < 0,05$) comparando os dados por ANOVA.

5.5 PURIFICAÇÃO

Buscando a caracterização bioquímica e estrutural da CfCLer, produzida pelo recombinante 26, foram padronizados dois processos de purificação da referida proteína a partir do sobrenadante de 1 L de cultura do ensaio de expressão em escala de bancada.

5.5.1 Purificação por afinidade a coluna de níquel

No primeiro processo foi utilizado a coluna de níquel-sepharose que possui afinidade com a cauda de histidina presente na CfCLer. Várias condições de pH, tampão, quantidade de proteína injetada entre outras foram testadas (dados não apresentados), visando otimizar a purificação. Para tanto, foram seguidas todas as etapas descritas na metodologia, que foi a condição obtida com os melhores resultados. Desta forma, é possível observar no resultado da purificação (Figura 19A) a formação de 3 picos, sendo o terceiro (fração 4) (2201 mAu) referente a CfCLer purificada. Em seguida, na avaliação da atividade enzimática (Figura 19C), foi observado que as atividades do primeiro pico (fração 1) e do segundo (fração 2) eram menores que aquela observada para o *pool* de proteínas do terceiro pico. Assim, as frações centrais do terceiro pico foram reunidas e submetidas à dessalinização (Figura 19B), seguido de eletroforese em gel SDS-PAGE 15% (Figura 19D), na qual foi possível observar bandas únicas próximas a 25 kDa. É possível observar bandas com peso molar superior a 45kDa que podem corresponder a álcool oxidase (73,89kDa e 66kDa), catalase (58,89kDa), provenientes do extravasamento de proteínas citoplasmática de células rompidas. Além disso, ensaios de Western-blot (Figura 20) confirmaram a presença da enzima recombinante utilizando anticorpos contra a cauda de histidinas. Apesar do rendimento de 31%, a fração que não se ligou à coluna (*flow through*) apresentou atividade enzimática relativamente alta, o que levou à procura por métodos cromatográficos mais eficientes.

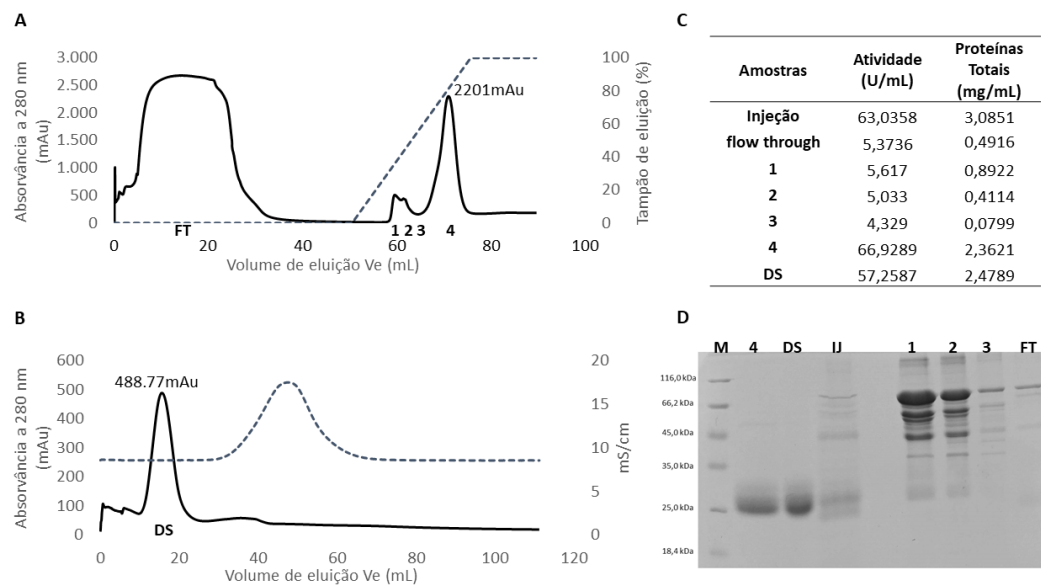


Figura 19. Resultados da purificação por afinidade. (A) Perfil cromatográfico obtido para a purificação da CfCLER, por cromatografia de afinidade ao níquel (AF), a partir do sobrenadante de 96 horas de indução com 1,5% metanol do recombinante 26, mostrando as curvas de A280 (mAu) (linha contínua), concentração percentual do tampão B (%B) (linha tracejada), em função do volume de eluição (mL). (B) Perfil cromatográfico obtido para a purificação da CfCLER, por cromatografia de *Dessalting* (DS), a partir do produto de purificação por afinidade, mostrando as curvas de A280 (mAu) (linha contínua), concentração percentual de sal (linha tracejada), em função do volume de eluição (mL). (C) Quantificação da atividade e proteínas totais das amostras coletadas ao longo da purificação por afinidade. (D) Gel SDS-PAGE 15% do produto da purificação. (M) marcador de massa molecular; (4) frações 4 dos pontos centrais da amostra purificada do terceiro pico; (DS) produto da dessalinização; (IJ) amostra injetada na coluna de afinidade; (1) fração do interferente presente no primeiro pico; (2) fração do interferente presente no segundo pico; (3) fração do interferente presente no vale entre o segundo e o terceiro pico; (FT) *flow through* que não se ligou a coluna de afinidade.

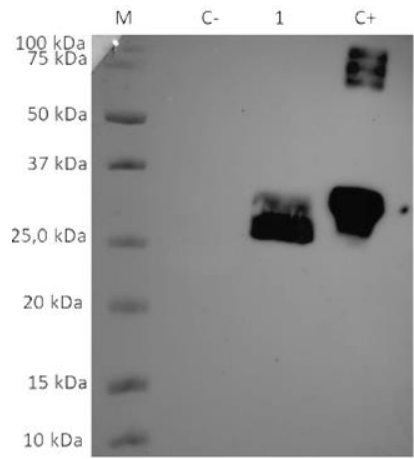


Figura 20. *Western blot*. (M) marcador de massa molecular; (C-) controle negativo; (1) amostra da dessalinização; (C+) controle positivo (protease de Tobacco Etch Virus - TEV).

5.5.2 Purificação por troca catiônica

No segundo processo foram avaliadas diversas colunas de troca iônica (troca aniônica capto Q e troca catiônica capto SP e S). Além disto, foram realizadas variações do pH dos tampões, com

intuito de selecionar a coluna/tampão que melhor se adequava à purificação (dados não mostrados).

A coluna de troca catiônica capto S em pH 3,6 apresentou o melhor resultado e foi selecionada para os demais ensaios. Assim, é possível observar, neste resultado da purificação (Figura 21A), a formação de um pico de 1785 mAu referente a CfCLEr purificada. Após avaliação da atividade (Figura 21C), as frações foram reunidas e submetidas a dessalinização (Figura 21B), seguida de eletroforese em gel SDS-PAGE 15% (Figura 21D), nas quais foram observadas bandas próximas a 25 KDa nas amostras referentes ao pico com atividade enzimática e ausência da mesma banda no FT. Além disso, uma atividade residual mínima foi observada no *flow through*, o que leva a concluir que CfCLEr foi retida totalmente na coluna durante a purificação. Neste sentido, ao comparar o rendimento das estratégias de purificação (Tabela 6) é possível concluir que a troca catiônica utilizando capto S em pH 3,6 é o método mais adequado dentre aqueles testados.

Além disso, nota-se que a escolha de um recombinante resistente a metanol e maior produção de proteínas em escala de bancada utilizado 0,5% de indutor foi refletida nos valores obtidos de atividade total (U). Uma vez que os recombinantes selecionados suportavam concentrações superiores a de trabalho, possibilitando um acúmulo de metanol temporário sem que a célula entrasse em senescência. É possível também notar na Tabela 6 que a atividade enzimática foi reduzida após os processos de concentração e purificação na troca catiônica. Acreditamos que isso ocorra devido ao efeito do pH ácido sobre a enzima, uma vez que o pH do sobrenadante (5,0) foi reduzido durante a etapa de concentração e troca de tampão para acetato (3,6). Conservando o valor da atividade na etapa de dessalinização e troca de tampão por fosfato (7,0). Porém, apesar da perda de atividade nas etapas supracitadas, o rendimento e atividade enzimática total (U) recuperada foi maior que os valores obtidos pela purificação de afinidade, sendo a troca catiônica estabelecida como a metodologia para purificar CfCLE. Assim, uma vez estabelecido este método a próxima etapa foi o escalonamento da produção da enzima em sistema

controlado de biorreator, para obter maior massa de células e consequentemente maior secreção de enzimas.

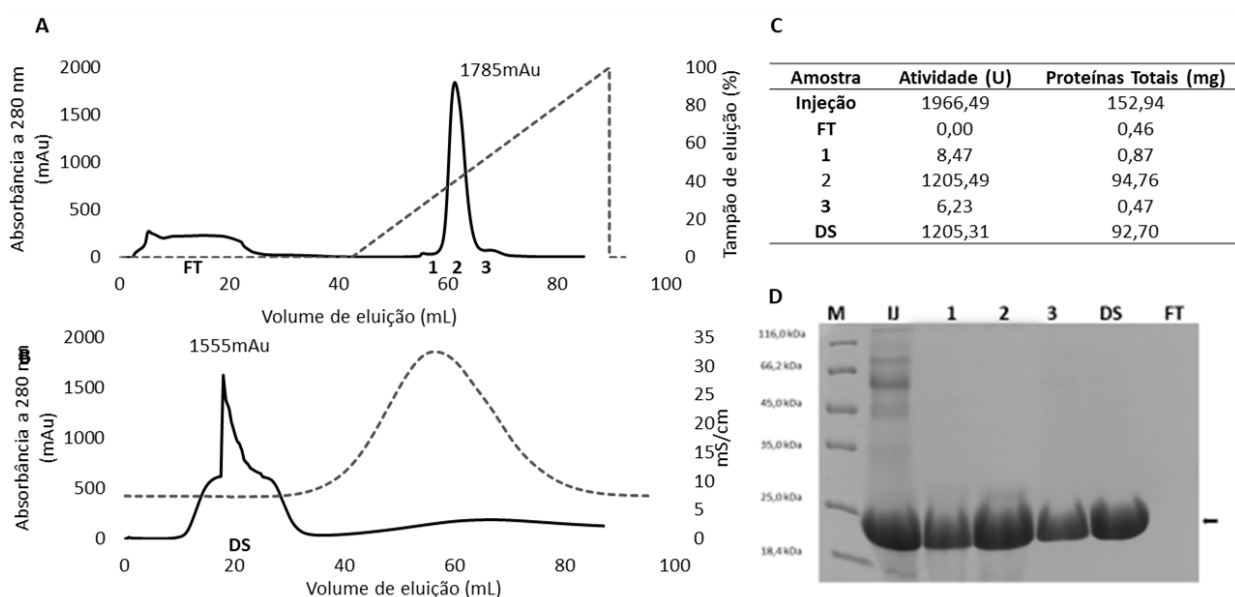


Figura 21. Resultado da purificação por troca catiônica. (A) Perfil cromatográfico obtido para a purificação da CfCLer, por cromatografia de troca catiônica em coluna Capto S, a partir do sobrenadante de 96 horas de indução com 1,5% metanol do recombinante 26, mostrando as curvas de A280 (mAu) (linha contínua), concentração percentual do tampão B (%B) (linha tracejada), em função do volume de eluição (mL). (B) Perfil cromatográfico obtido para a purificação da CfCLer, por cromatografia de *Dessalting* (DS), a partir do produto de purificação por troca catiônica, mostrando as curvas de A280 (mAu) (linha contínua), concentração percentual de sal (linha tracejada), em função do volume de eluição (mL). (C) Quantificação da atividade e proteínas totais das amostras coletadas ao longo da purificação por troca catiônica. (D) Gel SDS-PAGE 15% do produto da purificação. (M) marcador de massa molecular; (IJ) Amostra injetada na coluna de troca catiônica; (1) frações dos pontos laterais direito da amostra purificada; (2) frações dos pontos centrais da amostra purificada; (3) frações dos pontos laterais esquerdo da amostra purificada; (DS) produto da dessalinização; (FT) *flow through* que não se ligou a coluna de troca catiônica.

Tabela 6. Tabela de rendimento do processo de purificação

Fase	Volume (mL)	Proteína total (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade (U/mL)	Atividade (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de Purificação	Fator de atividade	Rendimento
Sobrenadante	500	0,53	266,41	5,25	2627,62	9,86	-	-	-
Concentrado	25	7,11	177,94	78,65	1966,49	11,05	-	1,12	-
Afinidade	7,2	2,36	17,00	66,92	481,88	28,33	2,56	2,56	25%
Dessalting	7,2	2,30	16,62	95,25	685,86	41,25	3,73	1,45	142%
Sobrenadante	500	0,53	266,41	5,25	2627,62	9,86	-	-	-
Concentrado	25	7,11	177,94	78,65	1966,49	11,05	-	1,12	-
Troca catiônica	12,6	7,52	94,76	960,46	12101,89	127,69	1,05	1,15	62%
Dessalting	12,6	7,95	100,26	1200,65	15128,31	150,88	1,05	1,18	125%

Fator de purificação: divisão do valor de proteína total observado sobre o valor anterior

Fator de atividade: divisão do valor de atividade específica observado sobre o valor anterior

Rendimento: divisão do valor de atividade total observado sobre o valor anterior

5.6 PRODUÇÃO DE CfCLER EM BIOREATOR

5.6.1 Produção em pequena escala em condições controladas: Estratégia I

A partir dos resultados da expressão da proteína de interesse em frascos agitados com baixa densidade celular, o próximo passo tomado foi a padronização de um processo de produção em biorreator para a construção de uma futura tecnologia viável tecnicamente para aplicação industrial.

Para atingir elevados níveis de biomassa e sucesso no escalonamento do bioprocessos, foi necessário que se mantivesse níveis apropriados de oxigênio dissolvido (dO_2) em cultura, uma vez que o metabolismo da *K. phaffii* requer grandes quantidades de oxigênio para expressão proteica (Khatri *et al.*, 2011). Assim, os parâmetros mantidos no processo foram: dO_2 fixado em 30%, pH em 5,0 e a temperatura em 30°C. Do mesmo modo, o bioprocessos foi controlado por uma cascata baseada em agitação e injeção de ar comprimido na cultura. Desta forma, foi importante ter um ajuste fino e controlado da agitação e aeração (Moucha *et al.*, 2003). Ademais, a alimentação de hidróxido de amônio para a correção do pH forneceu uma fonte de nitrogênio.

Além disso, foi utilizado uma estratégia padronizada e comum na literatura para a produção de proteínas heterólogas em culturas de *K. phaffii* de alta densidade celular em biorreatores (*Pichia Fermentation Process Guidelines* - Invitrogen); consistindo em um primeiro estágio de batelada em um meio com fontes de carbono não indutivo, como o glicerol, para o ganho de biomassa (Inan & Meagher, 2001). Durante esta fase, a expressão da proteína heteróloga é inibida pela presença de glicose ou glicerol. Posteriormente, com a depleção completa de glicerol do meio de batelada, iniciou-se a segunda fase com a adição de glicerol em concentrações limitantes para o crescimento. Em seguida, após o esgotamento do glicerol, inicia-se alimentação em níveis graduais de metanol para o processo de transição de fonte de carbono e, por fim, na fase de indução, ocorre adição de metanol ao meio (Inan & Meagher, 2001) para atingir níveis constantes deste. Assim, este foi considerado o procedimento padrão para definir estratégias a serem adotadas e desenhadas para cada bioprocessos.

A fim de se estudar a capacidade de escalonamento da produção da CfCLER pelo recombinante 26, visando aplicação biotecnológica industrial, estratégias de produção da proteína

em 700 mL de cultura em biorreator foram analisadas. Neste sentido, a primeira estratégia avaliada era composta por: (I) fase inicial de batelada para obtenção de biomassa, (II) fase de depleção do substrato; (III) fase de batelada alimentada com glicerol e PTM (Substrato A); (IV) fase de esgotamento do glicerol; (V) fase de transição para substrato metanol e (VI) fase de batelada alimentada com metanol e PTM (Substrato B).

Na Figura 22 é possível analisar o comportamento da cepa, os parâmetros e as leituras de agitação, aeração e oxigênio dissolvido na cultura (dO_2) (A), níveis de turbidez, base consumida e massa celular obtida (B), Metanol consumido, atividade enzimática e concentração de proteína (C) e glicerol consumido, exaustão de O_2 e CO_2 da dorna (D) durante o bioprocesso. A Tabela 7 mostra os dados e as configurações relacionadas às linhas de alimentação de substrato atreladas a cada etapa do bioprocesso, seus respectivos tempos de duração e fluxos.

A partir dos resultados é possível observar que o crescimento celular foi desacelerado após a fase II de esgotamento do glicerol. Resultados similares são observados na literatura, uma vez que o metanol pode ser tóxico para células em elevadas concentrações, reduzindo sua taxa de crescimento (Minning *et al.*, 2001). Como esperado, a atividade enzimática e quantidade de proteínas totais, no sobrenadante de cultura, aumentaram em função do tempo após o início da alimentação com indutor metanol a partir da fase VI. Neste sentido, a estratégia de bioprocesso adotada foi baseada na resposta aos picos na leitura de dO_2 e no perfil de exaustão de gases (O_2 e CO_2) na saída da dorna. Picos abruptos nas leituras de dO_2 (II e IV), correspondem à redução na utilização do O_2 fornecido no meio para o metabolismo das células, indicando o esgotamento da fonte de carbono principal e consequentemente uma redução em sua atividade metabólica (Seman *et al.*, 2014). Uma vez que, quanto mais ativo o metabolismo da levedura maior a liberação de CO_2 e, concomitantemente são requeridas maiores concentrações de O_2 no interior da célula. Assim, a análise desses perfis pôde ser utilizada como diretriz das condições metabólicas do bioprocesso em tempo real.

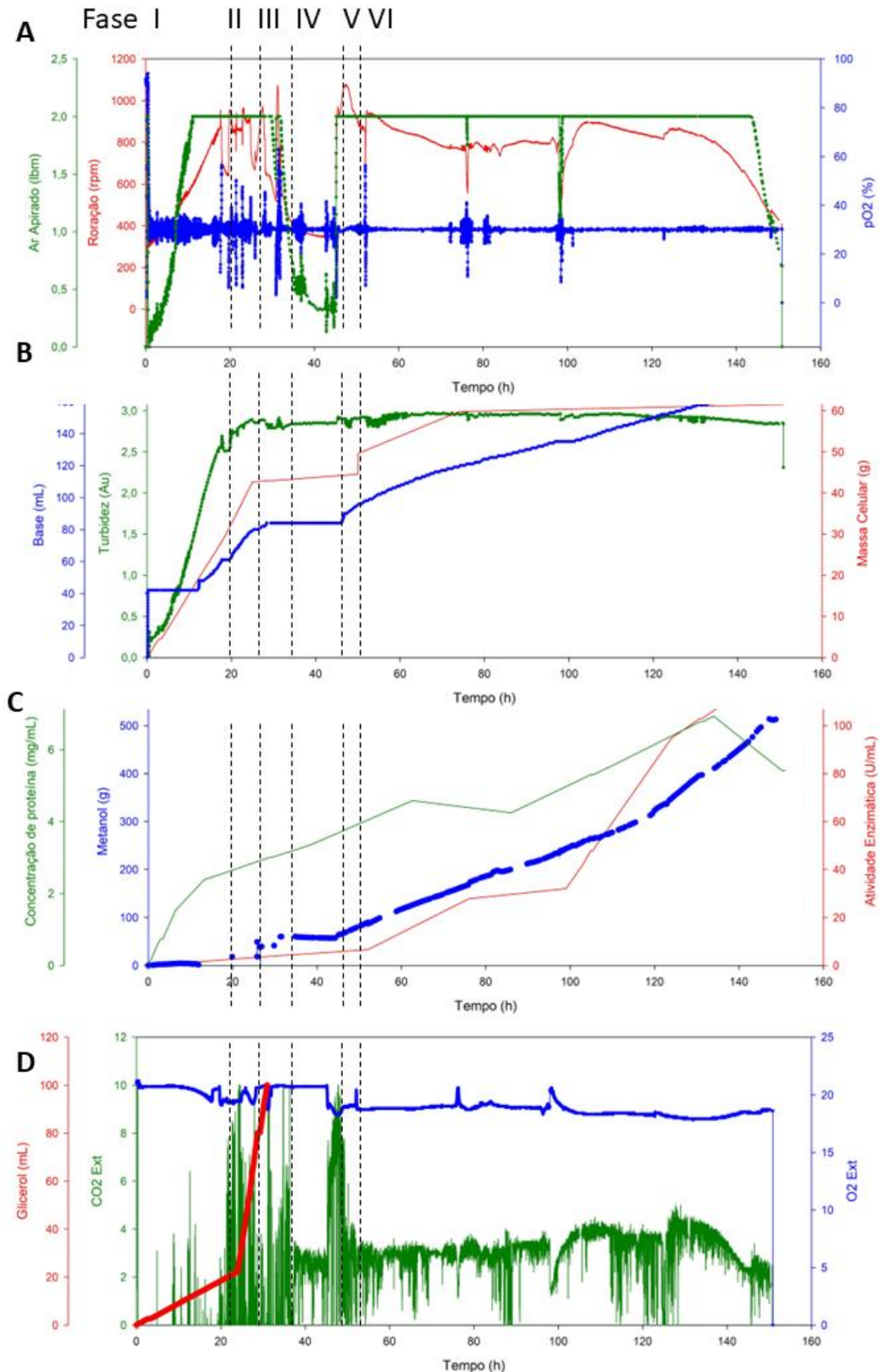


Figura 22. Produção de bancada em biorreator possessor I. Bioprocesso dividido em seis fases, indicadas na parte superior do gráfico: (I) Fase de Batelada em Glicerol; (II) Fase de Depleção de Substrato; (III) Fase de Batelada Alimentada com Glicerol; (IV) Fase de Depleção de Substrato; (V) Fase de transição com metanol; (VI) Fase de Batelada Alimentada com Metanol. (A) Curvas de agitação, aeração e oxigênio dissolvido na cultura (dO₂); (B) Curvas de turbidez, base consumida e massa celular obtida; (C) Curvas de metanol consumido, atividade enzimática e concentração de proteína e (D) Curvas de glicerol consumido, exaustão de O₂ e CO₂ da dorna.

Tabela 7. Linhas de alimentação e valores de fluxo por fase do bioprocesso piloto.

Fase	Tempo inicial (h)	Volume Final (L)	Linha de Alimentação	Duração de Alimentação (h)	Fluxo de Alimentação (mL h ⁻¹)
I	0	0,7	-	-	-
II	16	0,7	-	-	-
III	19	0,8	Glicerol 50% (w/v) + PTM1 1,2% (v/v)	6	5,3
IV	25	0,8	-	-	-
V	26	0,8	Metanol 100% (v/v) + PTM1 1,2% (v/v)	6	2,1
VI	32	0,8	Metanol 100% (v/v) + PTM1 1,2% (v/v)	118	5

O período gasto para o consumo do excesso da fonte de glicerol (fase I à IV) foi relativamente longo (40h), de tal modo que a fase de alimentação deve ser mais bem trabalhada para que se possa atingir os níveis de biomassa desejados, sem que isto atrapalhe ou atrase o período da fase de indução que se dá logo em seguida. Isto porque as células podem sair da fase exponencial de maior produção enzimática devido as necessidades adaptativas do meio como: demanda de oxigênio, oferta de carbono e nitrogênio e formação de metabólitos secundários como formaldeídos; para entrar em uma de senescência, onde a expressão proteica é reduzida e a ocorrência de lise celular leva a liberação de proteases para o sobrenadante que degradam parte das proteínas de interesse secretadas (Duan *et al.*, 2017). Bischoff e colaboradores (2015) relatam em seu trabalho um processo fermentativo com duração semelhante, com um período de batelada de 40h, atingindo produção máxima de cutinase em 160h de bioprocesso. Outros trabalhos foram capazes de reduzir o pico de produção enzimática para intervalos menores, reduzindo o período de batelada em glicerol e mantendo um controle maior sobre alimentação com metanol (Tabela 8). Dentre estes, podemos citar o trabalho de Duan e colaboradores (2017), com 135h de bioprocesso e de Samen e colaboradores (2014), com 30h de batelada em glicerol e um bioprocesso que durou 78h, aumentando a atividade e concentração de proteínas no sobrenadante.

Tabela 8. Taxas de produção e purificação de cutinases recombinantes produzidas em sistema heterólogo

Nome	Organismo de origem	Aplicação	Cepa	Produzido em	Atividade do Sobrenadante		Atividade da Amostra Purificada		Taxa de Purificação (%)	Referência
					U/mL	U/mg	U/mL	U/mg		
CfCLE	<i>Cryptococcus flavus</i>	Degradação de bioplásticos	GS115	800mL	39,18	7,25	90,186	13,63	25	Este trabalho Estratégia I
CfCLE	<i>Cryptococcus flavus</i>	Degradação de bioplásticos	GS115	800mL	320	154,41	9095	479,43	62	Este trabalho Estratégia II
ACUT2	<i>Arxula adenivorans</i> LS3	Degradação de bioplásticos	A. adenivorans	3L	1064	-	-	497,4	32,1	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
McCut	<i>Malbranchea cinnamomea</i>	Produção de combustível	GS115	1,5L	12536	-	-	1181,6	88,3	Duan <i>et al.</i> , 2017
-	<i>Fusarium solani pisi</i>	-	S. cerevisiae SU50	1,5L	840	-	-	380	-	Calado <i>et al.</i> , 2004
CcCUT1	<i>Coprinopsis cinerea</i>	-	Trichoderma reesei	20L	479	-	-	-	-	Kontkanen <i>et al.</i> , 2009
-	<i>Trichoderma reesei</i>	Degradação de triglicerídeos	Tr VTT D-00775 cbh1	20L	-	136	-	-	-	Roussel <i>et al.</i> , 2014
-	<i>Glomerella cingulata</i>	-	GS115	2L	434	-	-	93	-	Seman <i>et al.</i> , 2014
-	<i>Thermobifida fusca</i>	-	Escherichia coli	3L	2258,50	-	-	5,1	-	Su <i>et al.</i> , 2015

Alguns dos parâmetros medidos ao longo do bioprocesso podem ser observados na Tabela 9. O acúmulo de metanol foi frequentemente observado durante as tentativas de estabelecimento do bioprocesso de produção Estratégia I. Consequentemente, as tentativas de reprodução dos fluxos de alimentação de metanol na fase de indução, relatados na literatura, causaram senescência da cultura em médio prazo, apesar da determinação fenotípica Mut⁺ do recombinante 26. Sendo assim, outro ponto chave a ser trabalhado é a manutenção de níveis estáticos da concentração de metanol em cultura durante a fase de indução, para uma melhor robustez do bioprocessamento em desenvolvimento.

Tabela 9. Variáveis observadas na fase de indução do Estratégia I.

Tempo de bioprocessamento (h)	19	25	50	74	86	110	133	150
Tempo de Indução (h)	-	-	25	49	61	85	108	125
WCW (g.L-1)	104,65	184,2	197,1	198,7	199,9	207,6	209,15	214
DCW (g.L-1)	28,65	42,7	44,6	54,79	55,15	56,95	58,65	61,53
Proteína Sobrenadante (mg.mL-1)	1,52	2,38	3,36	4,58	4,24	5,57	6,92	5,40
Atividade Sobrenadante (U.mL-1)	3,04	3,48	33,64	38,32	33,85	37,30	37,30	39,18
Atividade Específica Sobrenadante (U.mg-1)	1,99	1,46	9,98	8,36	7,97	6,69	5,38	7,25

*WCW – Peso em células úmidas

**DCW – Peso em células secas

5.6.2 Purificação do sobrenadante do Estratégia I

Posteriormente, o sobrenadante de cultivo foi concentrado para um volume de 100 mL, do qual 5 mL foram separados para purificação em coluna de troca catiônica capto S. Assim, foi possível observar no resultado da purificação (Figura 23A) a formação de um único pico de 2730 mAu referente a CfCLer purificada. Após avaliação da atividade (Figura 23C), as frações centrais foram reunidas e submetidas à dessalinização (Figura 23B), seguida de eletroforese em gel SDS-PAGE 15% (Figura 23D), na qual foi possível observar bandas únicas próximas a 25 KDa. Nenhuma atividade foi observada no *flow through*, o que leva a concluir que CfCLer foi completamente separada do meio de cultura. Também, o valor de atividade obtido da purificação

de apenas 5mL de sobrenadante do fermentador demonstra o potencial de escalonamento do recombinante selecionado.

Um importante destaque observado foi a diferença entre o produto da purificação do biorreator em comparação ao shaker. Nota-se na canaleta 1 (Figura 23D) que as proteínas de massa molecular superior a 25kDa encontram-se com bandas menos intensas que as observadas no crescimento em shaker, sugerindo uma redução da morte celular no cultivo em biorreator. Este processo é relatado na literatura estando diretamente relacionado a excesso de metanol em biorreatores ou a falta da fonte de carbono indutora em shakers (Urbanek *et al.*, 2021). Assim, com intuito de reduzir a lise celular e o extravasamento de proteases, buscamos nas etapas posteriores monitorar a concentração de metanol como uma possível estratégia para evitar a morte celular.

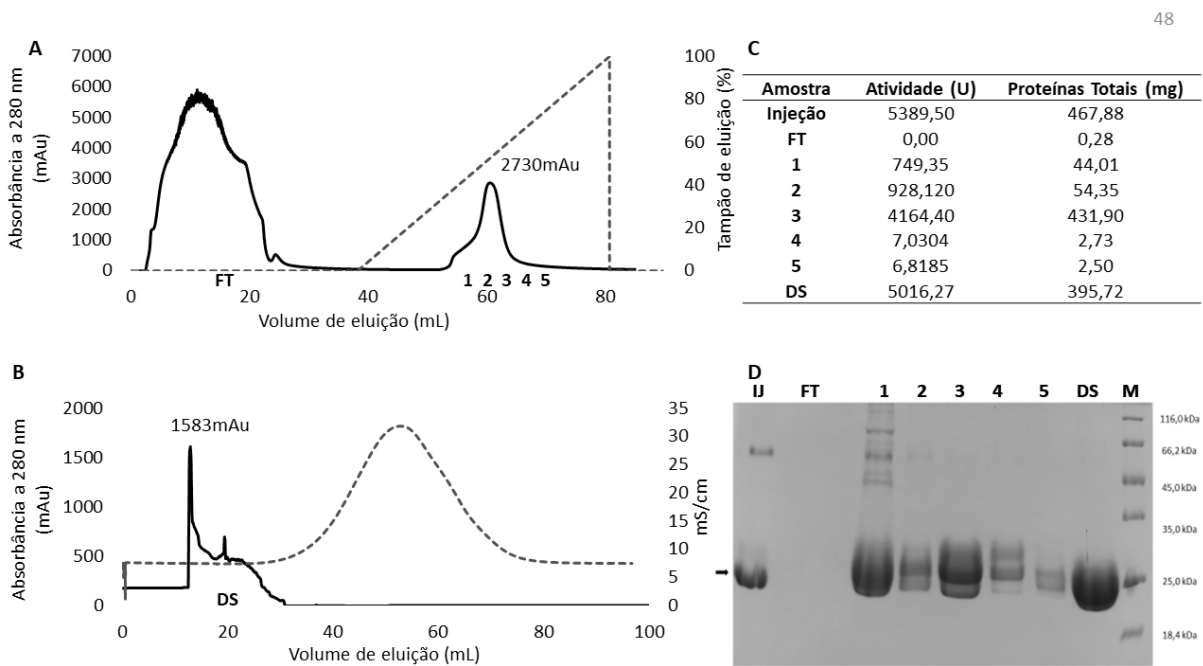


Figura 23. Resultado da purificação por troca catiônica do sobrenadante de cultura do fermentador. (A) Perfil cromatográfico obtido para a purificação da CfCLer, por cromatografia de troca catiônica em coluna Capto S, a partir do sobrenadante de cultivo em biorreator do recombinante 26, mostrando as curvas de A280 (mAu) (linha contínua), concentração percentual do tampão B (%B) (linha tracejada), em função do volume de eluição (mL). (B) Perfil cromatográfico obtido para a purificação da CfCLer, por cromatografia de *Dessalting* (DS), a partir do produto de purificação por troca catiônica, mostrando as curvas de A280 (mAu) (linha contínua), concentração percentual de sal (linha tracejada), em função do volume de eluição (mL). (C) Quantificação da atividade e proteínas totais das amostras coletadas ao longo da purificação por troca catiônica. (D) Gel SDS-PAGE 15% do produto da purificação. (II) Amostra injetada na coluna de troca catiônica; (FT) *flow through* que não se ligou a coluna de troca catiônica; (1-2) frações dos pontos laterais direito da amostra purificada; (3) frações dos pontos centrais da amostra purificada; (4-5)

frações dos pontos laterais esquerdo da amostra purificada; (DS) produto da dessalinização; (M) marcador de massa molecular.

5.6.3 Estratégia de produção em biorreator com monitoramento do metanol em tempo

real: Estratégia II

As opções convencionais de monitoramento de metanol em cultura de *K. phaffii* são classificadas em técnicas *online* e *off-line*. Ao compará-las, observa-se que os sistemas *off-line* apresentam uma qualidade e confiabilidade superiores de detecção e quantificação, como técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia gasosa (CG). Porém, os métodos *online* eliminam a necessidade da coleta de amostras e o atraso na obtenção de informações sobre o bioprocessamento, que podem ser cruciais na tomada de decisões em sua condução (Yang *et al.*, 2018).

Entre as estratégias *online*, o mercado da indústria de biorreatores comercializa sondas imersas de monitoramento das concentrações de metanol que são ideais para o monitoramento em tempo real. Estas sondas são autoclaváveis e têm sido empregadas em diversos estudos fermentativos em *K. phaffii* (Hang *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2018). No entanto, essas sondas apresentam um valor mínimo de aproximadamente oito mil euros, o que dificulta seu acesso e aquisição.

Neste sentido, nós do Laboratório de Biologia Estrutural e Biotecnologia do ICB desenvolvemos uma sonda de detecção de vapor de metanol para saída de gases do bioreator, baseado em sensores MQ que detecta álcoois voláteis acoplado a um sistema eletrônico com interface para controle analógico e digital. Posteriormente, testes de aplicabilidade, operacionalidade, faixas de leitura e obtenção das curvas de correlação entre a leitura do sensor e concentrações padrão de metanol no próprio biorreator B-DCU Sartorius Stedim (2L) foram executados pela equipe do Laboratório de Biologia Estrutural e Biotecnologia do ICB/UFMG, e descritos em Lobato (2022). No qual colaborei diretamente com a padronização e calibração do sensor e ensaios de operacionalidade e aplicabilidade.

Além do monitoramento do metanol, outro ponto chave modificado foi a fase inicial de obtenção de massa celular, pois é sabido que subprodutos do metabolismo do glicerol, como etanol, podem reprimir o promotor AOX1 (Ding *et al.*, 2014). Assim, pequenas concentrações de etanol podem levar a formação de células com citoesqueletos não funcionais e características dinâmicas irregulares durante a fase de cultivo, podendo ser responsável pelas instabilidades do bioprocessamento. (Yu *et al.*, 2010). Ding e colaboradores (2013) determinaram que o acúmulo de etanol (>6g/L) por longo período (>4h) na fase de batelada alimentada com glicerol reprime irreversivelmente o promotor da enzima álcool oxidase, levando a instabilidade de produção de proteínas recombinantes. Nesse sentido, a remoção da fase de batelada alimentada com glicerol e redução na concentração de glicerol da etapa de batelada podem controlar a produção de etanol (Gao *et al.*, 2012).

Desta forma, o protocolo foi executado seguindo o mesmo procedimento utilizado na Estratégia I, com algumas modificações que compõem a nova estratégia: (1) monitoramento da concentração de metanol no meio de cultura durante a fase de indução e (2) remoção da fase de batelada alimentada de glicerol e da fase de depleção de substrato seguinte a essa (Fases III e IV da estratégia I).

Os parâmetros de cascata para esse processo também foram alterados, visando um maior controle do oxigênio dissolvido principalmente nas primeiras doze horas, que mostraram muita oscilação na estratégia I, o que pode prejudicar a cultura celular. Como descrito na Tabela 10, nos parâmetros de controle em cascata para manutenção de dO_2 a 30%, o piso da cascata de agitação em relação a estratégia I foi reduzido para 200 rpm e o teto da cascata de ar comprimido elevado a 4,5 Lpm, para comportar a alta demanda por oxigênio. A combinação de faixas de operacionalidade da cascata mais amplas permitiu uma melhor aeração do sistema mantendo níveis de agitação menores que a estratégia I, evitando níveis hostis de cisalhamento à cultura.

Tabela 10. Parâmetros de controle da cascata de dO₂ do biorreator.

Estratégia	Aeração		Agitação	
	dO ₂ output (%)	Setpoint (lpm)	dO ₂ output (%)	Setpoint (rpm)
I	0	0	0	300
	25	2	25	300
	100	2	100	1800
II	0	0	0	200
	23	2	100	1600
	68	2	-	-
	90	4	-	-
	100	4,5		

Após algumas tentativas no estabelecimento deste bioprocesso, foi possível obter os parâmetros e variáveis que aprimoraram o processo registrados em cada fase, bem como seus tempos de duração que podem ser avaliados na Figura 24 e Tabela 11. A partir dos resultados é possível observar o aumento da massa celular obtida em um menor tempo de cultivo quando comparado a estratégia I. Sendo este um resultado favorável para aplicação comercial pois reduz o tempo de produção da enzima, um fator importante para a indústria. Além disso, foi possível observar uma maior produção da proteína de interesse, possivelmente devido a: (I) redução da produção de etanol que inibe o promotor AOX e (II) o controle dos níveis de metanol através do sensor. Para isto, foram estabelecidas leituras mínimas e máximas do sensor, como limites para manutenção de metanol em solução; correspondendo a uma faixa entre 0,4% e 0,6% (v/v) em dorna, para regular o fluxo da alimentação de metanol ao meio de cultura. No início, o controle de alimentação foi realizado por pulsos, adicionados quando as leituras do sensor atingiam o limiar inferior. Com a aceleração do metabolismo celular e adaptação ao metanol como fonte de carbono, o ritmo de consumo foi aumentando, o que permitiu uma alimentação contínua.

Tabela 11. Dados de crescimento celular e produção obtidos por etapa na Estratégia II

Etapa	Tempo (h)	WCW (g.L ⁻¹)	DCW (g.L ⁻¹)	Proteína Sobrenadante (mg.mL ⁻¹)	Atividade Sobrenadante (U.mL ⁻¹)	Atividade Específica Sobrenadante (U.mg ⁻¹)
Fim do Ganho de Biomassa	19	122	202	0,51	4,19	8,11
Fim da Indução	38	138	229	2,07	320,48	154,41

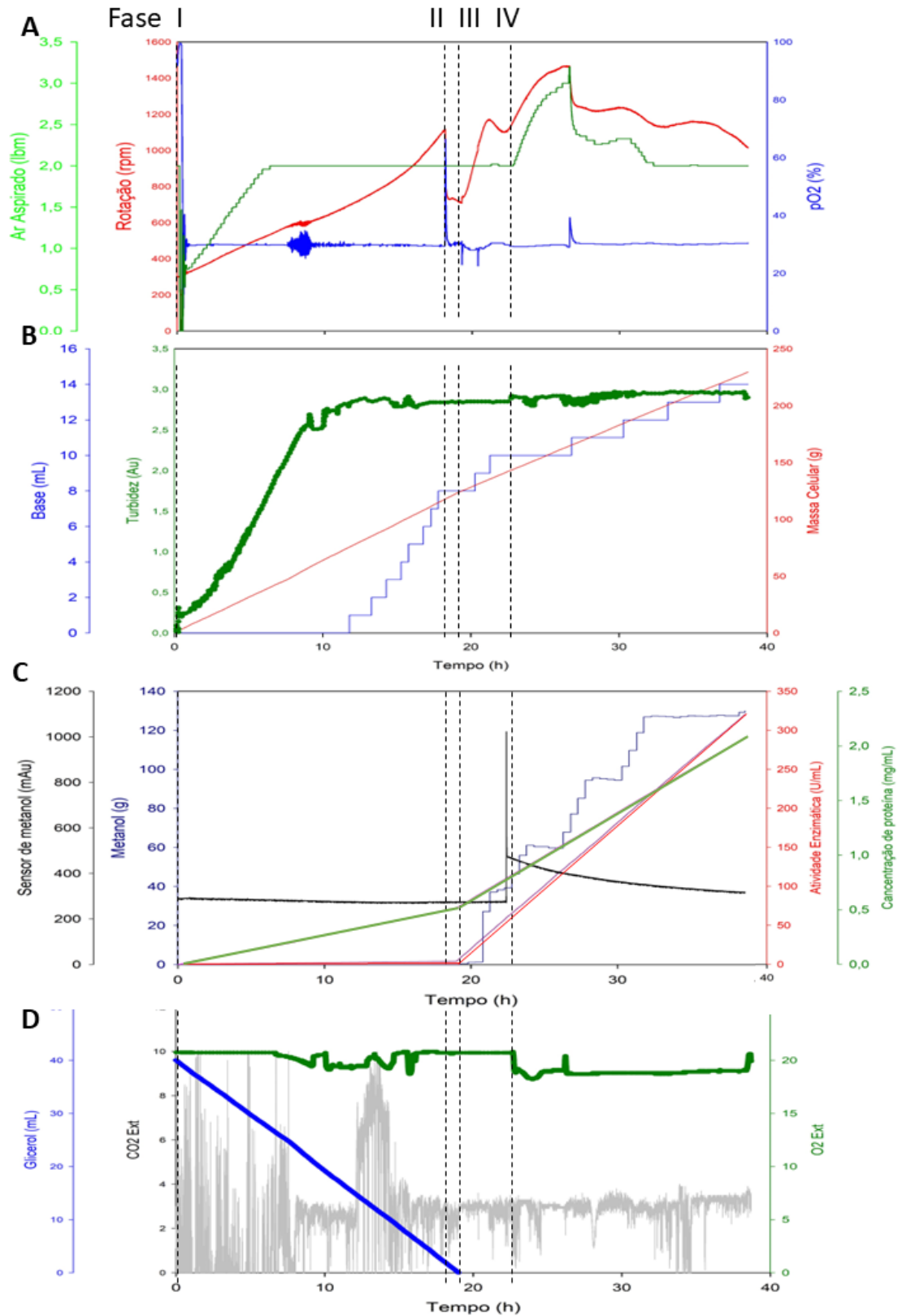


Figura 24. Estratégia II em biorreator. Bioprocesso dividido em quatro fases, indicadas na parte superior do gráfico: (I) Fase de Batelada em Glicerol; (II) Fase de Depleção de Substrato; (III) Fase de transição com metanol; (IV) Fase de Batelada Alimentada com Metanol. (A) Curvas de agitação, aeração e oxigênio dissolvido na cultura (dO₂); (B) Curvas de turbidez, base consumida e massa celular obtida; (C) Curvas de metanol consumido, sensor de metanol, atividade enzimática e concentração de proteína e (D) Curvas de glicerol consumido estimado, exaustão de O₂ e CO₂ da dorna.

Assim, a nova estratégia, sem a fase de batelada alimentada por glicerol, resultou em um bioprocesso de produção mais curto que a estratégia I em cerca de 120 horas, mas uma produção total de atividade enzimática 2,8 vezes superior a partir de 2,62 mais células. Na estratégia I, ao fim do bioprocesso de aproximadamente 150 horas, foram produzidos 114,23 U.mL⁻¹, com uma biomassa de 61,5 g.L⁻¹ em peso úmido; o que resultou em uma atividade enzimática produzida na média de 1,85 U.g⁻¹ de célula por hora de cultivo. Já na estratégia II, em aproximadamente 38 horas foram produzidos 320,48 U.mL⁻¹, com uma biomassa de 160,63 g.L⁻¹. Isso resultou em uma produção enzimática com uma média de 1,99 U.g⁻¹ de célula por hora de cultivo. A redução no tempo de execução apresenta um ganho em produtividade por tempo; e o resultado como um todo sugere fortemente o controle dos níveis de metanol como uma estratégia de grande relevância para garantir a manutenção do tempo de indução e consequente produção da proteína alvo.

Pela análise dos níveis em biomassa obtidos na literatura, avaliando-se os trabalhos apresentados na Tabela 8 Seman e colaboradores (2014) atingiram o maior nível de produção de biomassa em biorreatores para expressão de cutinase em sistema heterólogo de *K. phaffii*. De maneira similar a estratégia I caracterizado neste trabalho, Seman alcançou após a fase de ganho de biomassa por batelada alimentada (30h), aproximadamente 120,0 g/L em peso de células úmidas e 320 g/L ao final do processo de indução (78h). Entretanto, a atividade enzimática (434 U/mL) e concentração de proteína (117 mg/L) foram inferiores aos observados por outros trabalhos, demonstrando a dificuldade de se estabelecer um controle rígido em bioprocessos de elevadas densidades. Em contrapartida, Duan e colaboradores (2017) alcançaram 86,3 g/L de células em 132h de bioprocessos, com uma atividade de 12536 U/L e uma concentração de proteínas de 10,8 g/L. Analisando-se os dados do período de indução obtidos com a estratégia II, a fase teve duração de aproximadamente 30 horas. No entanto, diferentemente da estratégia I (onde não houve ganho significativo em biomassa na fase de indução), houve crescimento celular durante a etapa de indução por metanol: iniciando com aproximadamente 122,8 g.L⁻¹ em peso de células úmidas e alcançando 138,6 g.L⁻¹ ao fim do bioprocessos. Um ganho em biomassa na fase de indução que representa

aproximadamente 12,8% do montante final obtido pelo bioprocesso. Esse resultado consolida a hipótese de que a manutenção da concentração de etanol através da redução do excesso de glicerol durante a fase de ganho de biomassa junto a uma otimização das fases iniciais poderia acarretar ganhos em produção da proteína alvo. Ainda, como já foi discutido neste trabalho, o clone produtor apresenta uma expressão proteica atrelada ao crescimento. O perfil de crescimento em biomassa proporcional ao aumento nos níveis de proteína total e atividade cutinase no sobrenadante pode ser confirmado na Figura 24.

Com relação aos fluxos de alimentação, Duan e colaboradores (2017) descrevem uma indução média de 10 mL/h/L enquanto Samen e colaboradores descrevem um fluxo mínimo de 7,5mL/h/L e um fluxo máximo de 15 mL/h/L de metanol. O meio FBS de batelada de Duan *et al.*, (2017) era composto pela mesma quantidade de glicerol da estratégia II deste trabalho (40g) em maior concentração (85%) de sais (CaSO₄, 0.93; K₂SO₄, 18.2; MgSO₄·7H₂O, 14.9; KOH, 4.13; glycerol, 40.0; 85% H₃PO₄, 26.7 mL/L). Já as concentrações utilizadas para batelada alimentada de glicerol e metanol eram semelhantes a estratégia I deste trabalho.

5.6.4 Purificação do sobrenadante da estratégia II

Posteriormente, o sobrenadante de cultivo foi concentrado para um volume de 100 mL, do qual 5 mL foram submetidos à purificação de troca catiônica capto S. Assim, é possível observar no resultado da purificação (Figura 25A) a formação de um único pico de 2870 mAu referente a CfCL_{Er} purificada. Após avaliação da atividade (Figura 25C), as frações centrais foram reunidas e submetidas a gel filtração (Figura 25B), seguida de eletroforese em gel SDS-PAGE 15% (Figura 25D), na qual foi possível observar bandas únicas próximas a 25 KDa. Nenhuma atividade foi observada no *flow through*, o que leva a concluir que CfCL_{Er} foi completamente separada do sobrenadante de cultura. Também, o valor de atividade obtido da purificação de apenas 5mL de sobrenadante do fermentador demonstra o potencial do monitoramento do metanol em tempo real e da eliminação da fase de batelada alimentada com glicerol.

Além disso, é possível notar que os contaminantes de alta massa na canaleta IJ (Figura 25D) encontra-se menos presentes no sobrenadante final do processo. Isto possivelmente está relacionado a uma redução da degradação celular promovida pelo: I) melhor controle da concentração de metanol durante a fase de indução e II) redução da produção de etanol durante a fase de crescimento promovida pela remoção da fase *feed-bath* que levava ao acúmulo de glicerol.

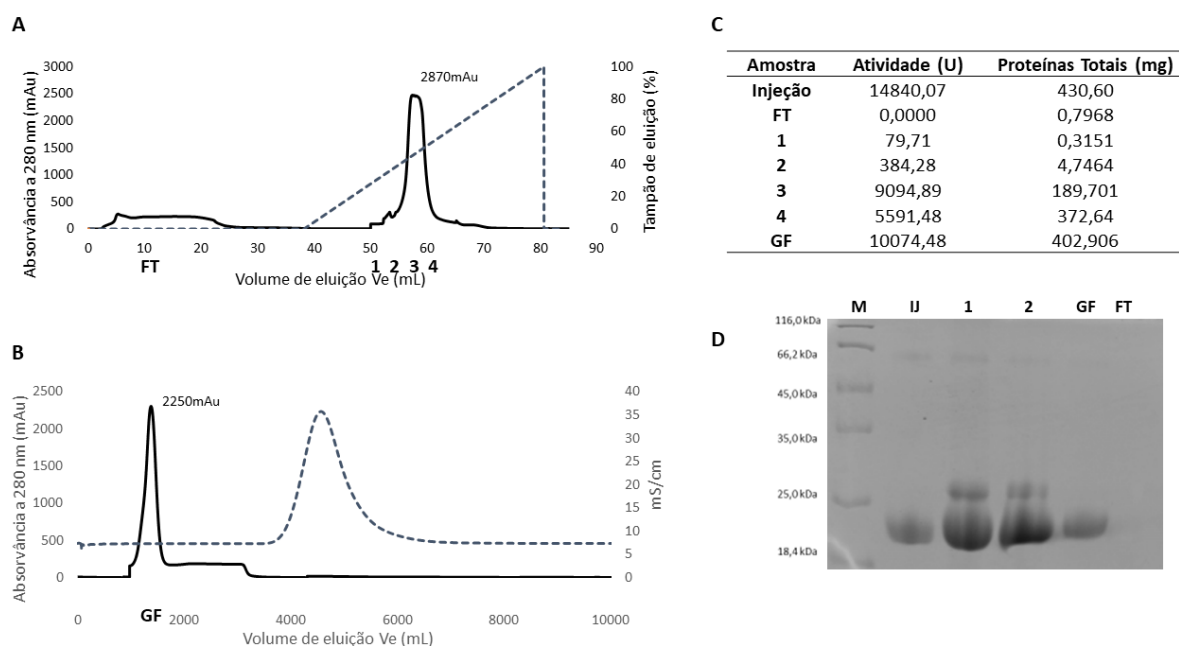


Figura 25. Resultado da purificação por troca catiônica do sobrenadante de cultura do fermentador. (A) Perfil cromatográfico obtido para a purificação da CfCLer, por cromatografia de troca catiônica em coluna Capto S, a partir do sobrenadante de cultivo em biorreator do recombinante 26, mostrando as curvas de A280 (mAu) (linha contínua), concentração percentual do tampão B (%B) (linha tracejada), em função do volume de eluição (mL). (B) Perfil cromatográfico obtido para a purificação da CfCLer, por cromatografia de gel filtração (GF), a partir do produto de purificação por troca catiônica, mostrando as curvas de A280 (mAu) (linha contínua), concentração percentual de sal (linha tracejada), em função do volume de eluição (mL). (C) Quantificação da atividade e proteínas totais das amostras coletadas ao longo da purificação por troca catiônica. (D) Gel SDS-PAGE 15% do produto da purificação. (M) marcador de massa molecular; (IJ) Amostra injetada na coluna de troca catiônica; (1D1) fração do ponto central da amostra purificada; (1D2) fração do ponto central da amostra purificada; (GF) produto da Gel Filtração; (FT) *flow through* que não se ligou a coluna de troca catiônica.

5.7 CARACTERIZAÇÃO DE CfCLer

5.7.1 Avaliação de glicosilações

Sabe-se que *K. phaffii* é capaz de realizar tanto N-glicosilação quanto O-glicosilação, e estes processos pós-traducionais podem interferir na massa molecular final das proteínas. Ao longo deste trabalho é possível observar um padrão de até 3 bandas nos géis de eletroforese localizadas próximo ao padrão de massa molecular esperado para CfCLer (25,5 kDa). Diante disso, foi

avaliada a possibilidade do padrão de 3 bandas, estar relacionado à glicosilação diferencial das proteínas.

Inicialmente foi realizada a predição de sítios de N-glicosilação no preditor NetNGlyc e a confirmação através de tratamento com PNGase, uma enzima que remove N-glicosilações. Desta forma, foi possível observar no resultado da predição (Figura 26A) que CfCLER não possui sítios de N-glicosilação, o que foi confirmado através de tratamento com PNGase (Figura 26B), no qual, não é possível observar diferença nas bandas tratadas e não tratadas.

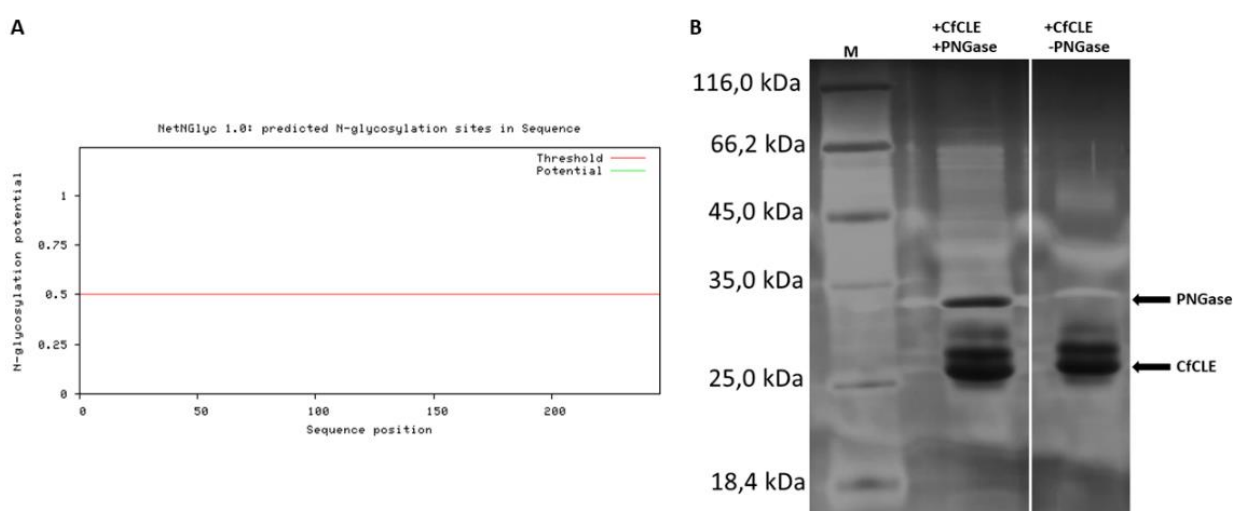


Figura 26. Esquema de identificação de N-Glicosilação. (A) Resultado da busca por motivos de N-glicosilação no NetNGlyc. Linhas verdes indicam potenciais sítios de N-glicosilação. (B) Gel SDS-PAGE 15% corado com prata. (M) padrão de massa molecular; 1ª canaleta representa a amostra tratada com PNGase; 2ª canaleta representa a amostra não tratada com PNGase. Setas indicam as bandas de interesse.

Com relação à O-glicosilação, foi realizado a sua predição na ferramenta YinOYan do ExPASy Tools e a confirmação através da eletroforese em gel SDS-PAGE 12-15% do produto da dessalinização do item 5.6 corado com fuccina e que identifica carboidratos. Desta forma, foi possível prever 10 aminoácidos passíveis de sofrer O-Glicosilação (Figura 27A), porém este resultado não foi confirmado pela coloração com fuccina (Figura 27B). Urbanek e colaboradores (2020) relatam em sua revisão que processamentos pós traducionais de O-glicosilação são raros de serem observados em *K. phaffii*, geralmente observados em vias de sinalização. Desta forma, não há relatos na literatura de cutinases O-glicosiladas (Qi *et al.*, 2022; Urbanek *et al.*, 2020;

Austin *et al.*, 2018; Nyysölä, 2015). Tomados em conjunto, estes resultados permitem refutar a possibilidade deste padrão de banda tripla ser derivado de glicosilações diferenciais da enzima.

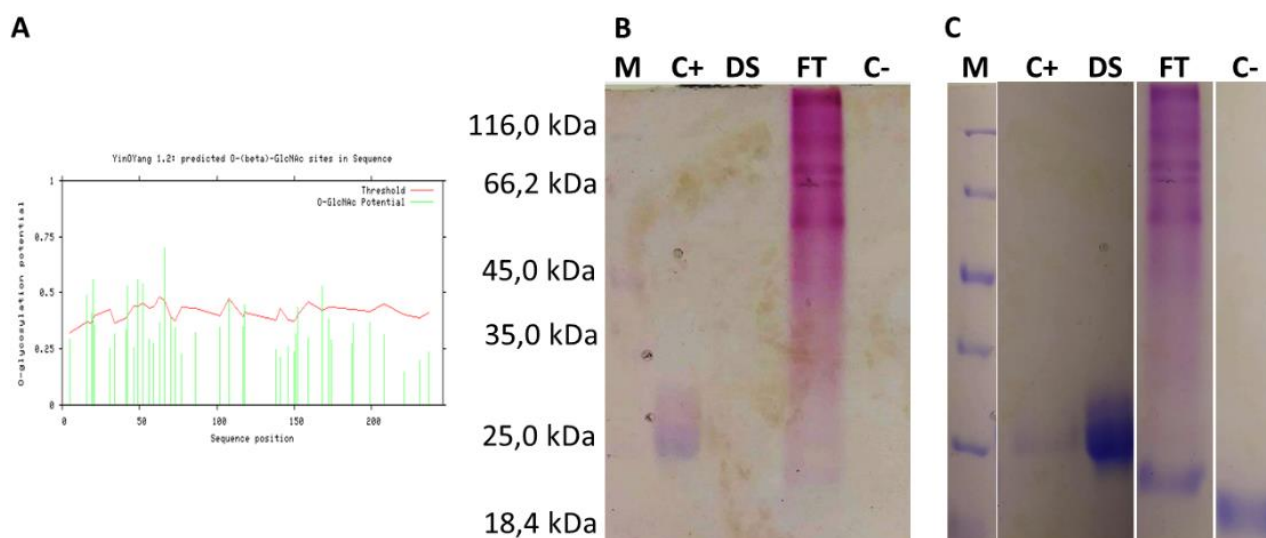


Figura 27. Esquema de identificação de O-Glicosilação. (A) Resultado da predição de potenciais sítios de O-glicosilação no YinOYang. Linhas verdes indicam potenciais sítios de O-glicosilação. (B) Gel SDS-PAGE 12-15% corado com fuccina e (C) corado com comassie. (M) padrão de massa molecular; (C+) Controle positivo; (DS) Produto da *dessalting* contendo a proteína de interesse; (FT) *Flow throw*; (C-) controle negativo.

5.7.2 Espectrometria de massa

Sabe-se que *K. phaffii* é suscetível a promover clivagem inadequadas da proteína quando a maquinária de síntese está sobrecarregada, estes processos pós-traducionais podem interferir na massa molecular final das proteínas. Diante disso, foi avaliada a possibilidade do padrão de 3 bandas, estar relacionado à clivagem diferencial das proteínas através da espectrometria de massa.

O *pool* de CfCLer purificada e dessalinizada foi submetido a uma análise por espectrometria de massa para mensurar a massa intacta e identidade da proteína recombinante produzida. Desta forma, é possível observar no resultado da análise (Figura 28) que a proteína purificada possuía 23,6 kDa, o que significa 1,9 kDa a menos que o valor esperado para CfCLer com peptídeo sinal processado e contendo cauda de histidinas (25,5 kDa). Acredita-se que isso se

deva à perda das porções N ou C-terminais devido à proteólise enzimática promovida pelas proteases secretadas por *K. phaffii*.

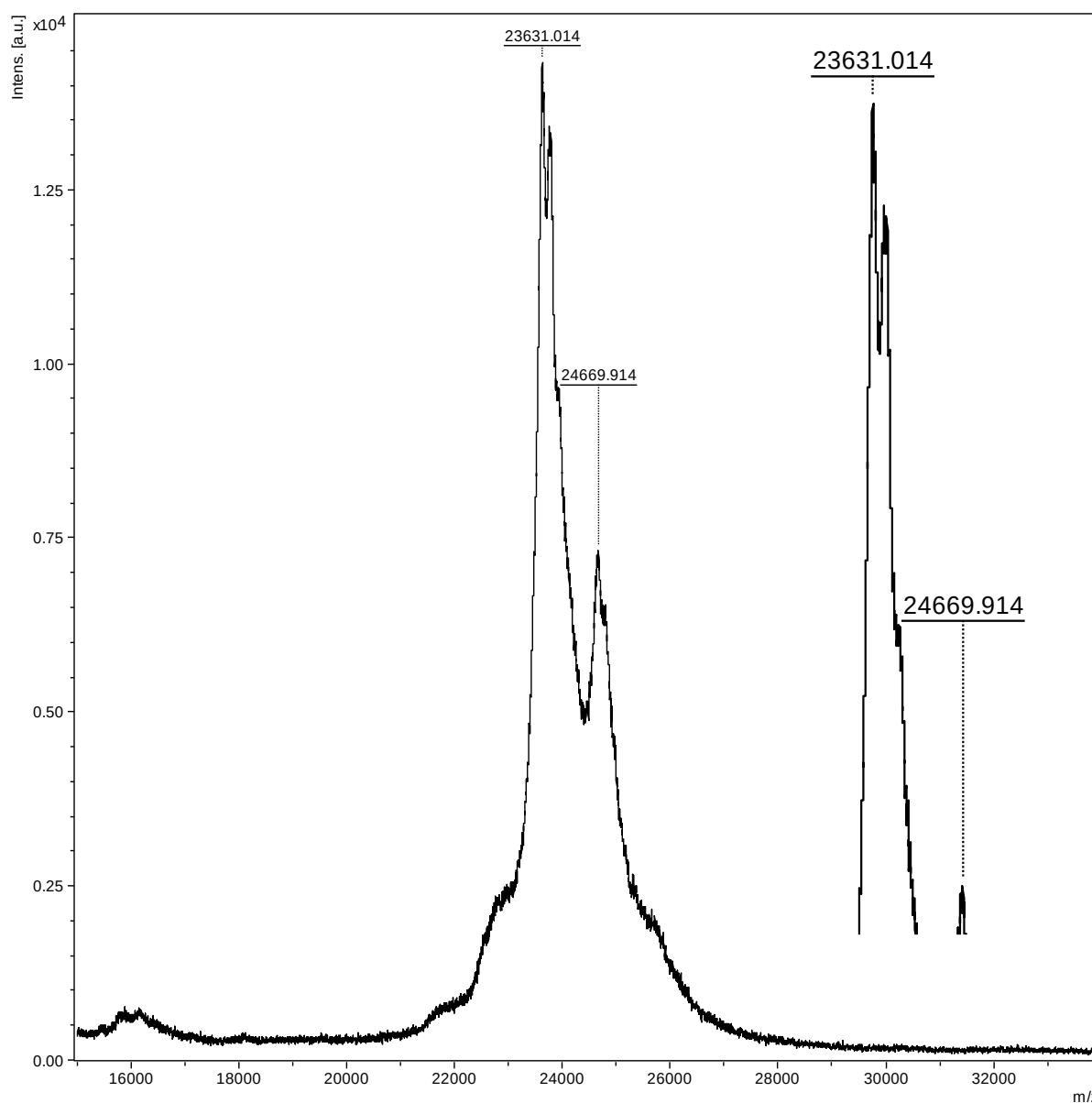


Figura 28. Espectrometria de massa total no modo linear positivo com janela de detecção 17 kDa a 35 kDa. Eixo X: relação massa carga (m/z) e eixo Y: intensidade do íon (a.u.)

Assim, para identificar a natureza das proteínas presentes nas bandas foi realizado a eletroforese em gel SDS-PAGE gradiente 12-15% com amostras que apresentavam este padrão. Isso, seguido de recorte do gel e digestão da proteína com tripsina, o que gerou peptídeos identificados e sequenciados através de espectrometria de massa MALDI-TOF MS/MS. Nesse sentido, o produto do sequenciamento para o peptídeo tríptico de cada banda pode ser observado

na Figura 29. Foi possível concluir que as 3 bandas possuem o mesmo perfil tríptico e correspondem à enzima de interesse com diferentes pesos moleculares; possivelmente devido à processamentos pós-traducionais distintos.

O padrão proteico de banda dupla e tripla também foi observado por outros pesquisadores ao expressarem proteínas recombinantes em sistema de *K. phaffii* (Oshima *et al.*, 2014; Eilert *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007; Emberson *et al.*, 2005; Reddy e Dahms, 2002). Nesses casos, os autores correlacionam o padrão ao processamento incompleto do peptídeo sinal realizado pelas proteases Kex2 e/ou Ste13. Assim, em processo de super expressão de proteínas, a maquinária de processamento pós tradicional pode ficar sobrecarregada e parte das moléculas não sofrer o processamento de forma completa, sendo assim excretada para o sobrenadante (Oshima *et al.*, 2014). Porém, para aplicação de degradação de biopolímeros a que este estudo se destina, este processamento incompleto não interfere na atividade da enzima. Logo, o foco deste estudo foi direcionado para as demais caracterizações enzimáticas.

Outro aspecto importante desses resultados está relacionado aos peptídeos identificados e a integridade da cauda de histidina. Isso porque, foram identificados peptídeos correspondentes a porção N-terminal, mas o mesmo não foi observado na porção C-terminal que contém a cauda de histidinas. Neste panorama, foram analisados no Protparam as massas moleculares das sequências de aminoácidos na ausência da cauda de histidinas e aminoácidos responsáveis pelo link da proteína com esta *tag* (epítipo c-myc). Assim, foram obtidas as massas moleculares de 24,7 kDa para proteína recombinante sem cauda de histidinas e 23,6 kDa para proteína sem epítipo c-myc, as quais poderiam corresponder as massas observadas na Figura 28. Este resultado reforça a hipótese de que grande parte da CfCLER produzida perdeu a cauda de histidinas. Isso porque as massas totais observadas têm relação com as massas calculadas para CfCLER sem c-mic ou cauda de histidinas. Além disso, a perda da cauda de histidinas aponta ser o principal motivo pelo qual

foi encontrado atividade no *flow-through* da cromatografia por afinidade. Vale, portanto, sugerir que uma otimização da estratégia adotada aqui poderia ser a produção da proteína recombinante sem os tags do epítipo c-myc e cauda de histidinas.

Os interferentes observados com massa molecular maior que 25,5 kDa foram sequenciados e identificados no MASCOT como Álcool oxidase I (AOX I) de *K. phaffii*.

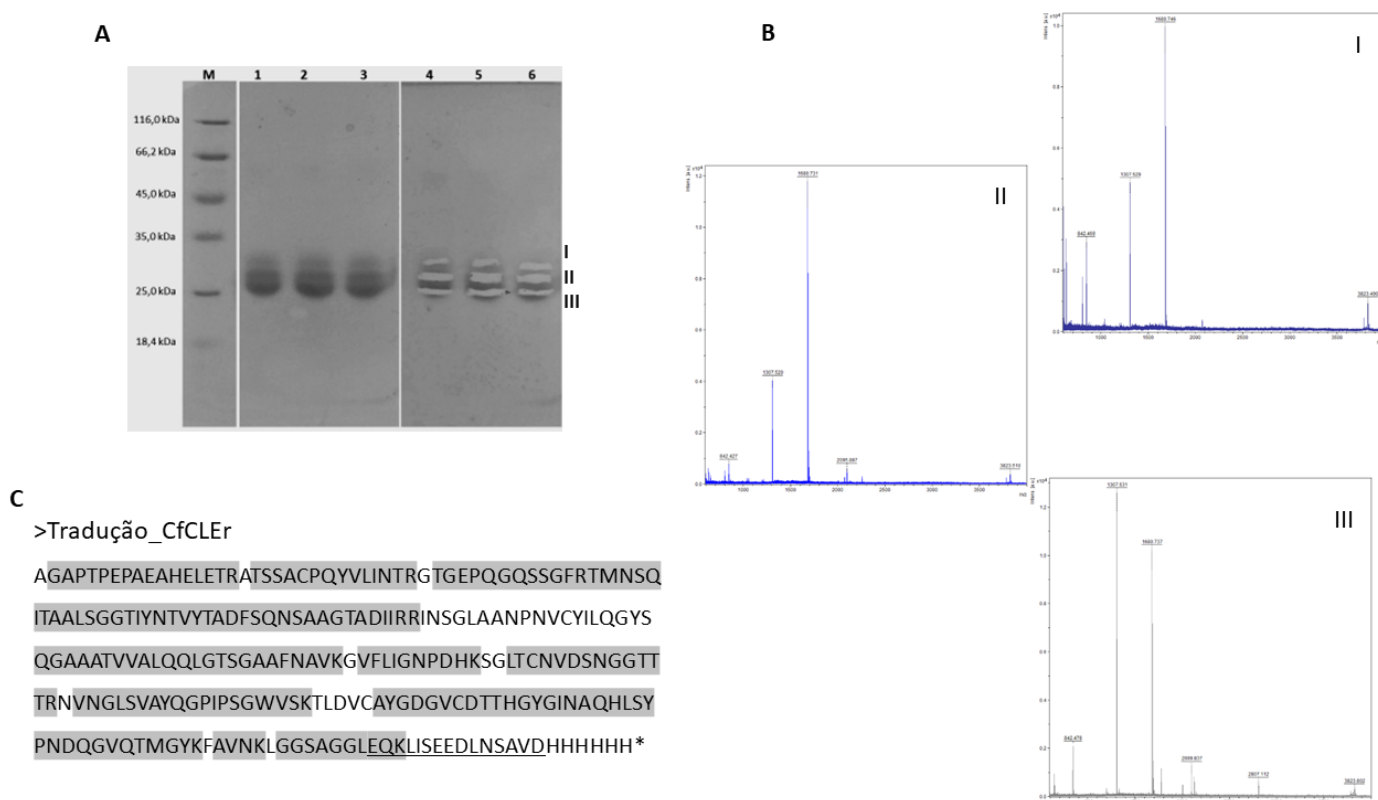


Figura 29. Esquema de sequenciamento das proteínas. (A) Gel SDS-PAGE gradiente 12-15% corado com comassie coloidal. (M) marcador de massa molecular; (1-3) perfil do gel antes do recorte das bandas; (4-5) perfil do gel após recorte das bandas; (B) Representação gráfica do mesmo peptídeo observado no sequenciamento de cada uma das três bandas; (C) Sequência de aminoácidos de CfCLER com peptídeos identificados nas três bandas destacados em cinza e epítipo c-myc sublinhado.

5.7.3 Atividade residual de armazenamento

Com intuito de verificar se a enzima se mantinha estável ao longo do tempo para posteriores ensaios, foi realizado o teste de atividade residual de armazenamento após esterilização por filtração. Desta forma, foi observado que a enzima conservou 100% da sua atividade quando armazenada a 4°C e 96% quando armazenada à temperatura ambiente após 3 meses de armazenamento (Tabela 12), o que demonstra uma estabilidade quando comparada ao

sobrenadante dentro do período e condições testados (Dados não mostrados). Na literatura existem poucos relatos sobre a manutenção da atividade enzimática em temperatura ambiente. Qi e colaboradores (2022) relatam em sua revisão que as cutinases de *Thermobifida fusca*, *Fusarium solani pisi*, *Cryptococcus* sp. S-2, *Cryptococcus magnus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas putida* e *Bacillus subtilis* têm um decaimento de mais de 50% na atividade enzimática quando armazenadas em temperatura ambiente. Assim a resistência que CfCLer apresenta à degradações em temperatura ambiente é uma característica interessante para reduzir os custos em aplicações industriais, dispensando a refrigeração da enzima.

Tabela 12. Atividade enzimática de proteína purificada ao longo do tempo armazenada em temperatura ambiente

Tempo (dias)	0	1	7	15	30	60	90
Atividade (U/mL)	80,16	80,16	79,36	79,36	78,56	77,76	76,95
Porcentagem (%)	100	100	99	99	98	97	96

5.7.4 Temperatura de atuação da enzima de CfCLer

A determinação da temperatura em que a enzima melhor atua é fundamental para as aplicações biotecnológicas. Sendo assim, foram realizados ensaios para avaliar a temperatura de atuação da enzima de CfCLer. A partir dos resultados, foi possível observar que a atividade de CfCLer foi melhor à 30°C (Figura 30), um valor próximo ao observado para outras cutinases reportadas na literatura que apresentam valores entre 30-65°C (Tabela 13). A presença de um único máximo no gráfico confirma que as isoformas da enzima presente após a purificação de gel filtração apresentam um único máximo de atividade (Garcia *et al.*, 2017). Além disso, a enzima se apresentou atividade Este é um resultado promissor para aplicações de degradação de polímero, uma vez que alguns polímeros cristalinos atingem o ponto de transição vítrea em temperaturas de 50°C, possibilitando assim uma maior penetrabilidade da enzima na rede cristalina (Cui *et al.*, 2021).

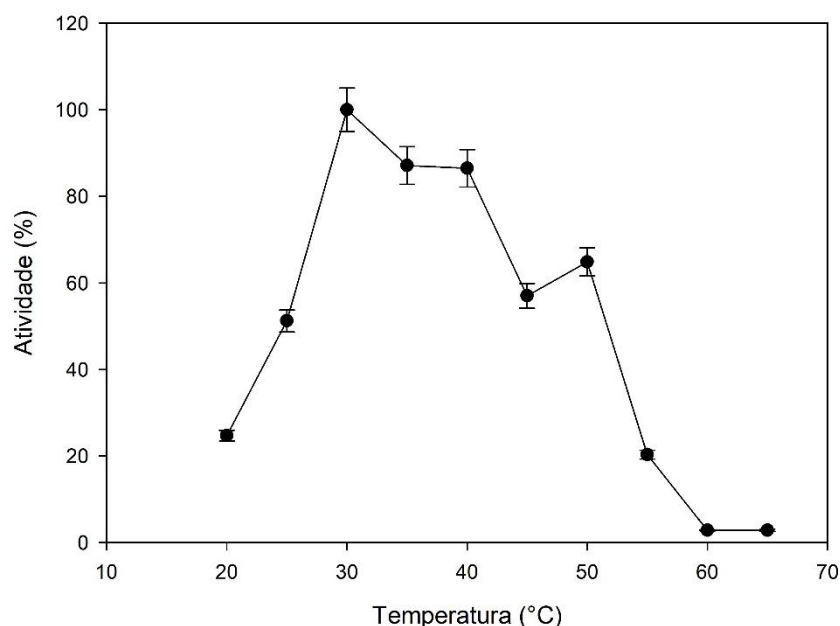


Figura 30. Gráfico de temperatura da atividade enzimática

5.7.5 Termoestabilidade de CfCLER

Outro importante parâmetro para aplicações biotecnológicas é a termoestabilidade, ou seja, a capacidade da enzima conservar atividade após tratamento térmico. Neste sentido, foi avaliado a atividade residual da enzima quando exposta a diferentes temperaturas. A partir dos resultados foi possível observar que a enzima conserva mais de 50% de atividade quando exposta por 10 minutos em temperaturas inferiores a 100°C. Este comportamento em que a enzima suporta temperaturas mais elevadas que do crescimento do microrganismo de origem não é incomum para enzimas extracelulares, sendo descrito na literatura para xilanases, lipases, e PHB-despolimerases (Kleeberg *et al.*, 2005).

Já em intervalos de tempo maior (10min-4h), a enzima foi capaz de conservar 50% da sua atividade em temperaturas inferiores a 50°C (Figura 31). Segundo Vázquez e colaboradores, a termoestabilidade de cutinases está diretamente associada à quantidade de ligações dissulfeto presentes na estrutura da enzima (Vázquez-Alcántara *et al.*, 2021). Cutinases fúngicas com seis cisteínas formadoras de ligação dissulfeto apresentaram maior

termoestabilidade que cutinases com 4 cisteínas, como CfCLE (Kleeberg *et al.*, 2005). Logo, a baixa termoestabilidade a longo prazo pode estar associada a esta questão estrutural, uma vez que as ligações dessufeto são estruturas tesmoestáveis (Vázquez-Alcántara *et al.*, 2021). É relatado na literatura que a maioria das cutinases não apresenta termoestabilidade em temperatura acima de 70°C, uma vez que durante a desnaturação térmica processos irreversíveis também podem ocorrer (por exemplo, auto-agregação de proteínas ou desamidação encontrada em valores básicos de pH), evitando que a proteína se enovele novamente (Petersen *et al.*, 2001).

Resultados semelhantes foram observados para as cutinases relatadas na literatura, que apresentaram termo estabilidade de 20-85°C (Tabela 13). Sendo assim, a enzima é capaz de suportar tratamentos térmicos em temperaturas de transição vítrea em intervalos inferiores a 10 minutos.

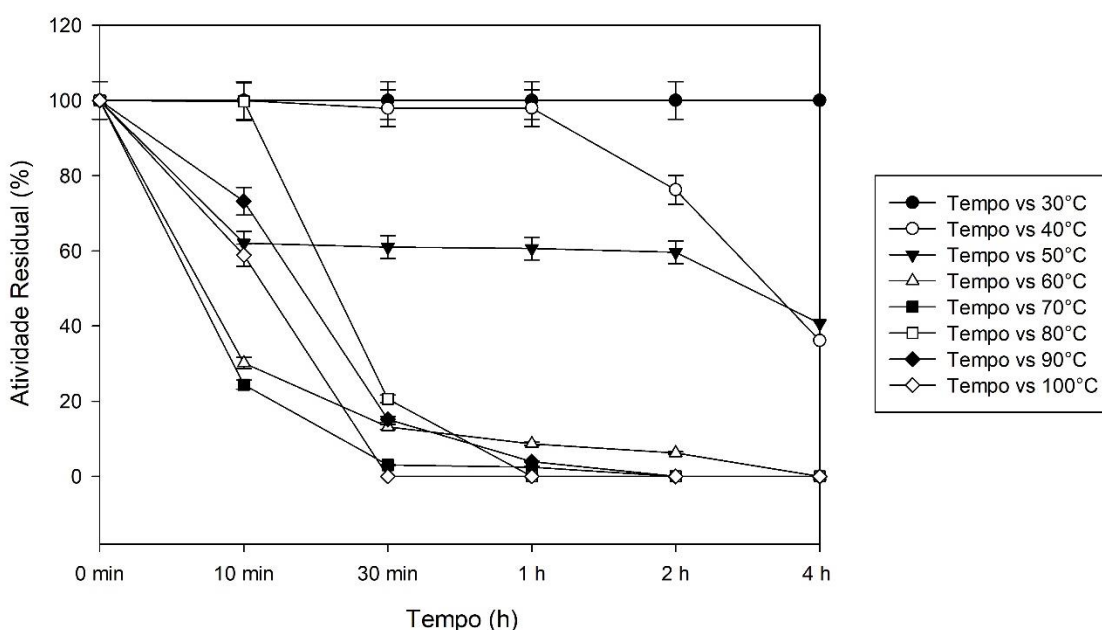


Figura 31. Gráfico da atividade residual frente diferentes temperaturas ao longo do tempo

Tabela 13. Temperatura de atuação da enzima, termoestabilidade, pH e faixa de pH das cutinases descritas na literatura

Organismo Nativo	Nome	Hospedeiro	Atividade máxima (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Temperatura (°C)	Estabilidade térmica (°C)	pH	Faixa de pH	Referência
<i>Cryptococcus flavus</i>	<i>CfCLE</i>	<i>K. phaffii</i>	320	154	30	50	8,5	6-11	Este trabalho
<i>Bacillus</i> sp.	-	-	15	-	50	50-70	7,5	5,5-9,9	Adgüzel 2017
<i>Moniliophthora roreri</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-	34,03	40	50	8	5,0-9,0	Alcantara <i>et al.</i> , 2021
<i>Arxula adenivorans</i> LS3	ACUT1	A. <i>adenivorans</i> G 1212	220,1	23,4	20	20-35	5	4,5-6,0	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adenivorans</i> LS4	ACUT2	A. <i>adenivorans</i> G 1213	11,89	497,4	30	20-45	5	4,0-6,0	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adenivorans</i> LS5	ACUT3	A. <i>adenivorans</i> G 1214	5,87	230,9	30	20-50	5,5	4,5-6,5	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Thermobifida fusca</i>	Tfu_0883	pLysS de <i>E. coli</i> Rossetta (DE3)	180	458	60	40-60	8	-	Chen <i>et al.</i> , 2008 e 2010
<i>Thermobifida fusca</i>	Tfu_0882	pLysS de <i>E. coli</i> Rossetta (DE3)	69	223	60	40-60	8	-	Chen <i>et al.</i> , 2008 e 2010
<i>Fusarium solani</i> pis	FspC	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	30	40	8	-	Chen <i>et al.</i> , 2008 e 2010
<i>Glomerella cingulata</i>	N177D	<i>E. coli</i> Origami B (DE3)	-	-	30	50	8	6,0-9,0	Chin <i>et al.</i> , 2013
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	-	-	-	-	60	60	8	6,0-9,0	Dheeman <i>et al.</i> , 2011
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fo Cut5a	<i>E. coli</i> VL21	-	-	40	50	7	3,0-11,0	Dimarogona <i>et al.</i> , 2015
<i>Thielavia terrestris</i>	TtCutopt	<i>Pichia pastoris</i>	10,200	23,224	50	85	7,9	6,0-11	Duan, 2019

<i>Pseudomonas cepacia</i> NRR	-	-	336	53,5915	36,5	45	11	-	Dutta <i>et al.</i> , 2013
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	-	-	-	-	50	70	9	6,0-10,0	Fett <i>et al.</i> , 2000
<i>Aspergillus nidulans</i>	ANCUT2	-	-	51,8807	60	60	6	5,5-7,0	Garcia <i>et al.</i> , 2017
<i>Thermobifida alba</i> cepa AHK119	-	<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	-	-	50	75	7	5,0-9,0	Hu <i>et al.</i> , 2010
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	CLE	-	65,7	-	37	60	6	5,0-9,0	Kamini <i>et al.</i> , 2000
<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190		<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	-	-	60	65	7	6,5	Kawai <i>et al.</i> , 2014
<i>Thermobifida fusca</i> (TfH)	-	-	-	-	65	70	8	-	Kleeberg <i>et al.</i> , 2005
<i>Fusarium solani</i>	-	<i>Pichia pastoris</i>	135,000	39,50	40	-	7 e 8	4,0-9,0	Know <i>et al.</i> , 2009
<i>Coprinopsis cinerea</i>	CcCUT1	<i>Trichoderma reesei</i>	-	-	-	60	8	7 a 9	Kontkanen <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria brassicicola</i>	CUTAB1	<i>Pichia pastoris</i>	-	17	40	50	9	6,0-11,0	Koschorreck <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus oryzae</i>	L1	-	-	-	55	45	6,8	5,0-6,8	Maeda <i>et al.</i> , 2005
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fo Cut5a	<i>Escherichia coli</i> Origami 2	-	-	40	65–70	6	6,5-3,5	Nikolaivits <i>et al.</i> , 2016
<i>Sirococcus conigenus</i>	ScCut1	<i>Pichia pastoris</i>	-	-	-	80	5	3,0-7,5	Nyyssola <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma reesei</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	60	4	4,0-7,4	Roussel <i>et al.</i> , 2014
<i>Cryptococcus magnus</i>	CmCut1	-	-	-	40	-	7,5	6,0-9,0	Sazuki <i>et al.</i> , 2013

<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	10	-	Sebastian and Kolattukudy 1988
<i>Glomerella cingulata</i>	-	<i>Pichia pastoris</i>	434	0,11	25	50	8	6,0-11,0	Seman <i>et al.</i> , 2014
polen (<i>Tropaeolum majus</i>)	-	-	-	-	-	-	6,5	-	Shayk and Kolattukudy, 1977
<i>Pseudozyma antarctica</i>	PaCLE1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	54,8	40	40	9,5	7,0-10,0	Shinozaki <i>et al.</i> , 2013
<i>Fusarium roseum culmorum</i>	-	-	-	-	-	-	10	-	Soliday and Kolattukudy 1976
Metagenômica	LC-cutinase	<i>E. coli</i> - <i>CodonPlus</i> (DE3)	-	-	50	80	8,5	-	Sulaiman <i>et al.</i> , 2012
<i>Cryptococcus magnus</i>	-	-	-	-	40	-	7,5	-	Suzuki <i>et al.</i> , 2012
<i>Paraphoma</i> B47-9	-	-	-	-	45	-	7,2	-	Suzuki, 2014
<i>Ascochyta rabiei</i>	-	-	-	-	-	-	8	-	Tenhaken <i>et al.</i> , 1997
<i>Thermobifida alba</i> AHK119	Est119	<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	-	2,3	50	50	6	6,0–9,0	Thumarat <i>et al.</i> , 2012
<i>Thermobifida alba</i> AHK119 A68V / S219P	-	<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	-	299	-	60	9	4,0-10,0	Thumarat <i>et al.</i> , 2012
Antarctic <i>Rhodococcus</i> sp.	Rcut	<i>E. coli</i>	-	2190	40	50	8	6,0-11,0	Urbaneck <i>et al.</i> , 2021
<i>Glomerella cingulata</i>	-	<i>Pichia pastoris</i>	-	-	25	50	7	8,5	Wan., 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	BhPETase	CBS2	-	-	70	90	7	6,0-8,0	Xi, 2021
<i>Thielavia terrestris</i>	TtcutB	-	-	983	55	65	4	2,5–10	Xu, 2015
<i>Thielavia terrestris</i>	TtcutA	-	90,4	-	50	65	4	2,5–10	Yang, 2012

5.7.6 pH de atuação da enzima de CfCLER

Determinar o potencial hidrogeniônico (pH) em que a enzima atua é fundamental para qualquer aplicação biotecnológica, determinando o quão ácido ou básico pode ser o ambiente em que a enzima agiria sobre o substrato. Para isso, foram realizados ensaios para determinar o pH de atuação da enzima de CfCLE. A partir dos resultados, foi possível observar que o pH de atuação da enzima de CfCLER foi de 8,5 (Figura 32), valor próximo ao observado para cutinases na literatura, que varia de 7,0-11,0 (Tabela 13). Sabe-se que a tampa típica de algumas lipases está ausente nas cutinases, consequentemente o sítio catalítico é fortemente afetado pelo pH devido aos estados de protonação / desprotonação dos resíduos catalíticos (Ser, His e Asp). Desta forma, em pH alcalino (8,5–10), o potencial eletrostático ao redor do sítio ativo é ligeiramente negativo, o que favorece a atividade enzimática máxima. Porém, em valores de pH baixos (meios ácidos), há um excesso de carga positiva, que resulta na agregação irreversível da enzima (Petersen *et al.*, 2001).

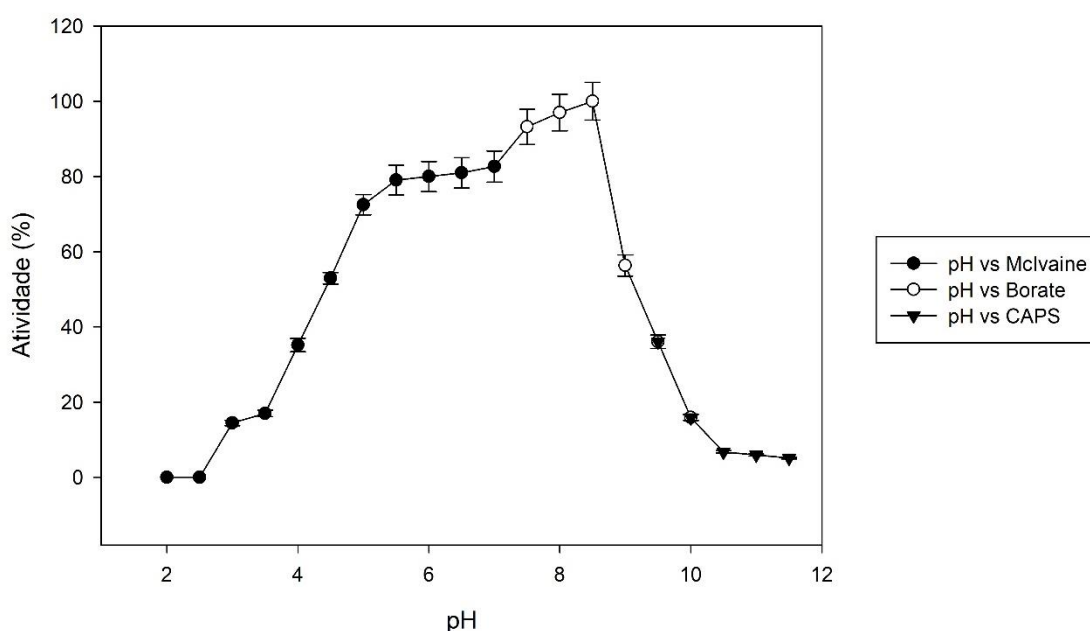


Figura 32. Gráfico de pH de atuação da enzima da atividade enzimática

Curioso observar que apenas as cutinases de *Thielavia terrestris* (Duan *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2012) e *Sirococcous conigenus* (Nyyssola *et al.*, 2014) apresentaram

atividade em $\text{pH} < 4$. Segundo Melo e colaboradores (2003), em algumas cutinases ácidas existe um sítio de conformação que abre e fecha, semelhante ao observado em lipases. Este movimento de “mini-tampa” da cutinase cobrindo seu sítio ativo pode ser responsável por sua adaptação a diferentes solventes e pH ácido (Melo *et al.*, 2003). Em CfCLE não é observado esta estrutura, o que pode justificar a baixa atividade em pH ácido. Além disso, sabe-se que em pH baixo, a cadeia lateral histidina torna-se protonada e, portanto, perde sua nucleofilicidade, inibindo a tríade catalítica (Roussel *et al.*, 2014).

5.7.7 Atividade residual em diferentes pHs

O pH tem freqüentemente efeitos na estabilidade e atividade das proteínas. Mudanças no estado de protonação de aminoácidos alteram as interações eletrostáticas e arranjos espaciais na estrutura da proteína (Mazzini *et al.* 2007). Assim, outro aspecto importante para as aplicações biotecnológicas é a capacidade da enzima conservar sua atividade após tratamento ácido ou básico em etapas de determinados processos. Sendo assim, foi avaliado a atividade residual da enzima após tratamento com diferentes pH s. A partir dos resultados foi possível observar que a atividade enzimática aumentou ao longo do tempo de incubação. Resultados semelhantes foram relatados por Gacia e colaboradores (2017), no qual a atividade aumentava conforme aumentava o tempo de exposição da enzima ao tampão. Além disso, a enzima conserva mais de 50% de atividade quando exposta por mais de 10 minutos em pH superiores à 6,0, semelhante ao observado para as cutinases relatadas na literatura (Tabela 13).

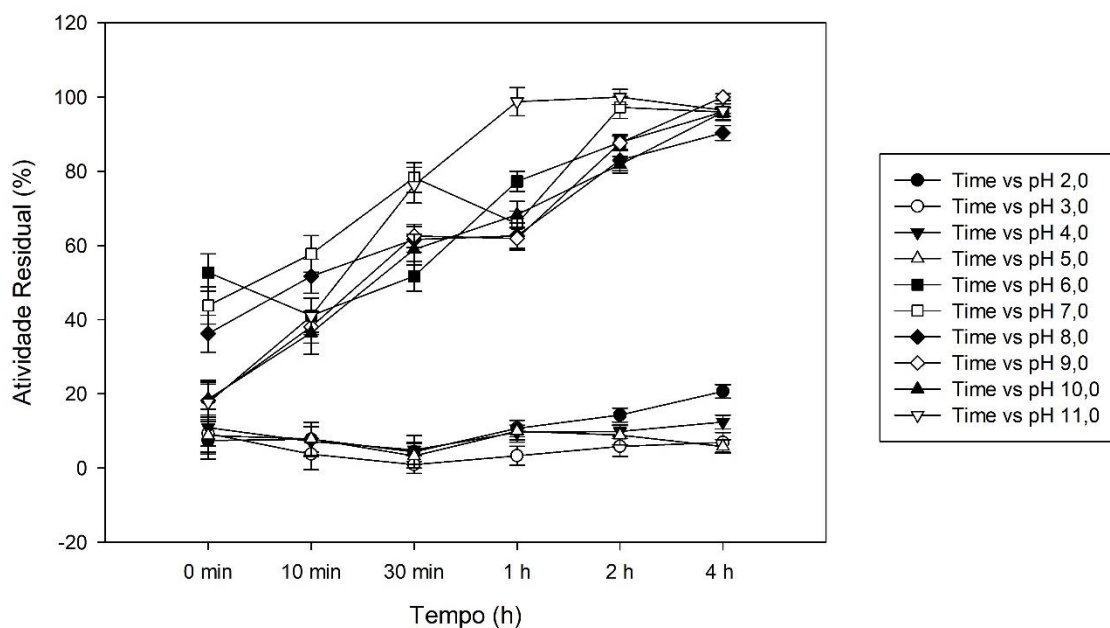


Figura 33. Gráfico da atividade residual frente diferentes pHs ao longo do tempo

5.7.8 Atividade residual na presença de Solventes Orgânicos

Solventes orgânicos são amplamente empregados em processos industriais, principalmente em reações de síntese. Portanto é importante determinar a estabilidade das enzimas em diferentes solventes que diferem em seu índice de polaridade e hidrofobia (Dutta *et al.*, 2014). Além disto é bem sabido para a cutinases que álcoois como metanol, etanol e butanol atuam como inibidores, desestabilizando a estrutura terciária das enzimas (Duan *et al.*, 2019). Nesse sentido, foi avaliado a atividade de CfCLER na presença de solventes orgânicos. A partir dos resultados foi possível observar que CfCLER conserva 50% da atividade em concentrações inferiores de 50% para DMSO, 40% para metanol e hexano, 20% para etanol, isopropanol, acetona e clorofórmio, 2,5% para butanol (Tabela 14). Estes resultados demonstram a capacidade da enzima para atuar em reações com grandes concentrações de álcoois como transesterificação de biodiesel ou degradação de polímeros que geram álcoois. É bem sabido que a maioria das cutinases são mais estáveis em solventes hidrofóbicos, potencialmente porque solventes hidrofílicos podem dissolver proteínas, resultando na perda

de sua estrutura terciária (Corpet, 1988; Chin *et al.*, 1994). Na Tabela 15 é possível observar a atividade residual das enzimas descritas na literatura.

Tabela 14. Atividade de CfCLEr na presença de solventes orgânicos

Concentração Solvente	Metanol	Etanol	Butanol	Isopropanol	Acetona	Hexano	Clorofórmio	DMSO
0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2,5%	164%	182%	63%	154%	155%	183%	109%	190%
5%	165%	162%	27%	139%	141%	173%	101%	190%
7,5%	176%	158%	16%	126%	141%	173%	98%	185%
10%	169%	150%	3%	115%	141%	149%	75%	212%
20%	136%	93%	0%	40%	103%	142%	74%	207%
30%	89%	33%	0%	10%	31%	133%	13%	161%
40%	49%	12%	0%	4%	10%	133%	0%	104%
50%	30%	5%	0%	0%	5%	20%	0%	67%
60%	9%	1%	0%	0%	0%	18%	0%	32%
70%	8%	0%	0%	0%	0%	12%	0%	5%
80%	8%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%
90%	6%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%

O efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática é uma propriedade importante para um biocatalisador, visto que muitas reações sintéticas são realizadas em sistemas não aquosos. A cutinase estudada parece reter parte de sua atividade mesmo em solventes polares (metanol, etanol propanol, butanol e acetona), que costumam ser os mais prejudiciais para as enzimas, pois arrancam as moléculas essenciais de água da superfície da proteína. Neste sentido, as diferenças estruturais da porção N-terminal de CfCLE e demais aminoácidos podem estar diretamente associados a manutenção da estrutura proteica na presença de solventes polares. Uma vez que estes aminoácidos interferem na polaridade e hidrofília da enzima, podendo estar estabilizando a enzima na presença de álcoois. Outros autores também relatam que aminoácidos polares mutados ao longo da estrutura de hidrolases aumentaram a estabilidade na presença de solventes orgânicos polares (Xi *et al.*, 2021). Desta forma, este resultado confirmam o potencial de aplicação de CfCLE em esterificações e transesterificações para produção de novos ésteres, bem como na produção de biodiesel.

Tabela 15. Atividade residual na presença de Solventes orgânicos, Surfactantes e Íons metálicos das cutinases descritas na literatura

Organismo Nativo	Nome	Hospedeiro	Solventes, Surfactantes e Íons estimuladores	Solventes, Surfactantes e Íons inibidores	Solventes, Surfactantes e Íons resistentes	Referência
<i>Cryptococcus flavus</i>	<i>CfCLE</i>	<i>K. phaffii</i>	Metanol, etanol, isopropanol, acetona, hexano, DMSO, EDTA, Tween 20, Tween 80, Triton X100, DTT, Beta mercaptanol, Ba ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺	Butanol, PMSF, Cu ²⁺	Cloroformio, SDS	Este trabalho
<i>Bacillus</i> sp. KY0701	-	-	Tween 20, Tween 80 and Triton X-100, Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Acetona, PMSF, Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺ , Cu ²⁺	Etanol, propanol, chloroformio, DMSO, benzeno, metanol, DMSO	Adıgüzel and Tunçer, 2017
<i>Arxula adeninivorans</i> LS3	ACUT1	<i>A. adeninivorans</i> G1212	PEG 200, DEG, Acetona, DMSO	Isopropanol, etanol	-	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adeninivorans</i> LS4	ACUT2	<i>A. adeninivorans</i> G1213	PEG 200, DEG, Acetona, DMSO	Isopropanol	Etanol	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adeninivorans</i> LS5	ACUT3	<i>A. adeninivorans</i> G1214	PEG 200, DEG, Acetona, DMSO	Isopropanol	Etanol	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Thermobifida fusca</i>	Tfu_0883	pLysS de <i>E. coli</i> Rossetta (DE3)	Co, Mn	Isopropanol e butanol, Triton X- 100, Tween 20, Zn, Fe, Pb, Cr, Hg	Metanol, etanol, acetona, n- hexano, dimetilsulfóxido	Chen <i>et al.</i> , 2008 e 2010

<i>Thermobifida fusca</i>	Tfu_0882	pLysS de <i>E. coli</i> Rossetta (DE3)	Co, Mn	Isopropanol e butanol, Triton X-100, Tween 20, Zn, Fe, Pb, Cr, Hg	Metanol, etanol, acetona, n-hexano, dimetilsulfóxido	Chen <i>et al.</i> , 2008 e 2010
<i>Fusarium solani pisi</i>	FspC	<i>Bacillus subtilis</i>	Co, Mn	Metanol, etanol, acetona, n-hexano, dimetilsulfóxido, Zn, Fe, Pb, Cr, Hg	N-hexano, Triton X-100 e Tween 20	Chen <i>et al.</i> , 2008 e 2010
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> DSM 43304	-	-	digitonina, desoxicolato de sódio, 1,4-ditiotreitol, β -mercaptoetanol, PMSF Ca^{2+}	Hg ²⁺	-	Dheeman <i>et al.</i> , 2011
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>E. coli</i> VL21	-	-	-	-	Dimarogona <i>et al.</i> , 2015
<i>Thielavia terrestris</i>	TtCutopt	<i>Pichia pastoris</i>	Ciclohexano, isooctano, n-octano, n-heptano, n-hexano, Triton X-100, Tween 60, Tween 40, Tween 80, SDS e Tween 20	Ácido acético e ácido butírico	-	Duan <i>et al.</i> , 2019
<i>Pseudomonas cepacia</i> NRRL B 2320	-	-	Desoxicolato de sódio, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , K^{+} e Na^{+}	PMSF, Zn, Fe, Cu and Hg ²⁺	Butanol, isooctano, metanol, etanol, clorofórmio, n-hexano e álcool isoamílico, Triton X-100,	Dutta <i>et al.</i> , 2013

					Tween 80 chloroform, n- hexane and isoamyl alcohol H2O2	
<i>Aspergillus nidulans</i>	ANCUT2	-	-	Acetona, etanol, álcool isopropílico, hexano, EDTA, PMSF, DMSO, Tween 80, SDS, Cu ²⁺		Garcia <i>et al.</i> , 2017
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	CLE	-	Éter dietílico, DMSO	Benzeno, metanol e etanol, Hg ²⁺ e Cu ²⁺	-	Kamini <i>et al.</i> , 2000
<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190		<i>E. coli</i> Rosetta-gami B	Ca ²⁺	-	-	Kawai <i>et al.</i> , 2014
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fo</i> Cut5a	<i>Escherichia coli</i> Origami 2	-	Metanol, etanol, isopropanol, butanol	-	Nikolaivits <i>et al.</i> , 2016
<i>Cryptococcus magnus</i>	-	-	Ca ²⁺ ou Mg ²⁺	-	-	Sazuki <i>et al.</i> , 2013
<i>Glomerella cingulata</i>	-	<i>Pichia pastoris</i>	-	PMSF, β- mercaptoetanol, Tween 20, SDS, Triton-X100	-	Seman <i>et al.</i> , 2014
<i>Cryptococcus magnus</i>	-	-	Ca ²⁺ ou Mg ²⁺	-	-	Suzuki <i>et al.</i> , 2012
<i>Paraphoma</i> B47-9	-	-	Ca ²⁺	Mg ²⁺		Suzuki <i>et al.</i> , 2014
<i>Thermobifida alba</i> AHK119	Est119	<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ e Ca ²⁺	EDTA, Al ³⁺ , Fe ³⁺ , Li ⁺ , Rb ⁺	-	Thumarat <i>et al.</i> , 2012

Thermobifida alba AHK119	-	<i>E. coli</i> Rosetta-gami B	Ca ²⁺	-	-	Thumarat <i>et al.</i> , 2012
Antarctic <i>Rhodococcus</i> sp	-	<i>E. coli</i>	-	ZnSO ₄	-	Urbaneck <i>et al.</i> , 2021
<i>Glomerella cingulata</i>	-	<i>Pichia pastoris</i>	-	PMSF, β- mercaptoetanol, Tween 20, SDS, Triton-X100, Fe e Mn	-	Wan <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	-	CBS2 de <i>Bacillus subtilis</i>	Ca ²⁺	-	-	Xi <i>et al.</i> , 2021
<i>Thielavia terrestris</i> CAU709	TtcutA	-	-	-	Metanol, etanol, acetona, acetonitrila, isopropanol, dimetilsulfóxido, Tween 20, Tween 80 e Triton X-100, Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ³⁺ , Co ²⁺ , Hg ²⁺ e Zn ²⁺	Yang <i>et al.</i> , 2012

5.7.9 Atividade na presença de Surfactantes

Surfactantes estão presentes em diversos processos laboratoriais e produtos finais como detergentes de roupas e de máquinas de lavar louça. Portanto, enzimas empregadas neste tipo de produto ou processo devem ser capazes de conservar sua atividade; uma vez que são capazes de diminuir a atividade das enzimas devido a um efeito da tensão superficial. Sendo assim, foi avaliado a atividade residual de CfCLer na presença de surfactantes. A partir dos resultados foi possível observar que CfCLer apresentou alta atividade nas concentrações de todos os surfactantes testados (Tabela 16). O uso de detergentes aniônicos, como o SDS, parece ter resultado na desnaturação da proteína ao interromper as interações hidrofóbicas entre os resíduos da proteína e provavelmente causar agregação (Garcia *et al.*, 2017). Resultados semelhantes são observados nas cutinases relatadas na literatura (Tabela 15), no qual surfactantes como Tween, Triton, SDS e DMSO foram inibidores da atividade enzimática. Além disso, houve um aumento da atividade na maioria das condições testadas em comparação com o controle. Nossa hipótese é que a presença destes surfactantes altera a conformação tridimensional da enzima, favorecendo sua eficiência catalítica.

Tabela 16. Atividade residual frente surfactantes

Surfactantes	Atividade Residual
Controle	100%
SDS 1mM	162%
SDS 10mM	79%
EDTA 1mM	182%
EDTA 10mM	190%
PMSF 1mM	25%
PMSF 10mM	20%
Tween 20 1mM	254%
Tween 20 10mM	268%
Tween 80 1mM	260%
Tween 80 10mM	249%
Triton X100 1mM	204%
Triton X100 10mM	240%
DTT 1mM	205%
DTT 10mM	212%
Beta-mercaptanol 1mM	189%
Beta-mercaptanol 10mM	214%

É interessante notar que a atividade se manteve mesmo na presença de β -Mercaptoetanol (BME) e o ditioneitol (DTT), dois surfactantes que podem atuar como agentes redutores para quebrar a ligação dissulfeto (Won *et al.*, 2022). Foi possível observar também que há uma redução da atividade conforme a concentração de SDS aumenta. Segundo Kold e colaboradores (2014), em concentrações muito baixas, o SDS liga-se as proteínas, causando apenas mudanças conformacionais mínimas. Assim, à medida que a concentração de SDS é aumentada, as proteínas se desdobram, levando ao aumento da exposição de superfícies hidrofóbicas e à formação de dímeros e possivelmente de oligômeros maiores de proteína. Por fim, aumentar ainda mais a concentração de SDS faz com que os oligômeros se quebrem levando a agregados proteicos.

Em conjunto estes resultados sugerem uma possível aplicabilidade da enzima em misturas de detergentes uma vez que a enzima precisa reter sua atividade catalítica nas condições de lavagem, na presença de tensoativos aniônicos e não iônicos (Kold *et al.*, 2014).

5.7.10 Atividade na presença de íons metálicos

As enzimas podem sofrer influência da presença ou ausência de íons metálicos, agindo como cofatores ou inibidores da atividade (Won *et al.*, 2022). Assim, para otimizar a atividade de uma enzima e avaliar sua aplicabilidade em processos industriais é necessário avaliar sua atividade residual na presença de íons metálicos. A partir dos resultados foi possível observar que CfCL_{Er} conserva 50% da atividade em todos os íons metálicos. Além disso, íons de cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de níquel, sulfato de magnésio, sulfato de manganês e sulfato de níquel foram capazes de aumentar a atividade quando comparado ao controle (Tabela 17), semelhante ao relatado por Dutta *et al.* (2013). Resultados semelhantes são relatados na literatura (Tabela 15) em que os íons sódio e potássio estimularam a atividade de cutinases.

Porém, como o CfCLer não foi afetada pelo EDTA, pode-se concluir que os íons metálicos não foram imprescindíveis para sua atividade ou estabilidade enzimática, mas podem agir como cofatores para aumentar a atividade da enzima, uma observação também feita por Won e colaboradores (2022). Oda e colaboradores (2021) afirmam que a ligação de íons metálicos na superfície das cutinases pode elevar a temperaturas de fusão e ativar a enzima.

Além disso, foi relatado em diversos trabalhos que íons bivalentes como cálcio, bário ou níquel estabilizam as estruturas terciárias de lipases termoestável de *Bacillus stearothermophilus* (Kim *et al.*, 2000), *Staphylococcus hyicus* (Simons *et al.*, 1999) e *Pseudomonas* sp. (Amada *et al.*, 2001). Embora o sítio de ligação de íons bivalentes em lipases esteja localizado longe do sítio catalítico, estudos estruturais propuseram que a ligação desses íons mantém o sulco de ligação ao substrato em uma conformação aberta, permitindo assim que a enzima se ligue ao substrato (Miyakawa *et al.*, 2015). Da mesma forma é possível que em CfCLE os íons bivalentes podem estar estabilizando a estrutura da enzima.

Tabela 17. Atividade enzimática na presença de íons metálicos

Íons Metálicos	Atividade Enzimática
Controle	100%
Cloreto de Bário (BaCl_2) 1mM	114%
Cloreto de Bário (BaCl_2) 10mM	121%
Cloreto de Cálcio (CaCl_2) 1mM	100%
Cloreto de Cálcio (CaCl_2) 10mM	94%
Cloreto de Cobalto (CoCl_2) 1mM	93%
Cloreto de Cobalto (CoCl_2) 10mM	79%
Cloreto de Cobre (CuCl_2) 1mM	59%
Cloreto de Cobre (CuCl_2) 10mM	67%
Cloreto de Ferro (FeCl_3) 1mM	72%
Cloreto de Ferro (FeCl_3) 10mM	70%
Cloreto de Potássio (KCl) 1mM	125%
Cloreto de Potássio (KCl) 10mM	94%
Cloreto de Magnésio (MgCl_2) 1mM	99%
Cloreto de Magnésio (MgCl_2) 10mM	58%
Cloreto de Sódio (NaCl) 1mM	122%
Cloreto de Sódio (NaCl) 10mM	100%
Cloreto de Níquel (NiCl_2) 1mM	139%
Cloreto de Níquel (NiCl_2) 10mM	79%
Sulfato de Cobalto (CoSO_4) 1mM	69%
Sulfato de Cobalto (CoSO_4) 10mM	74%
Sulfato de Cobre (CuSO_4) 1mM	98%
Sulfato de Cobre (CuSO_4) 10mM	61%
Sulfato de Ferro (FeSO_4) 1mM	93%
Sulfato de Ferro (FeSO_4) 10mM	76%
Sulfato de Magnésio (MgSO_4) 1mM	104%
Sulfato de Magnésio (MgSO_4) 10mM	83%
Sulfato de Manganês (MnSO_4) 1mM	127%
Sulfato de Manganês (MnSO_4) 10mM	109%
Sulfato de Níquel (NiSO_4) 1mM	110%
Sulfato de Níquel (NiSO_4) 10mM	82%
Sulfato de Zinco (ZnSO_4) 1mM	72%
Sulfato de Zinco (ZnSO_4) 10mM	67%

5.7.11 Avaliação da degradação de cutina

A cutina é o principal substrato das cutinases e a avaliação da atividade da enzima sobre este substrato confirma a classificação desta como uma cutinase verdadeira. Porém, este substrato não é comercializado devido a sua estrutura polimérica ramificada e complexa.

Motivo pelo qual não são realizados na literatura ensaios cinéticos com este substrato (Urbaneck *et al.*, 2021). Neste sentido, a partir dos ensaios de degradação da cutina fundida em ágar, foi possível observar a formação de halos de hidrólise nas placas tratadas com a enzima purificada e o sobrenadante bruto da enzima (Figura 34), confirmando que a enzima de *C. flavus* é uma cutinase verdadeira. Uma vez que foi classificada inicialmente como cutinase-like pela sua semelhança com a sequência de outras cutinases, mas sem evidência de sua atividade sobre a cutina (Fett *et al.*, 1992). Além disso, é possível observar ausência de atividade sobre a cutina no *flow through* das purificações, indicando a eficiência do processo. Também é possível observar a ausência de atividade no sobrenadante de *K. phaffii* selvagem, ou seja, que não sofreu transformação. Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos descritos na literatura, que correlacionam o tamanho do halo com maior atividade enzimática (Gururaj *et al.*, 1992).

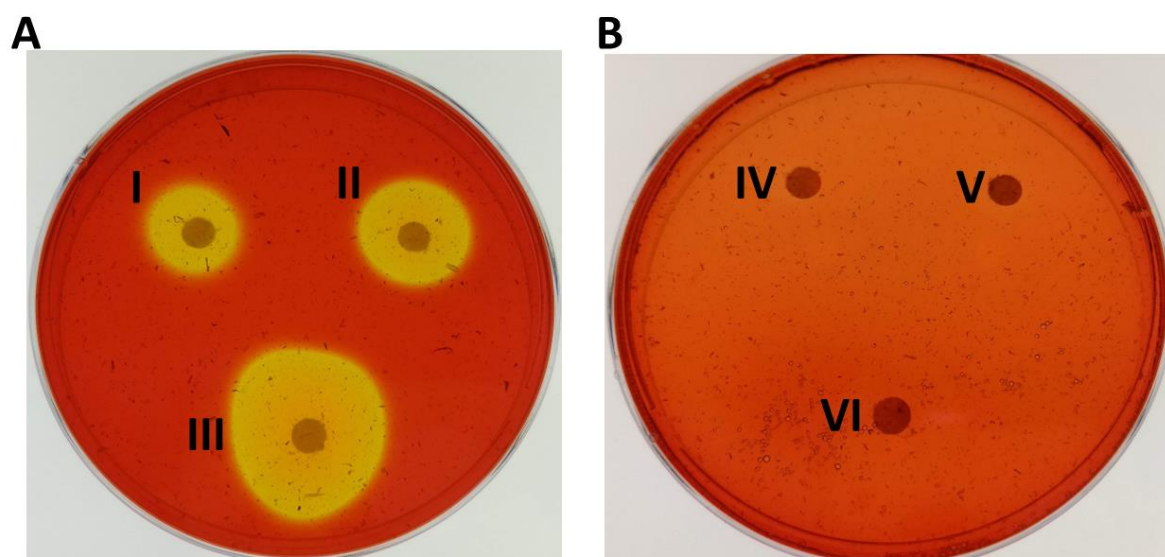


Figura 34. Avaliação da degradação de cutina. A) Teste com CfCLE: I- Sobrenadante de cultura de recombinante de *K. phaffii* do biorreator; II- CfCLER purificada por cromatografia de troca catiônica; III- CfCLER purificada por Gel filtração. B) Controle negativo: IV- Cultura de *K. phaffii* selvagem; V- Flow through da purificação por troca catiônica; VI- Flow through da purificação por gel filtração. Halos amarelos indicam degradação de cutina.

5.7.12 Especificidade

A especificidade de uma enzima é um aspecto importante para determinar suas aplicações. Enzimas com elevada especificidade por um substrato tendem a ter maior atividade

e eficiência catalítica, sendo um catalizador eficiente e promovendo uma reação mais rápida. Em contrapartida, enzimas promiscuas promovem reações em uma maior gama de substratos, podendo ser usada em diversas aplicações pela vasta gama de reações que podem catalisar. Neste sentido, as cutinases em geral, apresentam maior atividade por cadeias curtas de 2-8 carbonos e são promiscuas, sendo capazes de clivar ligações em cadeias longas de 16 e 18 carbonos (Tabela 18). A partir dos resultados de comparação relativa entre a preferência da enzima, foi possível observar que CfCLer apresenta maior atividade diante de para-nitrofenil caprilato (C8) e apresenta atividade em substratos menores com 2 a 16 carbonos (Figura 35). Esta promiscuidade se deve ao fato das cutinases serem intermediários das esterases que clivam substratos de cadeia curta e lipases que clivam preferencialmente substratos de cadeia longa (Garcia *et al.*, 2017).

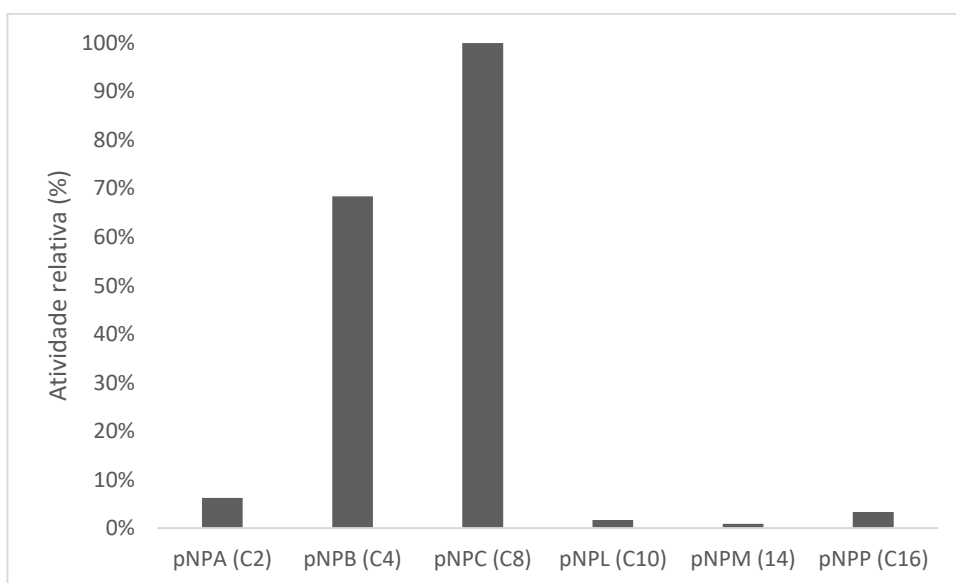


Figura 35. Gráfico de atividade relativa sobre ésteres de 2-16 carbonos. 100% representa a maior atividade obtida e as demais são valores relativos a esta.

Tabela 18. Especificidade das cutinases descritas na literatura

Organismo Nativo	Nome	Hospedeiro	Atividade máxima (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Especificidade de Ésteres	Especificidade Trigliceróis	Referência
<i>Cryptococcus flavus</i>	CfCLE	<i>K. phaffii</i>	320	154	pNPC (C8)	Tributirina (C4)	Este trabalho
<i>Arxula adenivorans</i> LS3	ACUT1	<i>A. adenivorans</i> G1212	220.1	23,4	pNPB (C4) e pNPH (C6)	Tributirina (C4)	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adenivorans</i> LS4	ACUT2	<i>A. adenivorans</i> G1213	11,891	497,4	pNPB (C4) e pNPH (C6)	Tributirina (C4)	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adenivorans</i> LS5	ACUT3	<i>A. adenivorans</i> G1214	5,87	230,9	pNPB (C4) e pNPH (C6)	Tributirina (C4)	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Thermobifida fusca</i>	Tfu_0883	pLysS de <i>E. coli</i> Rossetta (DE3)	180	458	pNPB (C4)	Tributirina (C4)	Chen <i>et al.</i> , 2008 e 2010
<i>Thermobifida fusca</i>	Tfu_0882	pLysS de <i>E. coli</i> Rossetta (DE3)	69	223	pNPB (C4)	Tributirina (C4)	Chen <i>et al.</i> , 2008 e 2010
<i>Fusarium solani pisi</i>	FspC	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	pNPB (C4)	Tributirina (C4)	Chen <i>et al.</i> , 2008 e 2010
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> DSM 43304	-	-	-	-	pNPC (C8)	Trioleína (Tri-C18:1)	Dheeman <i>et al.</i> , 2011
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fo Cut5a	<i>E. coli</i> VL21	-	-	pNPB (C4)	-	Dimarogona <i>et al.</i> , 2015
<i>Thielavia terrestris</i>	TtCutopt	<i>Pichia pastoris</i>	10.200	2322,4	pNPB (C4)	Tributirina (C4)	Duan, 2019
<i>Pseudomonas cepacia</i>	-	-	336	5359,15	pNPB (C4)	-	Dutta, 2013
<i>Aspergillus nidulans</i>	ANCUT2	-	-	5188,07	pNPB (C4)	-	Garcia <i>et al.</i> , 2017
<i>Thermobifida alba</i> cepa	-	<i>E. coli</i> Rosetta-gami B	-	-	pNPH (C6)	-	Hu <i>et al.</i> , 2010
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	CLE	-	65,7	-	pNPC (C8)	Tricaprilina (C8)	Kamini <i>et al.</i> , 2000
<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190		<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	-	-	pNPH (C6)	-	Kawai <i>et al.</i> , 2014

<i>Coprinopsis cinerea</i> (<i>Coprinus cinereus</i>)	CcCUT1	<i>Trichoderma reesei</i>	-	-	PNPP (C3)	-	Kontkanen <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria brassicicola</i>	CUTAB1	<i>Pichia pastoris</i>	-	17	pNPB (C4)	Trioleína (Tri-C18:1)	Koschorreck <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus oryzae</i>	L1	-	-	-	pNPB (C4)	-	Maeda <i>et al.</i> , 2005
<i>Tropaeolum majus</i>	-	-	-	-	pNPC (C8)	Trioleína (Tri-C18:1)	Maiti <i>et al.</i> , 1979
<i>Sirococcous conigenus</i>	ScCut1	<i>Pichia pastoris</i>	-	-	pNPA (C2)	-	Nyyssola <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	pNPB (C4)	-	Sebastian and Kolattukudy 1988
<i>Glomerella cingulata</i>	-	<i>Pichia pastoris</i>	434	0,1142	pNPC (C8)	-	Seman <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudozyma antarctica</i> JCM 10317	PaCLE1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	54.8	pNPV (C5)	-	Shinozaki <i>et al.</i> , 2013
Metagenômica	LC-cutinase	<i>E. coli</i> -CodonPlus (DE3)	-	-	pNPB (C4)	-	Sulaiman <i>et al.</i> , 2012
<i>Cryptococcus magnus</i>	-	-	-	-	pNPL (C12)	-	Suzuki <i>et al.</i> , 2012
<i>Paraphoma</i> B47-9	-	-	-	-	pNPV (C5)	-	Suzuki <i>et al.</i> , 2014
<i>Thermobifida alba</i> AHK119	Est119	<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	-	2,3	pNPB (C4)	-	Thumarat <i>et al.</i> , 2012
Antarctic <i>Rhodococcus</i> sp.	Rcut	<i>E. coli</i>	-	2190	pNPC (C8)	-	Urbanek <i>et al.</i> , 2021
<i>Glomerella cingulata</i>	-	<i>Pichia pastoris</i>	-	-	pNPC (C8)	-	Wan, 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	PETase	CBS2	-	-	pNPA (C2)	-	Xi <i>et al.</i> , 2021
<i>Thielavia terrestris</i> CAU709	TtcutB	-	-	983	pNPB (C4)	Tributirina (C4)	Xu <i>et al.</i> , 2015
<i>Thielavia terrestris</i> CAU709	TtcutA	-	90,4	-	pNPB (C4)	Tributirina (C4)	Yang, 2012

Outro importante aspecto a ser avaliado é a especificidade sobre os triglicerídeos, uma vez que as cutinases podem ser empregadas na remoção de gorduras de louça e roupa a partir da hidrólise dos triglicerídeos em ácidos graxos solúveis ou na transesterificação de triglicerídeos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), também conhecido como Biodiesel. Neste sentido, as cutinases em geral apresentam maior atividade em triglicerídeos de cadeia curta (Tabela 19). A partir dos resultados de comparação relativa entre a preferência da enzima, foi possível observar que CfCLE apresenta maior atividade sobre (C4), e apresenta atividade sobre cadeias maiores como trioleína (27%) e tripalmitina (13%) (Figura 36). Estes fatos, a princípio, possibilitariam sua aplicação na indústria de limpeza e produção de biodiesel que serão avaliadas nas próximas sessões.

Tabela 19. Especificidade de triglicerídeos das cutinases relatadas na literatura

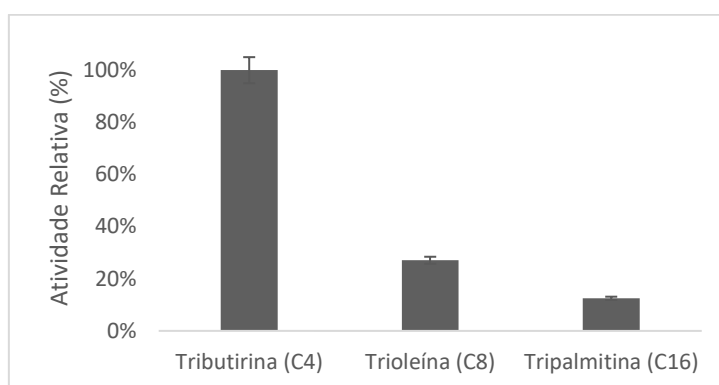


Figura 36. Atividade relativa sobre triglicerídeos de 4-16 carbonos. 100% representa a maior atividade obtida e as demais são valores relativos a esta.

5.8 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A cinética enzimática estuda as reações químicas catalisadas pelas enzimas, em especial a velocidade de reação (Punekar, 2018). O estudo da cinética de uma enzima permite elucidar os pormenores do seu mecanismo catalítico, o seu papel no metabolismo, como é controlada a sua atividade na célula e como pode ser inibida a sua atividade por drogas ou venenos, ou potenciada por outro tipo de moléculas (Hagen, 2015). Assim determinação dos parâmetros cinéticos é fundamental para caracterização de uma enzima e comparação da sua eficiência catalítica com as demais enzimas descritas na literatura (Lima *et al.*, 2001). Neste sentido, a velocidade inicial da reação é medida sobre

uma escala de concentrações de substrato (denotada como [S]). À medida que [S] aumenta, a enzima satura-se e a velocidade atinge o valor máximo $V_{\max}$ (Dixon e Webb, 1979). A partir dos resultados (Tabela 20) é possível observar que CfCLE apresenta maior $V_{\max}$ para pNPA (C2), enquanto pNPC (C8) apresenta a terceira maior $V_{\max}$. Quando comparado a literatura (Tabela 21) CfCLE apresenta elevados valores de $V_{\max}$.

Tabela 20. Parâmetros cinéticos de CfCLE

Substrato	Km (uM)	±	Kcat (s-1)	±	Kcat/Km (s-1 uM-1)	±	Vmax (uM s-1)	±
pNPA (C2)	21860	1542	87,07	6,21	0,004	0,000003	174	12,40
pNPB (C4)	850,2	23	37,37	0,34	0,044	0,00078	74	0,69
pNPC (C8)	237,26	58	14,84	1,57	0,064	0,01039	30	3,15
pNPL (C10)	6510,33	3065	5,65	2,93	0,0011	0,00071	11	5,90
pNPM (14)	17775,5	1821	10,17	0,66	0,0006	0,00002	21	1,34
pNPP (C16)	19875,5	1950	12,70	0,66	0,0063	0,00001	23	1,44

A constante de Michaelis K_m é definida como a concentração para a qual a velocidade da reação enzimática é metade de $V_{\max}$ (Dixon e Webb, 1979). Desta forma, K_m é muitas vezes atribuída o significado de afinidade da enzima pelo substrato, quanto menor o K_m maior a afinidade (Nelson, 2018). A partir dos resultados é possível observar que CfCLE apresenta menor K_m para pNPL (C8), sendo este o substrato testado com maior afinidade. Isto se deve graças capacidade da enzima de se manter em uma conformação favorável para comporta o substrato em seu do canal axiônico e promover um ambiente favorável para um estado de transição do substrato (ES). Posteriormente, as interações de ligações fracas entre a enzima e o substrato fornecem a maior parte da força que dirige a catálise enzimática, levando a formação do produto (Nelson, 2018). Quando comparado com a literatura os valores de K_m são maiores que metade das cutinases relatadas, revelando que CfCLE pode ser otimizada para obter uma maior especificidade, uma vez que existem outras enzimas com maiores especificidades descritas.

Tabela 21. Parâmetros cinéticos das cutinases descritos na literatura

Organismo Nativo	K _m (μM)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} /K _m (s ⁻¹ μM ⁻¹)	V _{max} (μM s ⁻¹)	Substrato	Referência
<i>Cryptococcus flavus</i>	237	14,88	0,0643	30	pNPC	Este trabalho
<i>Bacillus</i> sp. KY0701	720	-	-	336,8	pNPB	Adigüzel and Tunçer, 2017
<i>Fusarium solani</i>	1.36	0,071	0,32	-	pNPB	Baker <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.29	0.016	3,40	-	pNPB	Baker <i>et al.</i> , 2012
<i>Alternaria brassicicola</i>	1.96	0,22	0,97	-	pNPB	Baker <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8.96	0,084	0,56	-	pNPB	Baker <i>et al.</i> , 2014
<i>Humicola insolens</i>	2.46	0,072	1,76	-	pNPB	Baker <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adenivorans</i> LS3	1,6	-	-	-	pNPB	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adenivorans</i> LS4	1,46	-	-	-	pNPB	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Arxula adenivorans</i> LS5	1,93	-	-	-	pNPB	Bischoff <i>et al.</i> , 2015
<i>Thermobifida fusca</i>	673	8,05	0,7	-	pNPB	Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>Thermobifida fusca</i>	505	12,36	1.5	-	pNPB	Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium solani pisi</i>	272	13,95	3.2	-	pNPB	Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium oxysporum</i>	700	1,86	152,5	-	pNPB	Dimarogona <i>et al.</i> , 2015
<i>Malbranchea cinnamomea</i> S168	270	0,46	1,704	-	pNPB	Duan <i>et al.</i> , 2017
<i>Pseudomonas cepacia</i> NRRL B 2320	230	5000	-	-	pNPB	Dutta <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus nidulans</i>	6880	4,035	35,19	555,5	pNPA	Garcia <i>et al.</i> , 2017
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,21	0,01	3,49	-	pNPB	Liu <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,22	0,3	1,36	4,20	pNPB	Maeda <i>et al.</i> , 2005
<i>Tropaeolum majus</i>	2,9	-	-	0,0056	pNPB	Maiti <i>et al.</i> , 1979
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,2	0,19	9,3	-	pNPB	Nikolaivits <i>et al.</i> , 2016
<i>Sirococcous conigenus</i>	1700	-	-	-	pNPB	Nyyssola <i>et al.</i> , 2014
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	99	1468	-	42,16	pNPP	Dheeman <i>et al.</i> , 2011
<i>Glomerella cingulata</i>	7,2	0,12	-	-	pNPC	Wan <i>et al.</i> , 2014
<i>Thielavia terrestres</i>	1,1	0,01	0,77	30965	pNPB	Xu <i>et al.</i> , 2015
<i>Thielavia terrestres</i>	1	0,01	0,62	0,00041	pNPB	Yang <i>et al.</i> , 2012

A constante catalítica (K_{cat}) ou número de renovação representa o número máximo de moléculas de um substrato que a enzima pode converter em produto por unidade de tempo, considerando que a enzima está totalmente saturada com substrato (Hagen, 2006). Quanto maior o valor de K_{cat}, mais rapidamente o complexo enzima-substrato avança para a formação de produto, com consequente disponibilização do sítio ativo para nova reação (Punekar, 2018). Os resultados

experimentais demonstram um maior valor de K_{cat} foi de pNPA (C2), enquanto pNPC (C8) apresentou o terceiro maior valor. Quando comparado com a literatura, os valores de K_{cat} são maiores que das cutinases relatadas.

Como essa constante é válida para concentrações saturantes de substrato, nem sempre representa a melhor forma de comparação de eficiência catalítica (Punekar, 2018). Uma constante alternativa, conhecida como constante de especificidade, é dada pela relação K_{cat}/K_m . Esta é uma importante medida da eficiência catalítica da enzima e representa a taxa da reação em concentrações desprezíveis de substrato (Dixon e Webb, 1979). Os valores de K_{cat}/K_m determinados para diferentes substratos e uma mesma enzima, ou para duas enzimas e um mesmo substrato, permite a comparação da efetividade de enzimas em diferentes condições operacionais (Hagen, 2006). O limite superior dessa relação é de aproximadamente $10^{14} - 10^{15}/(s.\mu M)$, determinado pelo encontro controlado por difusão de uma enzima e seu substrato. Enzimas que apresentam a relação K_{cat}/K_m próxima desse limite superior atingiram a “perfeição catalítica”, ou seja, sua velocidade catalítica é restringida apenas pela taxa de encontro da enzima e seu substrato na solução (Dixon e Webb, 1979). A partir dos resultados é possível observar que CfCLE apresenta K_{cat}/K_m pequeno, com maior especificidade para pNPC (C8). Quando comparado com a literatura CfCLE apresenta o menor valor descrito para as cutinases publicadas.

Entretanto, utilizar a relação K_{cat}/K_m como medida de desempenho ou critério de seleção de uma enzima, sem considerar outros fatores, pode levar a uma seleção errônea do biocatalisador, principalmente porque essa relação negligencia a contribuição de importantes fatores, como concentração de substrato e possíveis inibições (Punekar, 2018). Neste sentido, foram avaliadas as capacidades de aplicação da enzima e seus parâmetros de eficiência. Assim, nas próximas seções serão exploradas algumas aplicações que exploram as principais propriedades apresentadas pela enzima.

5.9 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

5.9.1 Hidrólise de PLA, PHB e PCL

Uma das principais aplicações das cutinases atualmente tem sido na degradação de biopolímeros, devido ao grande descarte de plásticos no meio ambiente (Urbanek *et al.*, 2020). Neste sentido, os biopolímeros PLA, PHB e PLC são amplamente utilizados para produção de plásticos biodegradáveis para substituir os produtos convencionais. Porém, estes polímeros têm lenta degradabilidade nas temperaturas e condições encontradas no meio ambiente (Tan *et al.*, 2021). Diante disto, foi avaliado o potencial de degradação dos polímeros biodegradáveis do sobrenadante bruto e do purificado de CfCLER. Desta forma, obteve-se como resultado a degradação de 28% de PLA, 6% de PHB e 83% de PLC para o sobrenadante bruto e 52% de PLA, 32% de PHB e 84% de PLC para o purificado (Figura 37).

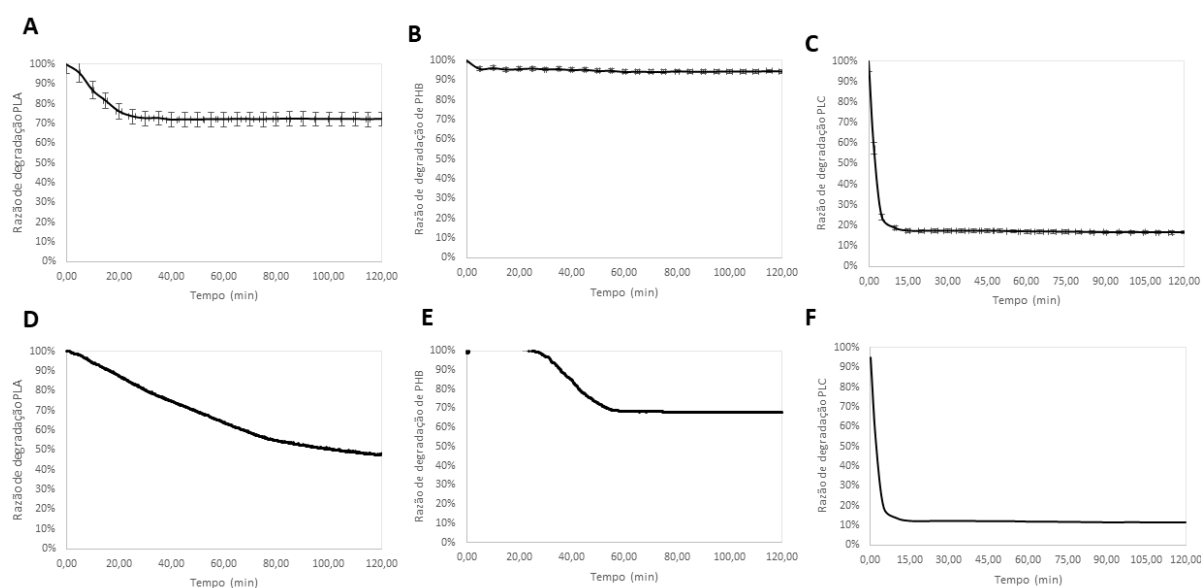


Figura 37. Representação gráfica da hidrólise de biopolímeros em pH 7,0 e 37°C. (A) Razão da degradação de PLA ao longo do tempo sobrenadante bruto; (B) Razão de degradação de PHB ao longo do tempo sobrenadante bruto; (C) Razão de degradação de PLC ao longo do tempo sobrenadante bruto; (D) Razão da degradação de PLA ao longo do tempo com enzima purificada e pH 7,0; (E) Razão da degradação de PHB ao longo do tempo com enzima purificada e pH 5,0; (F) Razão da degradação de PLC ao longo do tempo com enzima purificada e pH 7,0.

A Poli(ϵ -caprolactona) possui lenta degradação em aterros sanitários devido sua alta hidrofobicidade e estrutura semi-cristalina (Tan *et al.*, 2021) e só é degradada por um número limitado de enzimas. Assim, ao comparar a CfCLER com a cutinase de *Cryptococcus* sp. S-2 (CLE) obtida por Masaki e colaboradores (2005), observa-se que a CfCLER apresenta um perfil de degradação

com menor tempo para PLC (15 min), em comparação com às 5 horas que a CLE requer para atingir o mesmo percentual de degradação. Isso demonstra o potencial da enzima na degradação rápida de PLC e sua vantagem frente outras cutinases. Deve-se ressaltar ainda que este resultado parece ser atingido tanto com a amostra proveniente diretamente do meio de cultura quando da amostra purificada, sugerindo que a amostra ainda sem purificação pode ser empregada de forma direta, reduzindo o custo de produção da enzima para esta aplicação uma vez que elimina a etapa de purificação do processo. Além da vantagem comercial, o uso de sobrenadante facilita a recuperação das células para uma nova etapa de produção usando-as como inóculo.

O ácido polilático (PLA) é um dos plásticos mais utilizado no mercado, destacando-se pela crescente demanda de produção dentre todos os bioplásticos. Porém, PLA é bastante resistente à biodegradação no meio ambiente (Tan *et al.*, 2021). Sabe-se que existem três estereoisômeros de PLA: ácido poli (L- láctico) (PLLA), poli (D-ácido láctico) (PDLA) e poli (DL- ácido láctico) racêmico (PDLLA). Desta forma, o PLA pode ser um polímero vítreo amorfo (PDLLA) ou semicristalinos (PLLA e PDLA) no estado sólido, dependendo da sequência de unidades de repetição enantioméricas (L e D) na estrutura do polímero. Assim, o PLA enantiomericamente puro é mais difícil de degradar em ambientes naturais do que outros biopolímeros, principalmente devido ao seu alto ponto de fusão (T_m) e temperatura de transição vítrea (T_g). Na verdade, o PLLA e PDLA semicristalino mostram um $T_g = 50-80^\circ \text{C}$ e um $T_m = 173-178^\circ \text{C}$, enquanto o PDLLA amorfo racêmico apresenta um $T_g = 55-60^\circ \text{C}$ (Urbanek *et al.*, 2020). Neste trabalho, CfCLE foi capaz de degradar mais de 50% do PLA na forma mais cristalina (PDLA), em temperatura inferior a temperatura de transição vítrea (T_g), demonstrando a capacidade da enzima no processamento do biopolímeros em condições mais brandas que nos tratamentos térmicos e químicos que comprometem as características físicas do biopolímero reciclado (Tan *et al.*, 2021).

Bioplásticos à base de PHA como PHB, são o tipo mais comum usado para fazer sacolas de compras, copos transparentes, materiais de impressão tridimensional (3D) e outros produtos, pois são rapidamente degradados em compostagem industriais e condições anaeróbicas. Porém, em condições

aeróbicas do meio ambiente, eles se biodegradam tão lentamente quanto os plásticos à base de combustíveis fósseis (Lima *et al.*, 2021). Nesse sentido, PHAs tem sido empregadas para degradação deste tipo de biopolímero e algumas cutinases tem demonstrado atividade sobre PHB. Porém, Suzuki e colaboradores (2014), em sua revisão, relatam que outros autores também identificaram cutinases que possuem baixa capacidade de degradação de PHB, semelhante ao observado para a CfCL_{Er}.

Neste sentido, diversas condições de pH e temperatura foram avaliadas para obter os níveis de degradação apresentados acima. Em conjunto, os resultados validam a hipótese que a cutinase de *C. flavus* é capaz de degradar biopolímeros, em especial PLC. Além disso, é possível afirmar que a taxa de degradação do sobrenadante foi próxima da observado pela enzima purificada, permitindo a eliminação da etapa de purificação em um Estratégia Industrial. O que reduziria o custo de produção da enzima para este tipo de aplicação e favoreceria sua produção em escala industrial.

5.9.2 Degradação de filme PET

Polietileno tereftalato (PET) é um polímero termoplástico formado a partir de ácido tereftálico (TPA) e etileno glicol (EG). Ao longo dos últimos anos, a produção de PET tem crescido e devido ao descarte incorreto de embalagens de uso único, este polímero tem sido acumulado exponencialmente, causando problemas ambientais (Lima *et al.*, 2021). Os processos de reciclagem mecânica e química têm-se mostrado onerosos e ineficientes, além de comprometer as propriedades físicas do polímero (Urbanek *et al.*, 2020). Nesse sentido, diversos pesquisadores têm buscado soluções ambientalmente amigáveis como uso de microrganismos e enzimas (Tan *et al.*, 2021). Assim, as cutinases tem ganhado grande destaque, apresentando capacidade de despolimerizar o PET em condições próximas à transição vítrea. No entanto, é necessário identificar enzimas capazes de degradar o PET em temperaturas mais brandas. Desta forma, neste trabalho buscamos avaliar a capacidade de degradação de filmes cristalinos de PET pela CfCL_{Er} em condições mais brandas de temperatura (30°C) e pH (7,0). Porém, o PET não é facilmente preparado como uma emulsão e, portanto, não pode ser submetido às mesmas análises usadas para os poliésteres alifáticos. Em vez

disso, a avaliação padrão usada é a análise da degradação do filme de PET padrão, examinado por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV).

A partir dos resultados apresentados na Figura 38 é possível observar alterações morfológicas, como presença de orifícios e alterações na superfície do filme PET quando comparado ao não tratado (A e B) no qual a superfície é lisa, sem orifícios ou rugosidades. Em C e seu respectivo aumento em D é possível observar a formação de colônias de microrganismos (indicado pela seta) no filme tratado com 500 μ L (7,5 μ M de enzima) do sobrenadante bruto, além de rugosidades e sulcos sobre a superfície do filme PET. Já em E e seu respectivo aumento em F, é possível observar a formação de rugosidades na superfície do filme e orifícios (indicado pela seta), colonizado por microrganismo no filme tratado com 1000 μ L (15 μ M de enzima) do sobrenadante bruto. Os microrganismos presentes no filme colaboraram para degradação do mesmo, podendo ser utilizado futuramente em uma degradação direta em biorreator. Porém, mais a frente é possível observar que a ação direta da enzima purificada apresenta maior efetividade.

A partir da figura 31 de G à L, temos as imagens do tratamento com a enzima purificada. Em G e seu respectivo aumento em H, é possível observar uma maior formação de orifícios e alterações nas fibras que formam o filme PET (indicado por seta) tratado com 500 μ L de CfCLER purificada (796 μ M). Em I e seus respectivos aumentos em J, K e L é possível observar uma alteração da superfície do filme PET, apresentando uma degradação extensiva da superfície e rugosidades (indicadas pela seta) quando tratado com 1000 μ L de CfCLE purificado (1592 μ M).

Resultados semelhantes foram observados por Austin e colaboradores (2018), Kawai e colaboradores (2014), Saman e colaboradores (2014), Ronkvist e colaboradores (2009a) e outros. Nestes trabalhos também é possível observar alterações na superfície do filme PET, como surgimento de rugosidades, rachaduras, orifícios, fendas e despolimerização local. Além disso, é relatado por Yoshida e colaboradores (2016) a completa degradação do filme PET pela bactéria *Ideonella sakaiensis*, produtora de PETase em temperatura ambiente.

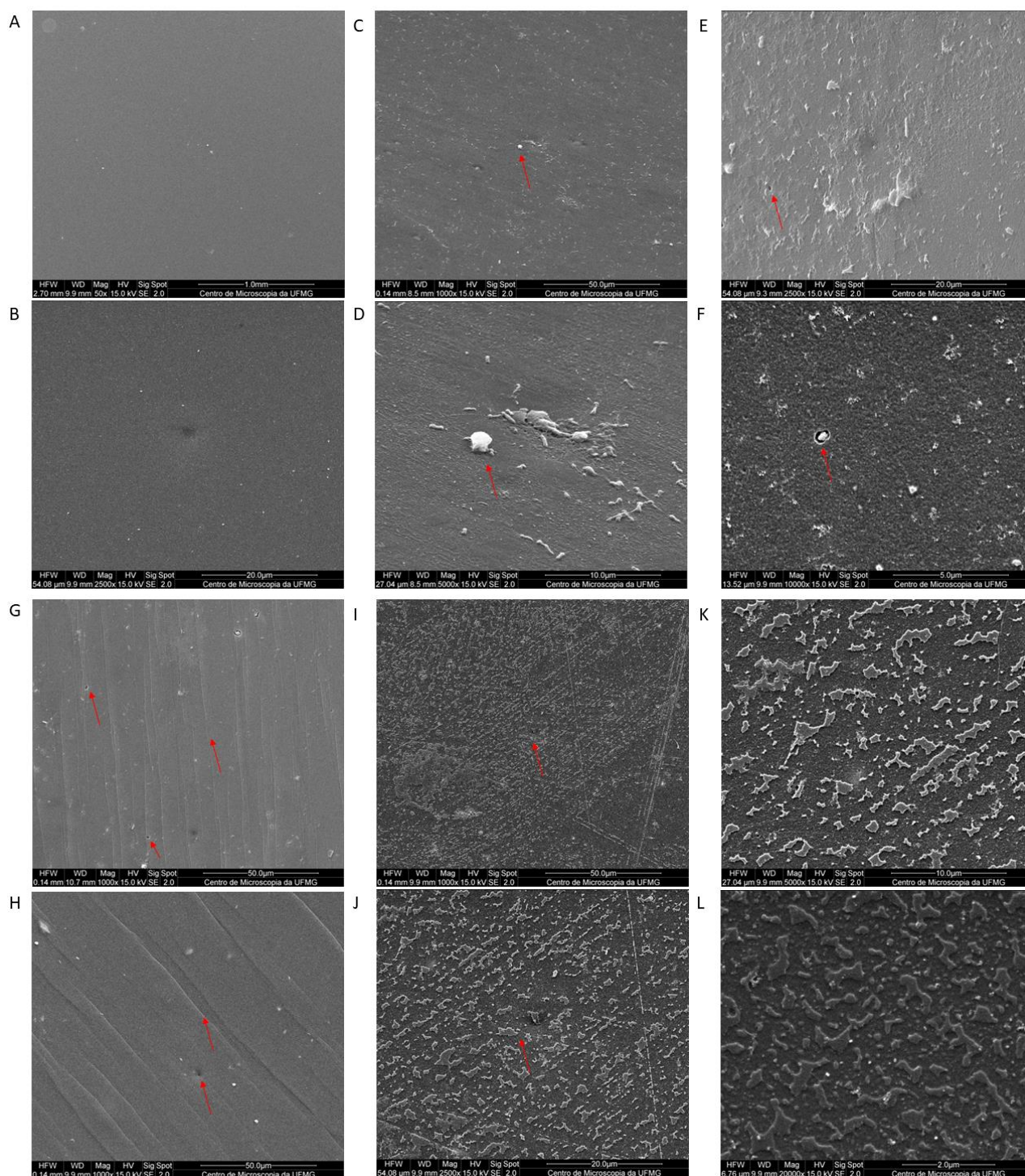


Figura 38. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) de filme PET tratados a 30°C por 120 horas. A. Filme PET controle aumento 1mm; B. Filme PET controle aumento de 20µm; C. Filme PET tratado com sobrenadante bruto aumento 50µm; D. Filme PET tratado com sobrenadante bruto aumento 10µm; E. Filme PET tratado com sobrenadante bruto aumento 20µm; F. Filme PET tratado com sobrenadante bruto aumento 5µm; G. Filme PET tratado com enzima purificada aumento 50µm; H. Filme PET tratado com enzima purificada aumento 50µm; I. Filme PET tratado com enzima purificada aumento 50µm; J. Filme PET tratado com enzima purificada aumento 20µm; K. Filme PET tratado com enzima purificada aumento 10µm; L. Filme PET tratado com enzima purificada aumento 2µm; Setas vermelhas indicam regiões degradadas.

Yoshida e colaboradores (2016) relatam em seu trabalho que a película de PET foi extensamente danificada e completamente degradada após 6 semanas a 30°C em contato com *I. sakaiensis*. A PETase purificada quando incubada com filme PET a 30°C por 18 horas promoveu uma degradação semelhante à observada pelo microrganismo nativo. Posteriormente, Austin e colaboradores (2018) avaliaram a capacidade da PETase de *I. sakaiensis* em degradar filmes PET de cristalinidade próxima a de garrafas PET (13,3), observando a erosão superficial e formação de caroços, além da redução da cristalinidade (10,1).

Já para as cutinases, Ronkvist e colaboradores (2009) demonstram em seu trabalho o desenvolvimento das alterações morfológicas ao longo do tempo em intervalos de 24 horas. De modo que, à medida que o tempo passava o filme PET perdeu 18% à 95% de massa, sofrendo alterações de pequenas rugosidades e orifícios de 5µm de profundidade até a completa despolimerização em 96 horas pela cutinase de *Humicola insolens*. Resultado semelhante foi observado neste trabalho (dados não mostrados), no qual o filme PET sofre maiores alterações morfológicas conforme fica mais tempo em contato com CfCLEr.

Kawai e colaboradores (2014) relataram ainda que filmes de PET apresentaram perda parcial da hidrofobicidade ao afundarem nos tubos de ensaio, enquanto os filmes não tratados se mantinham na superfície da solução. Curiosamente, o mesmo foi observado em nosso trabalho, constatando mais uma característica da degradação parcial do filme. Além disso, no trabalho referenciado acima, os autores relatam que o filme PET não apresentou alterações morfológicas em temperaturas abaixo de 60°C, mantendo um aspecto liso e intacto semelhante ao filme não tratado. Neste trabalho, entretanto, o filme PET tratado com CfCLE apresentou alterações em temperatura mais brandas (35°C), o que reduziria o custo de aplicação industrial da enzima em estudo.

No trabalho de Seman e colaboradores (2014) foi realizado a comparação do tratamento alcalino com o enzimático, e foi possível observar a formação de fendas e grandes orifícios quando tratado com a cutinase de *Glomerella cingulata*. Da mesma forma, foi possível observar caroços e rugosidades, além de orifícios quando tratados com cutinase de *Fusarium solani pisi*. Por outro lado,

observou-se alterações morfológicas menos significativas no tratamento com hidróxido de sódio 1 M. Demonstrando a eficiência do tratamento enzimático frente ao tratamento químico.

Por outro lado, Tan e colaboradores (2021) relatam que a cutinase de *Amycolatopsis mediterranei* (AML) não foi capaz de promover alterações morfológicas no filme PET. Apesar de ser capaz de hidrolisar polímeros alifáticos (PLA, PBS, PLC) a enzima foi incapaz de hidrolisar polímeros aromáticos como PET. Ao analisarem a estrutura tridimensional da enzima e compará-la com as enzimas degradadoras de PET disponíveis, eles notaram que o alinhamento da sequência revelou que a AML exibe resíduos correspondentes com enzimas degradadoras de PET do Tipo I (*Thermobifida* fusca cutinase 62% de identidade de sequência, 77% de similaridade) mais que do Tipo II (PETases *Ideonella sakaiensis* PETase 49% de identidade de sequência, 67% de similaridade). As enzimas do Tipo I têm menor atividade de degradação de PET do que as do Tipo II (Joo *et al.*, 2018). Isto poderia justificar a menor capacidade de degradação de PET por CfCLER em comparação à PETase de *I. sakaiensis*.

Em conjunto, os resultados apresentados sustentam a hipótese de que CfCLER é capaz de degradar PET, ainda que com menor eficiência se comparada à PETase de *I. sakaiensis*; abrindo novas perspectivas para estudos futuros para otimização do processo e análises refinadas dos produtos formados a partir da degradação.

5.9.3 Atividade em detergentes de roupa

Outra das aplicações das cutinases e lipases é a utilização das enzimas como aditivos de detergentes sólidos e líquidos para lavagem de louça e roupa (Sebastião *et al.*, 1993). Esta aplicação se baseia no princípio de que estas enzimas são capazes de hidrolisar os triglicerídeos em ácidos graxos solúveis, removendo manchas e gorduras de objetos e tecidos (Castro-Ochoa *et al.*, 2012). Desta forma, foi avaliado a atividade de CfCLER na presença das principais marcas de detergentes de roupa disponíveis no mercado. Os resultados (Figura 39) demonstram que, para todos os detergentes, a atividade observada foi maior que o controle, sustentando a hipótese que esta enzima possa ser utilizada como aditivo de detergentes. É interessante observar que CfCLER apresentou menor

atividade no sabão OMO, que leva em sua composição o tensoativo Alquil Benzeno Sulfonato de Sódio (LAS). O LAS possui uma estrutura similar ao SDS que apresentou menor atividade residual de CfCLER. Garcia e colaboradores (2017) relatam semelhante resultado, em que a cutinase de *Aspergillus nidulans* apresentou baixa atividade residual em detergentes contendo sais de SDS em concentrações de 5% inibindo a ação da cutinase. Além disso, eles relatam que em Ariel, um tensoativo aniônico, a atividade chegou a aumentar quase 2 vezes. Assim, estes dados sugerem que CfCLE possa ser utilizada em formulações sem SDS ou em baixas concentrações.

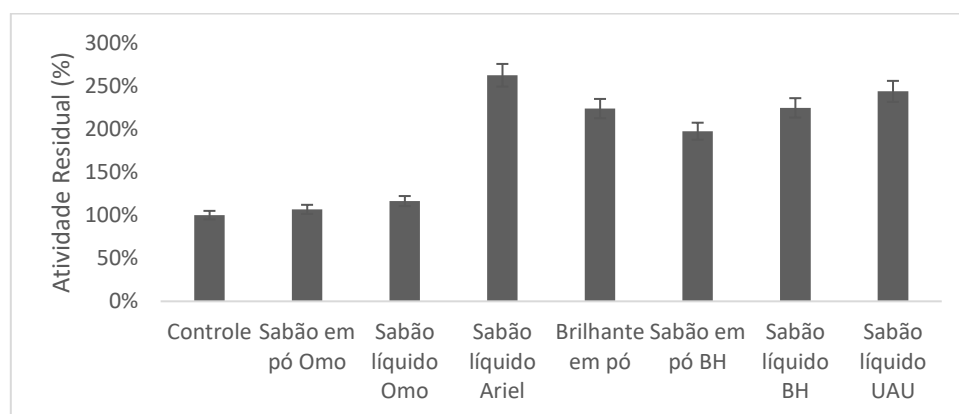
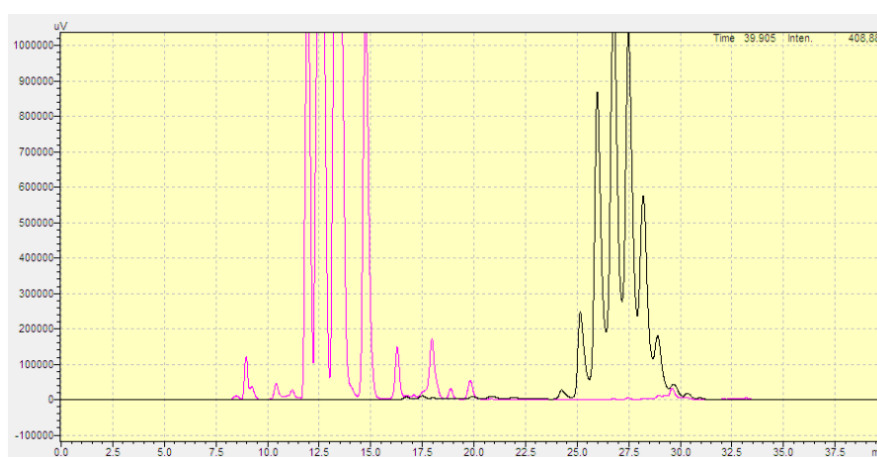


Figura 39. Atividade residual da cutinase na presença de detergentes. Controle representa a atividade na ausência dos detergentes e as demais atividades são relativas ao valor mensurado no controle

5.9.4 Avaliação da produção de Biodiesel por CfCLER

Por fim, a última aplicação da cutinase avaliada foi a capacidade de realizar transesterificação de triacilgliceróis em ésteres metílicos de ácido graxo (FAME), comercialmente conhecidos como biodiesel. Neste sentido, foram avaliadas duas estratégias com repetição em triplicata para certificação do resultado. Na primeira estratégia todos os componentes da reação (enzima, óleo de soja e metanol) eram adicionados nas concentrações encontradas na literatura (Kamini e Iefuji, 2001; Garcia *et al.*, 2017). Na segunda estratégia, o metanol era adicionado em duas etapas, reduzindo sua concentração inicial. Porém, em ambas as estratégias não foi quantificado a formação de FAMES (Figura 40). As amostras apresentaram perfil bem distinto do padrão biodiesel, e apresentaram padrão semelhante ao de triglicerídeo de acordo com a amostra, o que sugere baixa eficiência da reação. Apenas na segunda estratégia houve a formação de baixa concentração de glicerol, diglicerídeos e esteril-glicosídeos, mas sem detecção de monoglicerídeos (dados não apresentados).

A)



B)

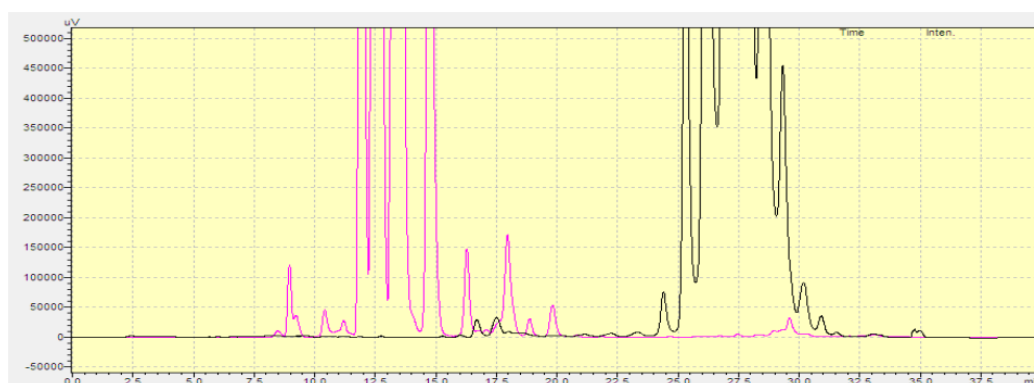


Figura 40. Cromatograma amostras vs biodiesel. Amostras em preto e padrão de biodiesel em rosa. A) Primeira estratégia com adição completa de metanol; B) Segunda estratégia com adição de metanol em duas etapas

Garcia e colaboradores (2017) relatam que a atividade da enzima pode ser inibida pelo metanol e glicerol que estão presentes na mistura de reação. Para reduzir este efeito inibitório é necessário a remoção contínua de glicerol e adição gradual de metanol. Dentre alguns fatores adicionais que podem ser melhorados para obter melhores resultados, podemos citar: maior concentração de biocatalisador utilizado (que foi baixa em comparação com muitos estudos, que relatam uma quantidade de 20%), alteração das condições de reação (como aumento na temperatura da reação, alteração do pH), o procedimento de imobilização da enzima, alteração das fontes de óleos, alteração da razão reagente e os solventes utilizados de 1:1 para 1:3, de forma que haja um excesso de metanol para evitar reações reversas (Hama e Kondo, 2013). Além disso, pode-se reduzir o tempo de ensaio para diminuir a possibilidade de reações reversas.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi apresentado o estudo *in silico* da cutinase CfCLE de *Cryptococcus flavus* e o estudo das características bioquímicas e estruturais e aplicação biotecnológica da enzima recombinante CfCLER produzida em *K. phaffii* (*P. pastoris*). Os resultados de modelagem molecular apresentados neste trabalho permitiram concluir que a enzima CfCLER pertence à família das serino hidrolases e que o estudo estrutural desta enzima, em especial do domínio N-terminal, pode adicionar informações importantes acerca dos determinantes de resistência a solventes orgânicos desta classe de enzimas. O modelo estrutural obtido para a CfCLER mostrou-se útil no delineamento da estratégia de produção e purificação da enzima recombinante; com algumas limitações quanto aos processamentos pós-traducionais que modificaram a enzima produzida.

Os processos de produção e purificação da enzima recombinante CfCLER, desenvolvidos no presente trabalho, mostraram-se eficientes, permitindo que preparações enzimáticas com alto teor de pureza e atividade específica fossem obtidas. O vetor de expressão pPICZαB-CfCLER, bem como as estratégias de purificação da proteína recombinante, produzida a partir do respectivo cassette de expressão, mostraram-se funcionais e eficientes, aumentando mais de 23 vezes a produção da enzima e abrindo perspectiva para produção e purificação de outras proteínas recombinantes utilizando os mesmos processos. Os resultados apresentados abrem perspectiva para o escalonamento da produção da CfCLER em *K. phaffii*, com vistas ao desenvolvimento de um processo viável.

Os ensaios de caracterização dispensam a necessidade de modificação *in vitro* da proteína, como deglicosilação para obtenção de amostra com menor heterogeneidade. Além disso, os ensaios dispensaram a clivagem da cauda C-terminal His-Tag para purificação. Estes resultados abrem perspectiva para cristalização da enzima e identificação dos seus determinantes estruturais.

A enzima CfCLER possui propriedades cinéticas similares às aquelas observadas na literatura, mostrando-se ativa sobre os substratos sintéticos para-nitrofenóis e sobre os substratos naturais: cutina e triacilgliceróis. O conhecimento adquirido pelo estudo do efeito da presença de solventes orgânicos na atividade enzimática acrescenta novas informações acerca do comportamento catalítico

de cutinases, permitindo direcionar estratégias de aplicações biotecnológicas destas enzimas. Neste contexto, os resultados apresentados indicam que a resistência da enzima CfCLER na presença de álcoois como metanol, viabiliza o uso da enzima em reações de esterificação e transesterificação.

A enzima CfCLER possui faixas de pH e temperatura de atuação de 6,0-11,0 e 30-50°C, respectivamente, muito similares as observadas na literatura. Entretanto, a resistência a solventes orgânicos, surfactantes, e estabilidade de armazenamento foram superiores as enzimas relatadas. Os atributos enzimáticos (faixas de pH e temperatura de atuação, termoestabilidade e estabilidade de armazenamento) apresentados pela CfCLER demonstram que esta enzima possui elevado potencial para aplicação biotecnológica na indústria, quando a mesma é comparada a outras cutinases caracterizadas na literatura para o mesmo fim. Estes resultados abrem perspectiva para uso da enzima em aplicações diversas, como uso em detergentes de roupas e na indústria alimentícia.

A enzima se mostrou incapaz de produzir biodiesel nas condições testadas. Assim, seria necessário um estudo mais aprofundado para esgotar as possibilidades desta aplicação antes de descartar o potencial apresentado pela enzima. Que pode ser realizado através do estudo da: utilização de maior concentração de biocatalisador, alteração das condições de reação, imobilização da enzima, alteração das fontes de óleos, alteração da razão molar de reagente e solventes utilizados.

As preparações enzimáticas de CfCLER purificada ou de sobrenadante concentrado de *K. phaffii* recombinante 26 são capazes de catalisar a hidrólise de diferentes biopolímeros alifáticos (PLA e PLC), bem como de polímeros aromáticos (PET), apresentando eficiência de hidrólise comparável ou superiores àquelas reportadas na literatura. Estes resultados abrem perspectiva para uso da enzima CfCLER, em sua forma purificada ou como parte do sobrenadante de cultura de *K. phaffii*, na indústria de degradação de biopolímeros, especialmente, no processamento de bioplásticos.

REFERÊNCIAS

- ABEDALWABA, M., WANG, L., WANG, F., LI, C. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. *Reviews on Advanced Materials Science*, v. 34, p. 123–140, 2013.
- ABERGEL, C., MARTINEZ, C., FONTECILLA-CAMPS, J., CAMBILLAU, C., DE GEUS, P., & LAUWEREYS, M. Crystallization and preliminary X-ray study of a recombinant cutinase from *Fusarium solani* pisi. *Journal of molecular biology*, v. 215, p. 215-216, 1990.
- ADAMS, P. D., AFONINE, P. V., BUNKÓCZI, G., CHEN, V. B., DAVIS, I. W., ECHOLS, N., & ZWART, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 66, p. 213-221, 2010.
- ADIGÜZEL, Ali Osman; TUNÇER, Münir. Purification and characterization of cutinase from *Bacillus* sp. KY0701 isolated from plastic wastes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 47, p. 925-933, 2017.
- AHMAD, M., HIRZ, M., PICHLER, H., & SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, p. 5301–5317, 2014.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING. Materials ASTM D6400. In Standard Specification for Labeling of Plastics Designed to be Aerobically Composted in Municipal or Industrial Facilities; ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2019
- ARRUDA, A. Utilização do promotor do gene PGK1 de *Pichia pastoris* para expressão heteróloga. 2008. 122f. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2008.
- AUSTIN, H. P., ALLEN, M. D., DONOHOE, B. S., RORRER, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., ... & Beckham, G. T. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, p. 4350-4357, 2018.
- AW, R.; POLIZZI, K. M. Can too many copies spoil the broth? *Microbial Cell Factories*, v. 12, p. 128, 2013.
- BAGHERI, A. R., LAFORSCH, C., GREINER, A., & AGARWAL, S. Fate of So-Called Biodegradable Polymers in Seawater and Freshwater. *Global Challenges*, v. 1, p. 1-5, 2017.
- BASTIOLI, C.; CERUTTI, A.; GUANELLA, I.; ROMANO, G.C.; TOSIN, M. Physical state and biodegradation behavior of starch-polycaprolactone systems. *J. Environ. Polym. Degrad.* v. 3, p. 81–95, 1995.
- BELL, G., JANSSEN, A., HALLING, P. J. "Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities." *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, p. 471-477, 1997.
- BIOPLASTICS MARKET DATA 2017, European Bioplastics, disponível em <https://www.european-bioplastics.org/market/>. 21.06.2018 acessado em 18 janeiro 2020.
- BISCHOFF, F., LITWIŃSKA, K., CORDES, A., BARONIAN, K., BODE, R., SCHAUER, F., & KUNZE, G. Three new cutinases from the yeast *Arxula adeninivorans* that are suitable for biotechnological applications. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, p. 5497-5510, 2015.
- BOETTNER, M., PRINZ, B., HOLZ, C., STAHL, U., & LANG, C. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, v. 99, p. 51-62, 2002.

- BONETA, S., ARAFET, K., & MOLINER, V. QM/MM study of the enzymatic biodegradation mechanism of polyethylene terephthalate. *Journal of chemical information and modeling*, v. 61, p. 3041-3051, 2021.
- BRASIL (2010) Lei nº 12.305. Diário Oficial da União do Brasil, Brasília, DF, nº 147, Seção 1, p. 3, 3 de agosto. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm (acessado em 22 de abril de 2022).
- BOYANDIN, A.N.; PRUDNIKOVA, S.V.; KARPOV, V.A.; IVONIN, V.N.; ĐŌ, N.L.; NGUYỄN, T.H.; LÊ, T.M.H.; FILICHEV, N.L.; LEVIN, A.L.; FILIPENKO, M.L.; *et al.* Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, v 83, p. 77–84, 2013.
- BROWNE, Mark A.; GALLOWAY, Tamara; THOMPSON, Richard. Microplastic--an emerging contaminant of potential concern?. *Integrated environmental assessment and Management*, v. 3, n. 4, p. 559-561, 2007.
- BUI, X. T., NGUYEN, P. T., NGUYEN, V. T., DAO, T. S., & NGUYEN, P. D. Microplastics pollution in wastewater: Characteristics, occurrence and removal technologies. *Environmental Technology & Innovation*, v. 19, p. 101013, 2020.
- BURROWS, S. D., FRUSTACI, S., THOMAS, K. V., & GALLOWAY, T. Expanding exploration of dynamic microplastic surface characteristics and interactions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 130, p. 115993, 2020.
- BYUN, Y.; KIM, Y.T. Chapter 142—Bioplastics for Food Packaging: Chemistry and Physics. In *Innovations in Food Packaging*, 2nd ed.; Han, J.H., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014; p. 353–368.
- CARNIEL, A., DE ABREU WALDOW, V., & DE CASTRO, A. M. A comprehensive and critical review on key elements to implement enzymatic PET depolymerization for recycling purposes. *Biotechnology Advances*, 52, 107811, 2021.
- CALADO, C. R., FERREIRA, B. S., DA FONSECA, M. M., CABRAL, J. M., & FONSECA, L. P. Integration of the production and the purification processes of cutinase secreted by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 strain. *Journal of biotechnology*, v. 109, p. 147-158, 2004.
- CARVALHO, C. M. L., AIRES-BARROS, M. R., CABRAL, J.M.S. Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol Bioeng*, v. 66, p. 17-34, 1999.
- CARRIÈRE, F., THIRSTRUP, K., HJORTH, S., FERRATO, F., NIELSEN, P. F., WITHERS-MARTINEZ, C., ... & VERGER, R. Pancreatic lipase structure– function relationships by domain exchange. *Biochemistry*, v. 36, p. 239-248, 1997.
- CASTRO-OCHOA, D., PEÑA-MONTES, C., GONZÁLEZ-CANTO, A., ALVA-GASCA, A., ESQUIVEL-BAUTISTA, R., NAVARRO-OCAÑA, A., & FARRÉS, A. (2012). ANCUT2, an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(5), 1275-1290.
- CHANDAL, AK, FORTE, MBS, GONÇALVES, IS. Brazilian biorefineries from second generation biomass: Critical insights from industry and future perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 15, p. 1190–1208, 2021.
- CHEN, G., FU, Z., YANG, H., & WANG, J. An overview of analytical methods for detecting microplastics in the atmosphere. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 130, p. 115981, 2020.
- CHEN, S., SU, L., CHEN, J., & WU, J. Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotec. Adv.*, v. 31, p. 1754-67, 2013.
- CHEN, Z., WANG, D., CONG, Y., WANG, J., ZHU, J., YANG, J., RAO, X. Recombinant antimicrobial peptide hPAB-β expressed in *Pichia pastoris*, a potential agent active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Microb Biotechnol.*, v. 89, p. 281-91, 2011.

- CHEN, S., SU, L., BILLIG, S., ZIMMERMANN, W., CHEN, J., & WU, J. Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 63, p. 121-127, 2010.
- CHEN, S., TONG, X., WOODARD, R. W., DU, G., WU, J., & CHEN, J. Identification and characterization of bacterial cutinase. *Journal of biological chemistry*, v. 283, p. 25854-25862, 2008.
- CHIN, I. S., MURAD, A. M. A., MAHADI, N. M., NATHAN, S., & BAKAR, F. D. A. Thermal stability engineering of *Glomerella cingulata* cutinase. *Protein Engineering, Design & Selection*, v. 26, p. 369-375, 2013.
- CHIN, J. T., WHEELER, S. L., & KLIBANOV, A. M. On protein solubility in organic solvent. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 140-145, 1994.
- CHONG, J. W. R., TAN, X., KHOO, K. S., NG, H. S., JONGLERTJUNYA, W., YEW, G. Y., & SHOW, P. L. Microalgae-based bioplastics: Future solution towards mitigation of plastic wastes. *Environmental research*, 112620, 2021.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res.*, v. 16, p. 10881-10890, 1988.
- CUI, Y.; CHEN, Y.; LIU, X.; DONG, S.; TIAN, Y.E.; QIAO, Y.; MITRA, R.; HAN, J.; LI, C.; HAN, X.. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy. *Acs Catal.*, v. 11, p. 1340-1350, 2021.
- CUI, HAIYANG, LINGLING ZHANG, LOBNA ELTOUKHY, QIANJIA JIANG, SEVAL KÜBRA KORKUNÇ, KARL-ERICH JAEGER, ULRICH SCHWANEBERG, AND MEHDI D. DAVARI. "Enzyme hydration determines resistance in organic cosolvents." *ACS Catalysis* v. 10, p. 14847-14856, 2020.
- DAVY, A. M.; KILDEGAARD, H. F.; ANDERSEN, M. R. Cell Factory Engineering. *Cell Systems*, v. 4, p. 262-275, 2017.
- DEGANI, O., SALMAN, H., GEPSTEIN, S., & DOSORETZ, C. G. Synthesis and characterization of a new cutinase substrate, 4-nitrophenyl (16-methylsulfone ester) hexadecanoate. *J Biotechnol*, v. 121, p. 346-350, 2006.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, E.V. DIN EN ISO 14855-1. Bestimmung der vollständigen aeroben Bioabbaubarkeit von Kunststoff-Materialien unter den Bedingungen kontrollierter Kompostierung; Deutsches Institut für Normung: Berlin, Germany, 2013.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG DIN EN 13432. Verpackung—Anforderungen an die Verwertung von Verpackungen durch Kompostierung und biologischen Abbau—Prüfschema und Bewertungskriterien für die Einstufung von Verpackungen. Dtsch. Fass. EN 2000, 13432, 2007-2010.
- DHEEMAN, D. S., HENEHAN, G. T., & FRÍAS, J. M. Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. *Bioresource technology*, v. 102, p. 3373-3379, 2011.
- DI BISCEGLIE, F., QUARTINELLO, F., VIELNASCHER, R., GUEBITZ, G. M., & PELLIS, A. Cutinase-Catalyzed Polyester-Polyurethane Degradation: Elucidation of the Hydrolysis Mechanism. *Polymers*, v. 14, p. 411, 2022.
- DIMAROGONA, M., NIKOLAIVITS, E., KANELLI, M., CHRISTAKOPOULOS, P., SANDGREN, M., & TOPAKAS, E. Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1850, p. 2308-2317, 2015.

- DING, J., GAO, M., HOU, G., LIANG, K., YU, R., LI, Z., & SHI, Z. Stabilizing porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* with a DO-Stat glycerol feeding strategy based on online ethanol measurement. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 89, p. 1948-1953, 2014.
- DIXON, M.; WEBB, E. C. *Enzymes*. London: Longman Group Limited, 1979.
- DOI, Y., KANESAWA, Y., TANAHASHI, N., & KUMAGAI, Y. Biodegradation of microbial polyesters in the marine environment. *Polym. Degrad. Stab.*, v. 36, p. 173-177, 1992.
- DUAN, X., JIANG, Z., LIU, Y., YAN, Q., XIANG, M., & YANG, S. High-level expression of codon-optimized *Thielavia terrestris* cutinase suitable for ester biosynthesis and biodegradation. *International journal of biological macromolecules*, v. 135, p. 768-775, 2019.
- DUAN, X., LIU, Y., YOU, X., JIANG, Z., YANG, S., & YANG, S. High-level expression and characterization of a novel cutinase from *Malbranchea cinnamomea* suitable for butyl butyrate production. *Biotechnology for biofuels*, v. 10, p. 1-14, 2017.
- DUTTA, K., KRISHNAMOORTHY, H., & DASU, V. V. Novel cutinase from *Pseudomonas cepacia* NRRL B 2320: Purification, characterization and identification of cutinase encoding genes. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 59, p. 171-184, 2013.
- DUTTA, K., SEN, S., VEERANKI, V. D. Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochem*, v. 44, p. 127-134, 2009.
- EGMOND, M. R., J. DE VLIEG, H. M. VERHEIJ, AND G. H. DE HAAS. "In Malcata, FX (eds.), Engineering of/with Lipases." P. 193-202, 1996.
- EGMOND, MAARTEN R., AND JACOB DE VLIEG. "Fusarium solani pisi cutinase." *Biochimie*, v. 82, p. 1015-1021, 2000.
- EILERT, E., ROLF, T., HEUMAIER, A., HOLLENBERG, C. P., PIONTEK, M., & SUCKOW, M. Improved processing of secretory proteins in *Hansenula polymorpha* by sequence variation near the processing site of the alpha mating factor prepro sequence. *J Biotechnol.*, v. 20, p. 94-100, 2013.
- EMBERSON, L. M., TRIVETT, A. J., BLOWER, P. J., & NICHOLLS, P. J. Expression of an anti-CD33 single-chain antibody by *Pichia pastoris*. *J Immuno. Methods.*, v. 305, p. 135-51, 2005.
- ERIKSEN, M., LEBRETON, L. C., CARSON, H. S., THIEL, M., MOORE, C. J., BORERRO, J. C., REISSER, J. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS One*, v. 9, p. 1-15, 2014.
- EUROPEAN BIOPLASTICS. (2019) Bioplastics Facts and Figures. Available online: https://docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP_Facts_and_figures.pdf (acessado em abril de 2022).
- FETT, W. F., WIJEY, C., MOREAU, R. A., & OSMAN, S. F. Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Letters in applied microbiology*, v. 31, p. 25-29, 2000.
- FETT, W. F., GÉRARD, H. C., MOREAU, R. A., OSMAN, S. F., & JONES, L. E. Cutinase production by *Streptomyces spp.* *Current microbiology*, v. 25, p. 165-171, 1992.
- FILICIOTTO, L., & ROTHENBERG, G. Biodegradable plastics: Standards, policies, and impacts. *ChemSusChem*, v. 14, p. 56-72, 2021.
- FUKUZAKI, H., YOSHIDA, M., ASANO, M., & KUMAKURA, M. Synthesis of copoly (D, L-lactic acid) with relative low molecular weight and in vitro degradation. *Eur Polym J*, v. 25, p. 1019-1026, 1989.

- GALDINO, A. S., SILVA, R. N., LOTTERMANN, M. T., ALVARES, A. C. M., MORAES, L. M. P. D., TORRES, F. A. G., ULHOA, C. J. Biochemical and Structural Characterization of Amy1: An Alpha-Amylase from *Cryptococcus flavus* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1-7, 2011
- GALDINO, A. S. Clonagem e expressão de uma alfa-amilase de *Cryptococcus flavus* e sua aplicação na degradação do amido. 2008. Tese (doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Molecular) Universidade de Brasília - Instituto de ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Brasília, 2008.
- GAO, M., ZHENG, Z., WU, J., DONG, S., LI, Z., JIN, H., ZHAN, X., & LIN, C. Improvement of specific growth rate of *Pichia pastoris* for effective porcine interferon-alpha production with an on-line model-based glycerol feeding strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, p. 1437–1445, 2012.
- GARCÍA-DEPRAECT, O., BORDEL, S., LEBRERO, R., SANTOS-BENEIT, F., BÖRNER, R. A., BÖRNER, T., & MUÑOZ, R. Inspired by nature: Microbial production, degradation and valorization of biodegradable bioplastics for life-cycle-engineered products. *Biotechnology Advances*, v. 53, p. 107772, 2021.
- GARCÍA, E. B., PEÑA-MONTES, C., CASTRO-RODRÍGUEZ, J. A., GONZÁLEZ-CANTO, A., NAVARRO-OCAÑA, A., & FARRÉS, A. ANCUT2, a thermo-alkaline cutinase from *Aspergillus nidulans* and its potential applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 182, p. 1014-1036, 2017.
- GASPERI, J., WRIGHT, S. L., DRIS, R., COLLARD, F., MANDIN, C., GUERROUACHE, M., TASSIN, B. Microplastics in air: are we breathing it in?. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, v. 1, p. 1-5, 2018.
- GIOIA, C., GIACOBAZZI, G., VANNINI, M., TOTARO, G., SISTI, L., COLONNA, M., CELLI, A. End of Life of Biodegradable Plastics: Composting versus Re/Upycling. *ChemSusChem*, v. 14, p. 4167-4175, 2021.
- GODOI, R. R.. Influência de fontes de carbono, nitrogênio e óleos na produção de uma lipase extracelular da levedura *Cryptococcus flavus*. 2015. 70f. Monografia (Bacharelado em Bioquímica) - Universidade de São João Del Rei Campus Centro Oeste, Divinópolis.
- GODOI, R. R.. Estratégias para a construção de sistemas de expressão de enzimas industriais em *Aspergillus oryzae* e *Pichia pastoris* e síntese in vitro de uma fitase de *Yersinia intermedia*. 2018. 152f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São João Del Rei Campus Centro Oeste - Dona Lindu, Divinópolis, 2018.
- GONÇALVES, M. C. M. Clonagem e expressão do gene da glicoproteína S1 do Vírus da Bronquite Infecciosa em *Pichia pastoris*. 2009. 79f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.
- GURURAJ, P., KHUSHBU, S., MONISHA, B., SELVAKUMAR, N., CHAKRAVARTHY, M., GAUTAM, P., & NANDHINI DEVI, G. Production, purification and application of Cutinase in enzymatic scouring of cotton fabric isolated from *Acinetobacter baumannii* AU10. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 51, p. 550-561, 2021.
- GUTIERREZ-WING, M.T.; STEVENS, B.E.; THEEGALA, C.S.; IOAN, I. Anaerobic Biodegradation of Polyhydroxybutyrate in Municipal Sewage Sludge. *J. Environ. Eng.*, v. 136, p. 709–718, 2010.
- HAERNVALL, K., ZITZENBACHER, S., WALLIG, K., YAMAMOTO, M., SCHICK, M. B., RIBITSCH, D., GUEBITZ, G. M. Hydrolysis of ionic phthalic acid based polyesters by wastewater microorganisms and their enzymes. *Environ. Sci. Technol.*, v. 51, p. 4596-4605, 2017.
- HAGEN, Jens. Industrial catalysis: a practical approach. John Wiley & Sons, 2015.
- HAIDER, T. P., VÖLKER, C., KRAMM, J., LANDFESTER, K., & WURM, F. R. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Chem. Int. Ed.*, v. 58, p. 1-50, 2019.

- HAMA, S., & KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: an overview of potential feedstocks and process development. *Bioresource technology*, v. 135, p. 386-395, 2013.
- HANG, H., YE, X., GUO, M., CHU, J., ZHUANG, Y., ZHANG, M., & ZHANG, S. A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 44, p. 185-188, 2009.
- HEES, T., ZHONG, F., STÜRZEL, M., & MÜLHAUPT, R.. Tailoring Hydrocarbon Polymers and All-Hydrocarbon Composites for Circular Economy. *Macromol. Rapid Commun.*, v. 40, p. 1-18, 2018.
- HEVENER, K. E., ZHAO, W., BALL, D. M., BABAOGLU, K., QI, J., WHITE, S. W., & LEE, R. E. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. *Journal of chemical information and modeling*, v. 49, p. 444-460, 2009.
- HOSHINO, A.; SAWADA, H.; YOKOTA, M.; TSUJI, M.; FUKUDA, K.; KIMURA, M. Influence of weather conditions and soil properties on degradation of biodegradable plastics in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, v. 47, p. 35–43, 2001.
- HU, QIAOYU; JAYASINGHE-ARACHCHIGE, VINDI M.; PRABHAKAR, RAJEEV. Degradation of a Main Plastic Pollutant Polyethylene Terephthalate by Two Distinct Proteases (Neprilysin and Cutinase-like Enzyme). *Journal of chemical information and modeling*, v. 61, n. 2, p. 764-776, 2021.
- HU, X., THUMARAT, U., ZHANG, X., TANG, M., & KAWAI, F. Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 87, p. 771-779, 2010.
- INAN, M., & MEAGHER, M. M. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, p. 585-589, 2001.
- INVITROGEN, C. (2002). *Pichia* fermentation process guidelines.
- ISLAM, S., APITIUS, L., JAKOB, F., & SCHWANEBERG, U. Targeting microplastic particles in the void of diluted suspensions. *Environ. Int.*, v. 123, p. 428-435, 2019.
- JAEGER, K. E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M., & MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Ver.*, v. 15, p. 29-63, 1994.
- JENDROSSEK, D., & HANDRICK, R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, p. 403-432, 2002.
- JOO, S., CHO, I. J., SEO, H., SON, H. F., SAGONG, H. Y., SHIN, T. J., ... & KIM, K. J. Structural insight into molecular mechanism of poly (ethylene terephthalate) degradation. *Nature communications*, v. 9, p. 1-12, 2018.
- KAMINI, N. R., IEFUJI, H. Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus spp. S-2*. *Process Biochemistry*, v. 37, pp. 405–410, 2001.
- KAMINI, N. R., FUJII, T., KUROSU, T., & IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus sp. S-2*. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 317–324, 2000.
- KARAMANLIOGLU, M.; ROBSON, G.D. The influence of biotic and abiotic factors on the rate of degradation of poly(lactic) acid (PLA) coupons buried in compost and soil. *Polym. degrad. stab.*, v. 98, p. 2063–2071, 2013.
- KASHIWADA, S. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental health perspectives*, v. 114, n. 11, p. 1697-1702, 2006.

- KASUYA, K. I., OHURA, T., MASUDA, K., & DOI, Y. Substrate and binding specificities of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases. *International journal of biological macromolecules*, v. 24, p. 329-336, 1999.
- KAZA, S., YAO, L., BHADA-TATA, P., & VAN WOERDEN, F. (2018) What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. Urban Development; Washington, DC: World Bank. Available at: <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317> (acessado em abril de 2022).
- KAWAI, F., ODA, M., TAMASHIRO, T., WAKU, T., TANAKA, N., YAMAMOTO, M., & TANOKURA, M. A novel Ca^{2+} -activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 98, p. 10053-10064, 2014.
- KIM, D. Y., NAM, J. S., RHEE, Y. H. Characterization of an Extracellular Medium-Chain-Length Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerase from *Pseudomonas alcaligenes* LB19. *Biomacromol.*, v. 3, p. 291-296, 2002.
- KHAN, I., DUTTA, J. R., & GANESAN, R. Lactobacillus sps. lipase mediated poly (ϵ -caprolactone) degradation. *International journal of biological macromolecules*, v. 95, p. 126-131, 2017.
- KHATRI, N. K., GOCKE, D., TRENTMANN, O., NEUBAUER, P., & HOFFMANN, F. Single-chain antibody fragment production in *Pichia pastoris*: Benefits of prolonged pre-induction glycerol feeding. *Biotechnology journal*, v. 6, p. 452-462, 2011.
- KLEEBOER, I., WELZEL, K., VANDENHEUVEL, J., MÜLLER, R. J., & DECKWER, W. D. Characterization of a new extracellular hydrolase from *thermobifida fusca* degrading aliphatic– aromatic copolyesters. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 262-270, 2005.
- KLIEM, S., KREUTZBRUCK, M., & BONTEN, C. Review on the biological degradation of polymers in various environments. *Materials*, v. 13, p. 4586, 2020.
- KODAMA, Y., MASAKI, K., KONDO, H., SUZUKI, M., TSUDA, S., NAGURA, T., IEFUJI, H. Crystal structure and enhanced activity of a cutinase-like enzyme from *Cryptococcus* sp. strain S-2. *Proteins*, v. 77, p. 710-717, 2009.
- KOLD, D., DAUTER, Z., LAUSTSEN, A. K., BRZOSOWSKI, A. M., TURKENBURG, J. P., NIELSEN, A. D., & WIMMER, R. Thermodynamic and structural investigation of the specific SDS binding of *Humicola insolens* cutinase. *Protein Science*, v. 23, p. 1023-1035, 2014.
- KONTKANEN, H., WESTERHOLM-PARVINEN, A., SALOHEIMO, M., BAILEY, M., RÄTTÖ, M., MATTILA, I., & BUCHERT, J. Novel Coprinopsis cinerea polyesterase that hydrolyzes cutin and suberin. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, p. 2148-2157, 2009.
- KOSIOROWSKA, K. E., BINIARZ, P., DOBROWOLSKI, A., LELUK, K., & MIROŃCZUK, A. M. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for poly (ethylene terephthalate) degradation. *Science of the Total Environment*, 154841, 2022.
- KOSCHORRECK, K., LIU, D., KAZENWADEL, C., SCHMID, R. D., & HAUER, B. Heterologous expression, characterization and site-directed mutagenesis of cutinase CUTAB1 from *Alternaria brassicicola*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 87, p. 991-997, 2010.
- KUMAR, G. A., ANJANA, K., HINDUJA, M., SUJITHA, K., & DHARANI, G. Review on plastic wastes in marine environment – Biodegradation and biotechnological solutions. *Marine Pollution Bulletin*, v. 150, p. 1-8, 2020.
- KWON, M. A., KIM, H. S., YANG, T. H., SONG, B. K., & SONG, J. K. High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, v. 68, p. 104-109, 2009.

- LAYCOCK, B., NIKOLIĆ, M., COLWELL, J. M., GAUTHIER, E., HALLEY, P., BOTTLE, S., GEORGE, G. Lifetime prediction of biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.*, v. 71, p. 144–189, 2017.
- LAWSON, D. M.; BRZOZOWSKI, A. M.; DODSON, G. G. Lifting the lid off lipases. *Curr. Biol*, v. 2, p. 473-475, 1992.
- LEONOV, V. D., & TIUNOV, A. V. Interaction of invertebrates and synthetic polymers in soil: a review. *Russian Journal of Ecology*, v. 51, p. 503-517, 2020.
- LI, L., LIU, D., SONG, K., & ZHOU, Y. Performance evaluation of MBR in treating microplastics polyvinylchloride contaminated polluted surface water. *Marine Pollution Bulletin*, v. 150, p. 110724, 2020.
- LI, F., WANG, S., LIU, W., & CHEN, G. Purification and characterization of poly (L-lactic acid)-degrading enzymes from *Amycolatopsis orientalis* ssp. *orientalis*. *FEMS microbiology letters*, v. 282, p. 52-58, 2008.
- LIFE TECHNOLOGIES, 2010. EasySelect TM *Pichia* Expression Kit.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. Vol 3. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2001. v. 3, p. 593.
- LIN, H., MU, X., HUANG, J., JIANG, H., NIU, J., & SHU, Z. Comparative analysis of polyester hydrolysis activity among three lipolytic enzymes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 94, p. 2522-2528, 2019.
- LIN, C., HIRAGA, Y., MASAKI, K., IEFUJI, H., & OHKATA, K. Comparison of the chiral recognition of prochiral substrates in the acetylation reaction by a novel lipase (CSL) from the yeast, *Cryptococcus* spp. S-2 with immobilized PPL. Enzyme-catalyzed desymmetrization and asymmetrization of prochiral 2-substituted 1,3-propanediols by CSL and immobilized PPL. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 38, p. 1–10, 2006.
- LIU, M., ZHANG, T., LONG, L., ZHANG, R., & DING, S. Efficient enzymatic degradation of poly (epsilon-caprolactone) by an engineered bifunctional lipase-cutinase. *Polym. Degrad. Stab.*, v. 160, p. 120-125, 2019.
- LOOSER, V., BRUHLMANN, B., BUMBAK, F., STENGER, C., COSTA, M., CAMATTARI, A., KOVAR, K. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: a review. *BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss Biotechnology Symposium*, v. 33, p. 1177–1193, 2015.
- LOBATO, A. A. O. Produção, estabilização covalente e imobilização de uma alfa galactosidase recombinante e sua aplicação biotecnológica. 2022. 153f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2022
- MAEDA, H., YAMAGATA, Y., ABE, K., HASEGAWA, F., MACHIDA, M., ISHIOKA, R., ... & NAKAJIMA, T. Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 67, p. 778-788, 2005.
- MAITI, I. B., KOLATTUKUDY, P. E., & SHAYKH, M. Purification and characterization of a novel cutinase from nasturtium (*Tropaeolum majus*) pollen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 196, p. 412-423, 1979.
- MANNESSE, MAURICE LM, RUUD C. COX, BART C. KOOPS, HUBERTUS M. VERHEIJ, GERARD H. DE HAAS, MAARTEN R. Egmond, Harry TWM van der Hijden, and Jacob de Vlieg. "Cutinase from *Fusarium solani* pisi hydrolyzing triglyceride analogs. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity." *Biochemistry*, v. 34, p. 6400-6407, 1995.
- MARTINEZ, C., NICOLAS, A., VAN TILBEURGH, H., EGLOFF, M. P., CUDREY, C., VERGER, R., CAMBILLAU, C. Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochemistry*, v. 33, p. 83-89, 1994.

- MARTINEZ, C., DE GEUS, P., LAUWEREYS, M., MATTHYSSENS, G., & CABBILLAU, C. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, v. 356, p 615-618, 1992.
- MARX, H., MECKLENBRÄUKER, A., GASSER, B., SAUER, M., MATTANOVICH, D. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Research*, v. 9, p. 1260–1270, 2009.
- MASAKI, K., KAMINI, N. R., IKEDA, H., & IEFUJI, H. Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. *Appl Environ Microbiol*, v. 71, n. 11, pp. 7548-50, 2005.
- MAZZINI A, POLVERINI E, PARISI M, SORBI RT, FAVILLA R Dissociation and unfolding of bovine odorant binding protein at acidic pH. *J Struct Biol*, v. 159, p 82–91, 2007.
- MCNAUGHT, A. D., WILKINSON, A. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the “Gold Book”), Wiley-Blackwell, Chichester, 1997.
- MELCHOR-MARTÍNEZ, E. M., MACÍAS-GARBETT, R., ALVARADO-RAMÍREZ, L., ARAÚJO, R. G., SOSA-HERNÁNDEZ, J. E., RAMÍREZ-GAMBOA, D., PARRA-SALDÍVAR, R. Towards a Circular Economy of Plastics: An Evaluation of the Systematic Transition to a New Generation of Bioplastics. *Polymers*, v. 14, p. 1203, 2022.
- MELO, E. P., BAPTISTA, R. P., & CABRAL, J. M. Improving cutinase stability in aqueous solution and in reverse micelles by media engineering. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 22, p. 299-306, 2003.
- MERGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C.; WOUTERS, A.; SWINGS, J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, p. 3233–3238, 1993.
- MICAÊLO, NUNO M., AND CLAUDIO M. Soares. "Modeling hydration mechanisms of enzymes in nonpolar and polar organic solvents." *The FEBS journal*, v. 274, p. 2424-2436, 2007.
- MINNING, S., SERRANO, A., FERRER, P., SOLÁ, C., SCHMID, R. D., & VALERO, F. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, v. 86, p. 59-70, 2001.
- MITTAL, M.; MITTAL, D.; AGGARWAL, N.K. Plastic accumulation during COVID-19: Call for another pandemic; bioplastic a step towards this challenge? *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 29, p. 11039–11053, 2022.
- MIYAKAWA, T., MIZUSHIMA, H., OHTSUKA, J., ODA, M., KAWAI, F., & TANOKURA, M. Structural basis for the Ca²⁺-enhanced thermostability and activity of PET-degrading cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 99, p. 4297-4307, 2015.
- MOUCHA, T., LINEK, V., & PROKOPOVA, E. Gas hold-up, mixing time and gas–liquid volumetric mass transfer coefficient of various multiple-impeller configurations: Rushton turbine, pitched blade and techmix impeller and their combinations. *Chemical Engineering Science*, v. 58, p. 1839-1846, 2003.
- MUELLER, R. J. Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochem*, v. 41, p. 2124-2128, 2006.
- MUROI, F.; TACHIBANA, Y.; KOBAYASHI, Y.; SAKURAI, T.; KASUYA, K.-I. Influences of poly(butylene adipate-co-terephthalate) on soil microbiota and plant growth. *Polym. Degrad. Stab.*, v. 129, p. 338–346, 2016.

- NÄÄTSAARI, L., MISTLBERGER, B., RUTH, C., HAJEK, T., HARTNER, F. S., GLIEDER, A. Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PLoS ONE*, v. 7, p. 1-13, 2012
- NEUFELD, L. The New Plastics Economy: Rethinking the Future of Plastics, *Ellen MacArthur Foundation*, Cowes, UK 2016.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. Princípios de Bioquímica de Lehninger-7. Artmed Editora, 2018.
- NIKOLAIVITS, E., KOKKINO, A., KARPUSAS, M., & TOPAKAS, E. Microbial host selection and periplasmic folding in *Escherichia coli* affect the biochemical characteristics of a cutinase from *Fusarium oxysporum*. *Protein Expression and Purification*, v. 127, p. 1-7, 2016.
- NISHIDA, H.; TOKIWA, Y. Distribution of poly(β -hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone)aerobic degrading microorganisms in different environments. *J. Environ. Polym. Degrad.*, v. 1, p. 227–233, 1993.
- NYSSÖLÄ, A. Which properties of cutinases are important for applications? *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 99, p. 49-31, 2015.
- NYSSÖLÄ, A., PIHLAJANIEMI, V., HÄKKINEN, M., KONTKANEN, H., SALOHEIMO, M., & NAKARI-SETÄLÄ, T. Cloning and characterization of a novel acidic cutinase from *Sirococcus conigenus*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 98, p. 3639-3650, 2014.
- NYSSÖLÄ, A., PIHLAJANIEMI, V., JÄRVINEN, R., MIKANDER, S., KONTKANEN, H., KRUUS, K., ... & BUCHERT, J. Screening of microbes for novel acidic cutinases and cloning and expression of an acidic cutinase from *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Enzyme and microbial technology*, v. 52, p. 272-278, 2013.
- ODA, M., NUMOTO, N., BEKKER, G. J., KAMIYA, N., & KAWAI, F. Cutinases from thermophilic bacteria (actinomycetes): from identification to functional and structural characterization. *In Methods in Enzymology*, v. 648, p. 159-185, 2021.
- OECD. Improving Plastics Management: Trends, policy responses, and the role of international co-operation and trade. Environmental Policy Paper No., v. 12, n. 12, p. 20, 2018.
- OH, S. H., PARK, I. K., KIM, J. M., & LEE, J. H. *In vitro* and *in vivo* characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*, v. 28, p. 1664–1671, 2007.
- OSHIMA, T., NAKAYAMA, R., ROY, S. R., & TOKUMOTO, T. Purification of the goldfish membrane progesterin receptor α (mPR α) expressed in yeast *Pichia pastoris*. *Biomed Res.*, v. 35, p. 47-59, 2014.
- PARACHIN, N. S., SIQUEIRA, S., DE FARIA, F. P., TORRES, F. A. G., DE MORAES, L. M. P. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, p. 52-57, 2009.
- PAYNE, JACK; MCKEOWN, PAUL; JONES, MATTHEW D. A circular economy approach to plastic waste. *Polymer Degradation and Stability*, v. 165, p. 170-181, 2019.
- PETERSEN, S. B., FOJAN, P., PETERSEN, E. I., & NEVES-PETERSEN, M. T. The thermal stability of the *Fusarium solani* pisi cutinase as a function of pH. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, v. 1, p. 62–69, 2001
- PHUONG, N. N., ZALOUK-VERGNOUX, A., POIRIER, L., KAMARI, A., CHÂTEL, A., MOUNEYRAC, C., LAGARDE, F. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environmental Pollution*, v. 211, p. 111–123, 2016.

PIVA, L. C. Uso do gene *amdS* (acetamidase) como marca de seleção dominante em *Pichia pastoris*. 2015. 96f. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2015.

PROMPERS, J. J., HILBERS, C. W., GROENEWEGEN, A., SCHAIK, R. C. V., AND PEPERMANS, H. A. "1H, 13C, and 15N resonance assignments of *Fusarium solani pisi* cutinase and preliminary features of the structure in solution." *Protein Science*, v. 6, p. 2375-2384, 1997.

PROMPERS, J. J., GROENEWEGEN, A., HILBERS, C. W., AND PEPERMANS, H. A. "Backbone dynamics of *Fusarium solani pisi* cutinase probed by nuclear magnetic resonance: the lack of interfacial activation revisited." *Biochemistry*, v. 38, p. 5315-5327, 1999a.

PROMPERS, J. J., NOORLOOS, B. V., MANNESSE, M. L., GROENEWEGEN, A., EGMOND, M. R., VERHEIJ, H. M., HILBERS, C. W., AND PEPERMANS, H. A. "NMR studies of *Fusarium solani pisi* cutinase in complex with phosphonate inhibitors." *Biochemistry*, v. 38, p. 5982-5994, 1999b.

PUNEKAR, N. S. Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms. Springer, 2018.

QI, X., YAN, W., CAO, Z., DING, M., & YUAN, Y. Current Advances in the Biodegradation and Bioconversion of Polyethylene Terephthalate. *Microorganisms*, v. 10, p. 39, 2021.

RAMKUMAR, M., BALASUBRAMANI, K., SANTOSH, M., & NAGARAJAN, R. The plastisphere: A morphometric genetic classification of plastic pollutants in the natural environment. Gondwana Research, 2021.

RAMSAY, B. A., SARACOVAN, I., RAMSAY, J. A., MARCHESSAULT, R. H. A Method for the Isolation of Microorganisms Producing Extracellular Long-Side-Chain Poly (13-hydroxyalkanoate) Depolymerase. *J. Environm Polymer Degrad.*, v. 2, p. 1-7, 1994.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 2011, 40, D343– D350, DOI: 10.1093/nar/gkr987

REDDY, S. T., DAHMS, N. M. High-level expression and characterization of a secreted recombinant cation-dependent mannose 6-phosphate receptor in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.*, v. 26, p. 290-300, 2002.

RITTIÉ, L., PERBAL, B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J. Cell Commun. Signal.*, v. 2, p. 25–45, 2008.

RONKVIST, Å. M., XIE, W., LU, W., & GROSS, R. A. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly (ethylene terephthalate). *Macromolecules*, v. 42, p. 5128-5138, 2009.

ROOHI, R., BANO, K., KUDDUS, M., R ZAHEER, M., ZIA, Q., F KHAN, M., GUPTA, A., ALIEV, G. Microbial Enzymatic Degradation of Biodegradable Plastics. *Source: Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 18, p. 429-440, 2017.

ROUSSEL, A., AMARA, S., NYSSÖLÄ, A., MATEOS-DIAZ, E., BLANGY, S., KONTKANEN, H., & CAMBILLAU, C. A cutinase from *Trichoderma reesei* with a lid-covered active site and kinetic properties of true lipases. *Journal of molecular biology*, v. 426, p. 3757-3772, 2014.

SCHAFER, W. The role of cutinase in fungal pathogenicity. *Trends Microbiol.*, v. 1, p. 69-71, 1993.

SCHNEIDERMAN, D. K., HILLMYER, M. A. 50th Anniversary Perspective: There Is a Great Future in Sustainable Polymers. *Macromolecules*, v. 50, p. 3733-3749, 2017.

SCOTT, G. Polymers in modern life. *Polymers and the Environment*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.

- SEBASTIAN, JOSEPH; CHANDRA, A. K.; KOLATTUKUDY, P. E. Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere. *Journal of Bacteriology*, v. 169, n. 1, p. 131-136, 1987.
- SEKHAR, V. C., NAMPOOTHIRI, K. M., MOHAN, A. J., NAIR, N. R., BHASKAR, T., PANDEY, A. Microbial degradation of high impact polystyrene, an e-plastic with decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide *J. Hazard. Mater.*, v. 318, p. 347-354, 2016.
- SEMAN, W. W., BAKAR, S. A., BUKHARI, N. A., GASPAR, S. M., OTHMAN, R., NATHAN, S., & BAKAR, F. A. High level expression of *Glomerella cingulata* cutinase in dense cultures of *Pichia pastoris* grown under fed-batch conditions. *Journal of biotechnology*, v. 184, p. 219-228, 2014.
- SIDDIQUI, N., ASAWA, S., BIRRU, B. PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Mol Biotechnol*, v. 60, p. 506-532, 2018.
- SHAH, A. A., KATO, S., SHINTANI, N., KAMINI, N. R., NAKAJIMA-KAMBE, T. Microbial degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic copolyesters. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 98, p. 3437-3447, 2014.
- SEBASTIAO, M. J., MARTEL, P., BAPTISTA, A., PETERSEN, S. B., CABRAL, J. M. S., & AIRES-BARROS, M. R. Predicting the partition coefficients of a recombinant cutinase in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems. *Biotechnology and bioengineering*, v. 56, p. 248-257, 1997.
- SEMAN, W. W., BAKAR, S. A., BUKHARI, N. A., GASPAR, S. M., OTHMAN, R., NATHAN, S., ... & BAKAR, F. A. High level expression of *Glomerella cingulata* cutinase in dense cultures of *Pichia pastoris* grown under fed-batch conditions. *Journal of biotechnology*, v. 184, p. 219-228, 2014.
- SIMONS, J. W. F., VAN KAMPEN, M. D., UBARRETXENA-BELANDIA, I., COX, R. C., ALVES DOS SANTOS, C. M., EGMOND, M. R., & VERHEIJ, H. M. Identification of a calcium binding site in *Staphylococcus hyicus* lipase: generation of calcium-independent variants. *Biochemistry*, v. 38, p. 2-10, 1999.
- SHAYK, M., KOLATTUKUDY, P. E., & DAVIS, R. Production of a novel extracellular cutinase by the pollen and the chemical composition and ultrastructure of the stigma cuticle of nasturtium (*Tropaeolum majus*). *Plant Physiology*, v. 60, p. 907-915, 1977.
- SHINOZAKI, Y., MORITA, T., CAO, X. H., YOSHIDA, S., KOITABASHI, M., WATANABE, T., & KITAMOTO, H. K. Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: cloning, sequencing, and characterization. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, p. 2951-2959, 2013.
- SOLIDAY, C. L., & KOLATTUKUDY, P. E. Isolation and characterization of a cutinase from *Fusarium roseum culmorum* and its immunological comparison with cutinases from *F. solani pisi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 176, p. 334-343, 1976.
- SONG, J.; KAY, M.; COLES, R. Bioplastics. In Food and Beverage Packaging Technology, 2nd ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2011; p. 295-319.
- SPOHNER, S. C., MÜLLER, H., QUITMANN, H., & CZERMAK, P. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, v. 202, p. 118-134, 2015.
- SREEKRISHNA, K. 2010. *Pichia*, optimization of protein expression. *Encycl. Ind. Biotec. Bioprocess, Biosep. Cell Technol*
- SU, A., SHIRKE, A., BAIK, J., ZOU, Y., & GROSS, R. Immobilized cutinases: Preparation, solvent tolerance and thermal stability. *Enzyme and microbial technology*, v. 116, p. 33-40, 2018.
- SU, LINGQIA; HONG, RUOYU; WU, JING. Enhanced extracellular expression of gene-optimized *Thermobifida fusca* cutinase in *Escherichia coli* by optimization of induction strategy. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 1039-1046, 2015. SULAIMAN, S., YAMATO, S., KANAYA, E., KIM, J. J., KOGA, Y., TAKANO, K.,

- & KANAYA, S. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, p. 1556-1562, 2012.
- SUN, M., CHEN, W., FAN, X., TIAN, C., SUN, L., & XIE, H. Cooperative recyclable magnetic microsubmarines for oil and microplastics removal from water. *Applied Materials Today*, v. 20, p. 100682, 2020.
- SUZUKI, K., NOGUCHI, M. T., SHINOZAKI, Y., KOITABASHI, M., SAMESHIMA-YAMASHITA, Y., YOSHIDA, S., ... & KITAMOTO, H. K. Purification, characterization, and cloning of the gene for a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Paraphoma*-related fungal strain B47-9. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 98, p. 4457-4465, 2014.
- SUZUKI, K., SAKAMOTO, H., SHINOZAKI, Y., TABATA, J., WATANABE, T., MOCHIZUKI, A., ... & KITAMOTO, H. K. Affinity purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from a yeast isolated from the larval midgut of a stag beetle, *Aegus laevis*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, p. 7679-7688, 2013.
- TAN, Y., HENEHAN, G. T., KINSELLA, G. K., & RYAN, B. J. An extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* is a cutinase with plastic degrading activity. *Computational and structural biotechnology journal*, v. 19, p. 869-879, 2021.
- TANIGUCHI, I.; YOSHIDA, S.; HIRAGA, K.; MIYAMOTO, K.; KIMURA, Y.; ODA, K. Biodegradation of PET: Current status and application aspects. *ACS Catal.*, v. 9, p. 4089–4105, 2019.
- TENHAKEN, R., ARNEMANN, M., KÖHLER, G., & BARZ, W. Characterization and cloning of cutinase from *Ascochyta rabiei*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 52, p. 197-208, 1997.
- THIRUNAVUKARASU, K., EDWINOLIVER, N. G., ANBARASAN, S. D., GOWTHAMAN, M. K., IEFUJI, H., KAMINI, N. R. Removal of triglyceride soil from fabrics by a novel lipase from *Cryptococcus sp. S-2*. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 701-706, 2008.
- THUMARAT, U., NAKAMURA, R., KAWABATA, T., SUZUKI, H., & KAWAI, F. Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 95, p. 419-430, 2012.
- TOKIWA, Y., CALABIA, B. P. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Appl. Microb. Biotec.*, v. 72, p. 244–251, 2006.
- TOMITA, K., KURAKI, Y., NAGAI, K. Isolation of thermophiles degrading poly (PLA). *J Biosci Bioeng*, v. 87, p. 752-755, 1999.
- TOURNIER, V.; TOPHAM, C.M.; GILLES, A.; DAVID, B.; FOLGOAS, C.; MOYA-LECLAIR, E.; KAMIONKA, E.; DESROUSSEAU, M.L.; TEXIER, H.; GAVALDA, S. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580, 216–219, 2020.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.
- TSAKONA, M.; RUCEVSKA, I. Baseline report on plastic waste. UNEP https://gridarendalwebsite-live.s3.amazonaws.com/production/documents/s_document/554/original/UNEPCHW-PWPWG, 2020.
- TSUJI, H.; SUZUYOSHI, K. Environmental degradation of biodegradable polyesters 2. Poly(ϵ -caprolactone), poly[(R)-3-hydroxybutyrate], and poly(L-lactide) films in natural dynamic seawater. *Polym. Degrad. Stab.*, v. 75, p. 357–365, 2002.

- URBANEK, A. K., MIROŃCZUK, A. M., GARCÍA-MARTÍN, A., SABORIDO, A., DE LA MATA, I., & ARROYO, M. Biochemical properties and biotechnological applications of microbial enzymes involved in the degradation of polyester-type plastics. *BBA - Proteins and Proteomic*, v. 1868, p. 1-13, 2020.
- VALERO, F. 2013. Bioprocess Engineering of *Pichia pastoris*, an Exciting Host Eukaryotic Cell Express Syst, in: INTECH. p. 3–32.
- VÁZQUEZ-ALCÁNTARA, L., OLIART-ROS, R. M., GARCÍA-BÓRQUEZ, A., & PEÑA-MONTES, C. Expression of a Cutinase of *Moniliophthora roreri* with Polyester and PET-plastic residues degradation activity. *Microbiology Spectrum*, v. 9, p. 976-21, 2021.
- VEERASINGAM, S., RANJANI, M., VENKATACHALAPATHY, R., BAGAEV, A., MUKHANOV, V., LITVINYUK, D., VETHAMONY, P. Microplastics in different environmental compartments in India: Analytical methods, distribution, associated contaminants and research needs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 133, 116071, 2020.
- VERT, M., DOI, Y., HELLWICH, K. H., HESS, M., HODGE, P., KUBISA, P., SCHUÉ, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, v. 84, p. 377–410, 2012.
- VON MOOS, N., BURKHARDT-HOLM, P., KOHLER, A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ. Sci. Technol.*, v. 46, p. 11327-11335, 2012.
- WANDERLEY, M. S., OLIVEIRA, C., BRUNESKA, D., DOMINGUES, L., LIMA FILHO, J. L., TEIXEIRA, J. A., MUSSATTO, S. I. Influence of trace elements supplementation on the production of recombinant frutalin by *Pichia pastoris* KM71H in fed-batch process. *Chem. Pap.* 67, 682–687, 2013.
- WANDERLEY, K. J., TORRES, F. A., MORAES, L. M., ULHOA, C. J. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *EMS Microbiology Letters*, v. 231, p. 165-169, 2004.
- WANG, X., LU, D., JÖNSSON, L. J., & HONG, F. Preparation of a PET-hydrolyzing lipase from *Aspergillus oryzae* by the addition of bis (2-hydroxyethyl) terephthalate to the culture medium and enzymatic modification of PET fabrics. *Engineering in life sciences*, v. 8, n. 3, p. 268-276, 2008.
- WATANABE, T., SUZUKI, K., SHINOZAKI, Y., YARIMIZU, T., YOSHIDA, S., SAMEISHIMA-YAMASHITA, Y., KITAMOTO, H. K. A UV-induced mutant of *Cryptococcus flavus* GB-1 with increased production of a biodegradable plastic-degrading enzyme. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 1718-1724, 2015.
- WCISŁEK, A., SONSECA OLALLA, A., MCCLAIN, A., PIEGAT, A., SOBOLEWSKI, P., PUSKAS, J., & EL FRAY, M. Enzymatic degradation of poly (butylene succinate) copolyesters synthesized with the use of *Candida antarctica* lipase B. *Polymers*, v. 10, p. 688, 2018.
- WEI, R., OESER, T., & ZIMMERMANN, W. Synthetic polyester-hydrolyzing enzymes from thermophilic actinomycetes. *Advances in applied microbiology*, v. 89, p. 267-305, 2014.
- WEI, Y., SWENSON, L., CASTRO, C., DEREWENDA, U., MINOR, W., ARAI, H., DEREWENDA, Z. S. Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution. *Structure*, v. 6, n. 4, p. 511-519, 1998.
- WEIS, R., LUITEN, R., SKRANC, W., SCHWAB, H., WUBBOLTS, M., GLIEDER, A. Reliable high-throughput screening with *Pichia pastoris* by limiting yeast cell death phenomena. *FEMS Yeast Research*, v. 5, 179–189, 2004.
- WEST, N. P., CHOW, F. M., RANDALL, E. J., WU, J., CHEN, J., RIBEIRO, J. M., & BRITTON, W. J. Cutinase-like proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: Characterization of their variable enzymatic functions and active site identification. *The FASEB Journal*, v. 23, p. 1694-1704, 2009.

- WILLIAMS, S.F., PEOPLES, O.P. Biodegradable plastics from plants. *Chemtech*, v. 38, p. 38-44, 1996.
- WON, S. J., YIM, J. H., & KIM, H. K. Functional production, characterization, and immobilization of a cold-adapted cutinase from *Antarctic Rhodococcus sp.* *Protein Expression and Purification*, v. 195, p 106077, 2022.
- XI, X., NI, K., HAO, H., SHANG, Y., ZHAO, B., & QIAN, Z. Secretory expression in *Bacillus subtilis* and biochemical characterization of a highly thermostable polyethylene terephthalate hydrolase from bacterium HR29. *Enzyme and microbial technology*, v. 143, p. 109715, 2021.
- XU, H., YAN, Q., DUAN, X., YANG, S., & JIANG, Z. Characterization of an acidic cold-adapted cutinase from *Thielavia terrestris* and its application in flavor ester synthesis. *Food chemistry*, v. 188, p. 439-445, 2015.
- YAGI, H.; NINOMIYA, F.; FUNABASHI, M.; KUNIOKA, M. Thermophilic anaerobic biodegradation test and analysis of eubacteria involved in anaerobic biodegradation of four specified biodegradable polyesters. *Polym. Degrad. Stab.*, v. 98, p. 1182–1187, 2013.
- YANG, L., LI, K., CUI, S., KANG, Y., AN, L., & LEI, K. Removal of microplastics in municipal sewage from China's largest water reclamation plant. *Water research*, v. 155, p. 175-181, 2019.
- YANG, Z., & ZHANG, Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: a review. *Biotechnology advances*, v. 36, p. 182-195, 2018.
- YANG, S., XU, H., YAN, Q., LIU, Y., ZHOU, P., & JIANG, Z. A low molecular mass cutinase of *Thielavia terrestris* efficiently hydrolyzes poly (esters). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 40, p. 217-226, 2013.
- YOSITA, R.; JARUAYPORN, N.; MONCHAI, T.; PHASAWAT, C.; THANAWADEE, L. Determining Biodegradability of Polylactic Acid under Different Environments. *J. Met. Mater. Miner.*, v. 18, p. 83–87, 2008.
- YOSHIDA, S.; HIRAGA, K.; TAKEHANA, T.; TANIGUCHI, I.; YAMAJI, H.; MAEDA, Y.; TOYOHARA, K.; MIYAMOTO, K.; KIMURA, Y.; ODA, K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351, 1196–1199, 2016.
- YU R , DONG S , ZHU Y , JIN H , GAO M , DUAN Z , ZHENG Z , SHI Z, LI Z , Effective and stable swine interferon-alpha production by fed batch cultivation of *Pichia pastoris* with clustering and multivariate analysis . *Bioprocess Biosystem Eng*, v.33, p. 473 – 483, 2010.
- ZHANG, M. Recent developments of methyl-labeling strategies in *Pichia pastoris* for NMR spectroscopy. *Protein Expression and Purification*, v. 166, p. 1-6, 2020.

7 APENDICE

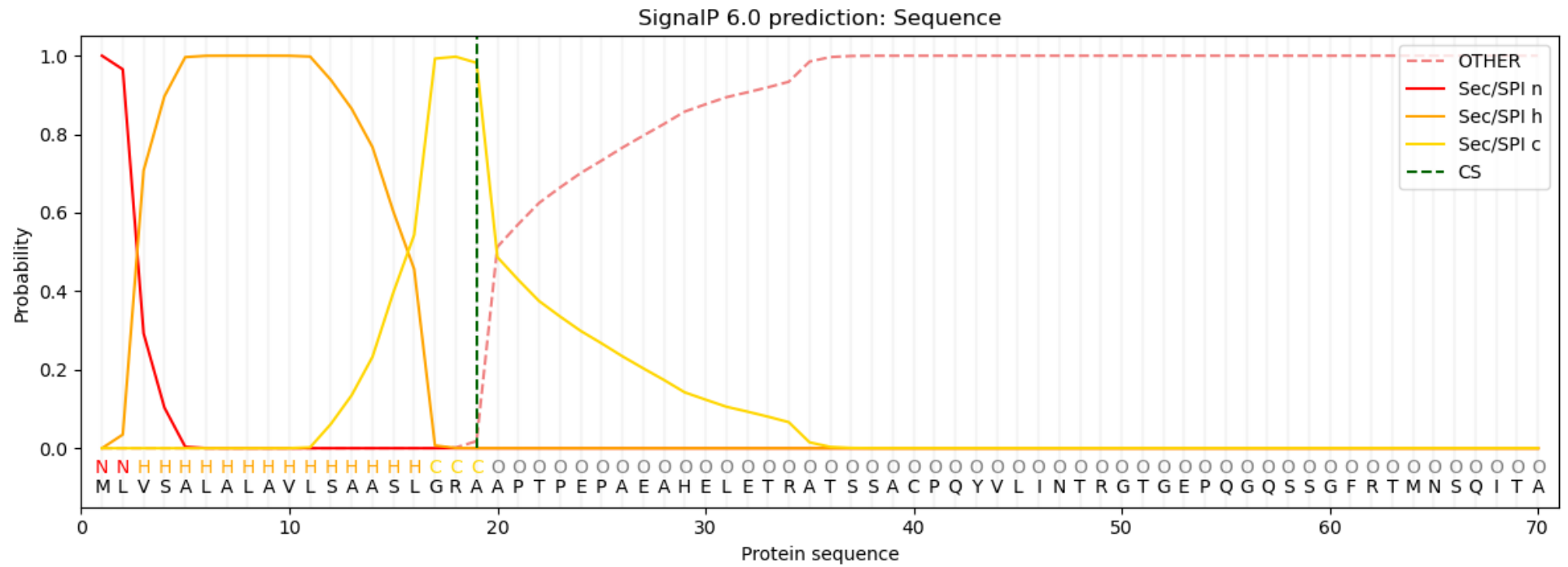


Figura Suplementar 1. Gráfico da análise do peptídeo sinal gerado pela ferramenta Signal IP. Linha verde tracejada indica ponto de corte do peptídeo sinal. Sequência escrita em amarelo e vermelho indicam peptídeo sinal.

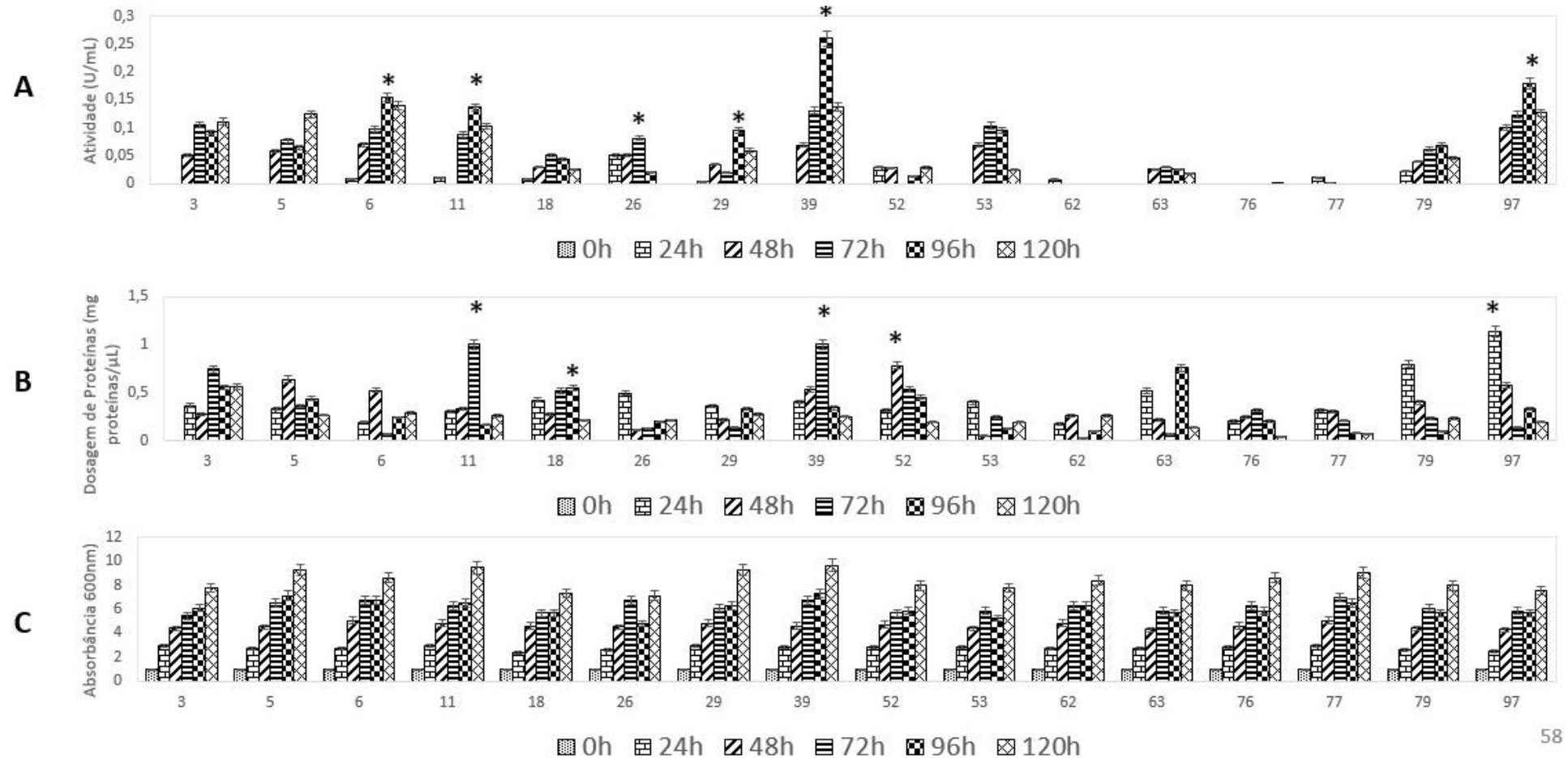


Figura Suplementar 2. Gráficos de atividade, proteínas totais e crescimento dos recombinantes da segunda etapa de seleção crescidos 50mL de meio, induzidos com 0,5% de metanol. (A) Atividade enzimática (μ mol pNP $\cdot$ mL $^{-1}$ $\cdot$ min $^{-1}$) sobre o substrato pNPB dos sobrenadantes de 24-120 horas de cultura dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLER. (B) Quantificação de proteínas totais (μ g $\cdot$ μ L $^{-1}$) dos sobrenadantes de 24-120 horas de cultura dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLER. (C) Densidade ótica a 600nm de 0-120h do cultivo dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLER. Os valores plotados são médias de três repetições dos ensaios de expressão com os respectivos desvios padrão. * representam valores com diferença significativa ($p < 0,05$) comparando os dados por ANOVA.

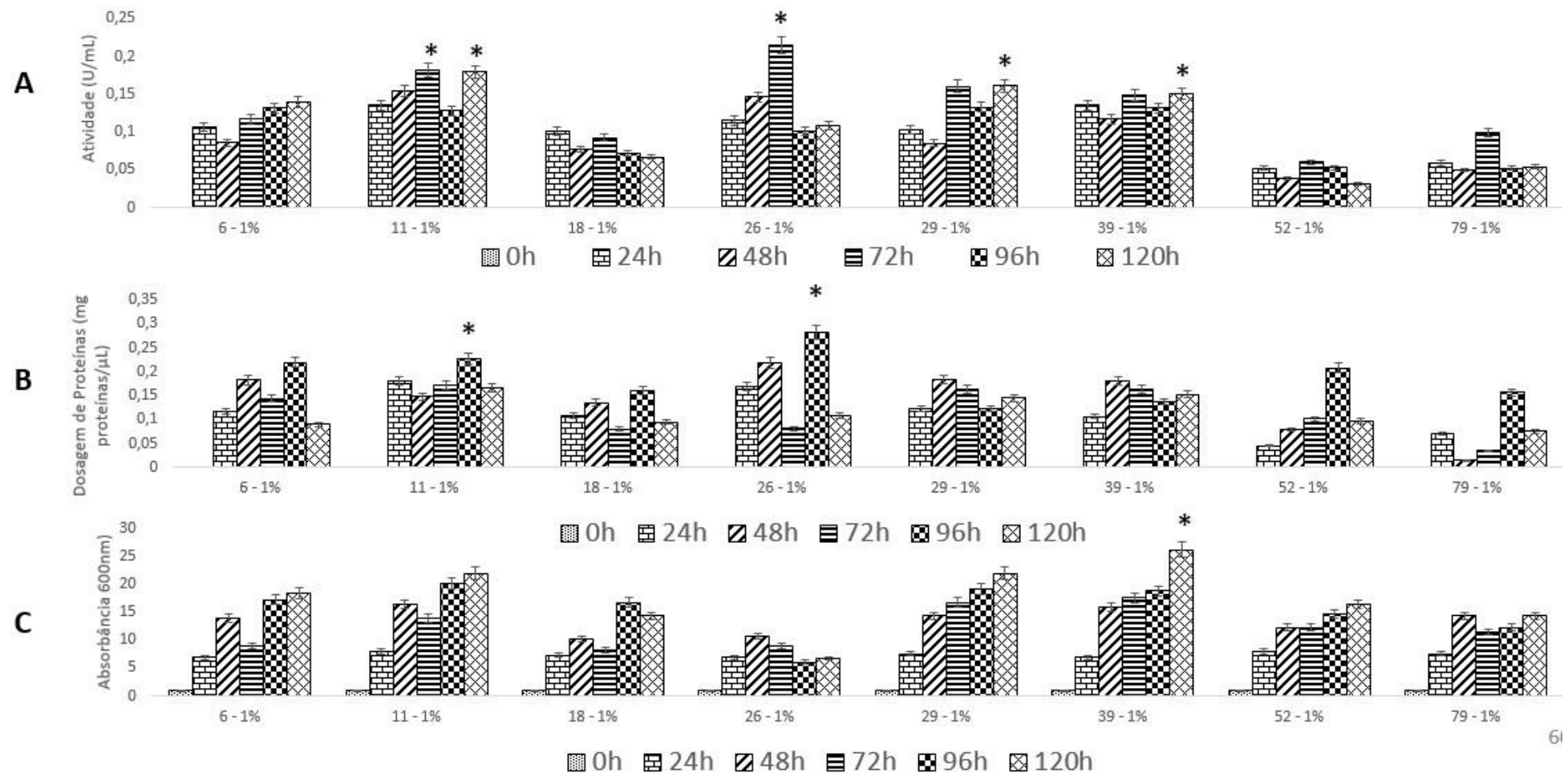


Figura Suplementar 3. Gráficos de atividade, proteínas totais e crescimento dos recombinantes da segunda etapa de seleção crescidos 50mL de meio, induzidos com 1% de metanol. (A) Atividade enzimática ($\mu\text{mol pNP} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) sobre o substrato pNPB dos sobrenadantes de 24-120 horas de cultura dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLer. (B) Quantificação de proteínas totais ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) dos sobrenadantes de 24-120 horas de cultura dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLer. (C) Densidade ótica a 600nm de 0-120h do cultivo dos recombinantes *K. phaffii* para o gene da CfCLer. Os valores plotados são médias de três repetições dos ensaios de expressão com os respectivos desvios padrão. * representam valores com diferença significativa ($p < 0,05$) comparando os dados por ANOVA.

8 ANEXO

8.1 MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGO

1 **Expression and characterization of a novel cutinase from** 2 **Cryptococcus flavus for degradation of biopolymers**

3 Renato R. GODOI ^{a, b, 1}, Alexsandro S. GALDINO ^b, Marina Q.R.B. RODRIGUES ^b, Daniel
4 B. GONÇALVES ^b, Ronaldo A. P. NAGEM ^{a*}

5 ^a*Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade*
6 *Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.*

7 ^b*Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João del-Rei, 35501-296,*
8 *Divinópolis, MG, Brazil.*

9 **Present address**

10 ¹*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biomédicas, Prédio E, Sala 209-A,*
11 *Universidade Federal de Alfenas, Campus Sede, 37130-001, Alfenas, MG, Brazil.*

12

13 **Abstract**

14 Biopolymers are an alternative to the alarming problem of plastic accumulation and
15 environmental pollution. However, decades are required for complete degradation of
16 biopolymers under environmental conditions. Cutinases (EC 3.1.1.74) are capable of
17 catalyzing the hydrolysis of long and branched chain polyester esters, being applied in the
18 hydrolysis of biopolymers. The new extracellular cutinase from *Cryptococcus flavus* I-11
19 (CfCLE) presented an optimal temperature of 30°C and thermo stability up to 50°C, an optimal
20 pH of 8.5 and activity in the pH range 6-11, resistance to various organic solvents such as
21 methanol and ethanol, resistance to surfactants such as Triton and Tweens, increased activity
22 in the presence of divalent ions, greater specificity for 8-carbon esters and 4-carbon
23 triglycerides. Being able to hydrolyze PET films, polycaprolactone (PLC), polylactic acid
24 (PLA) and polyhydroxybutyrate (PHB).

25

26 **Key words:** Cutinase; *Cryptococcus flavus*; *Pichia pastoris*; degradação de biopolímeros

27 **Background**

8.2 SOLICITAÇÃO DE PATENTE E REIVINDICAÇÃO TECNOLÓGICA

1/21

LEVEDURA, PLASMÍDEO E ENZIMA RECOMBINANTES PARA A DEGRADAÇÃO DE BIOPOLÍMERO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DA ENZIMA E USOS

Campo de aplicação

[01] Sistemas heterólogos são uma alternativa para produção de proteínas recombinantes, devido a fornecerem o maquinário adequado para aumentar os níveis de produção de determinada proteína, além de permitirem uma produção mais rápida, com níveis de produções superiores aos sistemas nativos e também fornece segurança biológica ao produto produzido. A presente invenção refere-se à construção de uma linhagem da levedura *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) para a superprodução da enzima cutinase de *Cryptococcus flavus*, a partir de metanol como fonte de carbono. A cutinase é uma enzima de interesse industrial utilizada em vários campos da biotecnologia, como por exemplo, industriais de processamento de biopolímeros voltadas para degradação de bioplásticos, indústrias de combustível, na produção de biodiesel, indústria de limpeza como aditivo de desengordurante, indústria alimentícias na remoção de cutina de sucos e indústria farmacêuticas. A enzima catalisa a degradação de ésteres e triglicerídeos em unidades monoméricas, como fonte de energia para os seres vivos.

Estado da técnica

[02] Polímeros biodegradáveis ou bioplásticos são considerados “polímeros suscetíveis aos ataques microbianos, que se tornam degradáveis em condições ambientais ou de compostagem” (McNaught e Wilkinson, 1997).

[03] A degradação biológica dos biopolímeros é definida pela quantidade de dióxido de carbono (CO₂) liberada durante o processo. Enquanto outros métodos de avaliação são: a medição do aumento da superfície, o crescimento microbiano, a mudança na massa molar, análise de elementos químicos ou uma comparação dos valores das características mecânicas (Kliem *et al.*, 2020).

8.3 PARTICIPAÇÃO EM PROGRAMA DE ACELERAÇÃO DE STARTUP

09/07/22, 22:42



PREFEITURA DE
Divinópolis

Acelera Divinópolis



Inscrição	1.031
Título	RenovZymes- Biorreciclagem de Plásticos
Nome	Renato Ramos Godoi
Cpf	09475462600
Rg	15.557.312
Email	renatoramosgodoi@gmail.com
Sexo	M
Nascimento	25/09/1990
Telefone	+55 31 99321-3310
Cep	35501-653
Endereço	Av. Amazonas, 3031
Bairro	Bela Vista
Cidade	Divinópolis – MG
Área Conhecimento da Graduação	Ciências da Saúde
Situação do Mestrado / Doutorado	Doutorado em andamento
Local da idéia	UFMG
Classificação	Produto/Processo
Justificativa	Atualmente, mais de 350 milhões de ton/ano de plástico são produzidos em todo o mundo, dos quais 76% são descartados de forma incorreta e apenas 14% são reciclado. Gerando consequências ao meio ambiente, devido à má gestão dos resíduos urbanos, aliado a contaminação descontrolado do lixo plástico nos solos/lençóis freáticos, rios e oceanos. Além disso, as características que tornaram os plásticos convenientes, como longevidade, têm provocado problemas devido a lenta degradação deste material no meio ambiente e sua deterioração em partículas tóxicas menores como micro e nano plástico; tornando-se uma preocupação mundial, uma vez que este processo pode levar centenas de anos, causar malefícios à saúde de animais,