



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



EDJANE BASTOS FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL *in silico* E PRODUÇÃO
RECOMBINANTE DE UMA LIGNINA PEROXIDASE DE
*Trametes villosa***

Feira de Santana, BA

Julho, 2025

EDJANE BASTOS FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL *in silico* E PRODUÇÃO
RECOMBINANTE DE UMA LIGNINA PEROXIDASE DE
*Trametes villosa***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Raquel Benevides

Co- Orientadores: Prof^o. Dr^o. Carlos Priminho Pirovani,

Prof^o. Dr^o. Humberto Fonseca de Freitas

Feira de Santana, BA

Julho, 2025

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Ferreira, Edjane Bastos
F44c Caracterização estrutural *in silico* e produção recombinante de uma lignina peroxidase de *Trametes villosa*/ Edjane Bastos Ferreira. – 2025.
102f. : il

Orientadora: Raquel Guimarães Benevides
Coorientadores: Carlos Priminho Pirovani, Humberto Fonseca de Freitas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2025.

1. Lignase. 2. Biocombustível. 3. Atividade enzimática. 4. Dinâmica molecular. 5. Poliporo. 6. E. coli. I. Benevides, Raquel Guimarães, orient. II. Pirovani, Carlos Priminho, coorient. III. Freitas, Humberto Fonseca de, coorient. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. V. Título.

CDU: 582.28

EDJANE BASTOS FERREIRA

**“CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL *IN SILICO* E PRODUÇÃO
RECOMBINANTE DE UMA LIGNINA PEROXIDASE DE *Trametes villosa*”**


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 29 de JULHO de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **RAQUEL GUIMARÃES BENEVIDES**
Data: 30/07/2025 16:16:50-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>


Orientadora: Prof^a. Dr^a. **Raquel Guimarães Benevides**

UFC – Universidade Federal do Ceará

Documento assinado digitalmente
 **ROGERIO MERCES FERREIRA SANTOS**
Data: 15/08/2025 09:18:19-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Rogério Mercês Ferreira Santos**

UEFS - Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **ARIANA SILVA SANTOS**
Data: 18/08/2025 15:43:55-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membra: Prof^a. Dr^a. **Ariana Silva Santos**

UNIVASF – Universidade Federal do Vale do São Francisco

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO SILVA ANDRADE**
Data: 14/08/2025 04:34:50-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Bruno Silva Andrade**

UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Documento assinado digitalmente
 **ANDRÉ LUIS COELHO DA SILVA**
Data: 19/08/2025 07:28:51-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **André Luis Coelho da Silva**

UFC – Universidade Federal do Ceará

Dedico esse trabalho a minha mãe que muito me ensinou, e que hoje olha por mim.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, meu grande guia, que me deu forças para prosseguir e acreditar que seria possível passar por cada etapa.

Agradeço aos meus pais Paulo Roberto e Elza da Cruz (*in memória*) por me apoiarem em todas as minhas decisões.

Ao meu irmão um exemplo para mim, um ser incrível que admiro, muito obrigada Dú por você existir.

Ao meu sobrinho João Pedro que mesmo sem entender o que significa essas etapas da vida, me alegrou quando estava triste, a minha cunhada por cuidar tão bem dele e o fazer um ser tão incrível e amável.

Sou muito grata a Rubens que sempre esteve comigo nos momentos mais difíceis e quando achava que seria impossível fez eu acreditar que conseguiria mesmo com todas as adversidades.

Agradeço a todos os meus cunhados em especial a Gileuza por me ouvir e permitir que eu desabafasse sempre que fosse necessário.

Conquistei muitos colegas e amigos nessa trajetória, e não posso esquecer de todos do CBG da UESC em especial ao professor Priminho meu co-orientador por todo acolhimento, a Monaliza pelas idas cedo e saídas tardes para ajudar e adiantar meu trabalho e Keilane que me ajudou em muitos processos de desenvolvimento da pesquisa.

Não poderia esquecer de ser grata a toda equipe Lapem, em especial a minha orientadora Raquel, por todo apoio e pela orientação, a Cleide por toda amizade que se fez presente em muitos momentos difíceis da minha vida, a Rafa minha eterna IC, que me alegrou com suas “loucuras” e por toda a amizade que construímos, a Gó por ser uma querida ouvinte e conselheira, e a todos que fizeram presente de alguma forma, seja profissional ou pessoal.

Agradeço também ao meu co-orientador Humberto por estar presente e tentar ajustar todos os possíveis erros e por todo apoio dado em cada etapa que se fez presente.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), agradeço por todo apoio

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento.”

Resumo

A lignina peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14) é uma enzima produzida por fungos de decomposição branca, e de grande interesse biotecnológico devido a sua capacidade de degradar lignina e seu potencial uso em aplicações industriais e ambientais, especialmente na produção de biocombustível. Apesar de numerosos estudos com extrato fungico de LiP, a produção ainda enfrenta desafios como baixo rendimento, instabilidade e dificuldade de purificação. Entre as alternativas que pode ser explorada para superar essas limitações é a produção recombinante em *Escherichia coli*. Diante desse cenário o objetivo desse trabalho foi selecionar, caracterizar *in silico* e produzir de forma recombinante, em *E. coli*, uma sequência consenso de lignina peroxidase do genoma do fungo *Trametes villosa*, para aplicação futura na produção de bioetanol. Os resultados obtidos demonstraram que foi possível a seleção de uma sequência consenso de LiP do genoma de *T. villosa* (LiP1820), o modelo gerado a partir da sequência apresentou alta confiabilidade. Nos estudos de dinâmica molecular os dados de RMSD, Δ RMSF e RG apontam maior flexibilidade, melhor conformação e compactação em pH 3, indicando possível facilitador para a entrada do substrato. O rSurf apresentou uma maior superfície de contato em pH 3 o que favorece uma conformação mais ajustada, no entanto quando avaliamos o MM-PBSA e o FEL, observamos que em pH neutro a proteína se apresenta mais estável, indicando que essa alta estabilidade pode estar associada a alta rigidez em pH neutro dificultando o acesso ao substrato o que não é observado em pH ácido. A enzima LiP1820 de *T. villosa* foi expressa em *E. coli* com vetores pET28a e pET32a e cepas BL21 (DE3) pLySs e Rosetta™ (DE3). Apenas a construção pET32a em Rosetta™ (DE3), cultivada em meio TB, resultou em enzima ativa após *refolding*, com atividade máxima em pH e temperatura de 4,0 e 6,0 a 50 °C. Diante desse cenário de obtenção dessa enzima na forma ativa e seu valor biotecnológico, os avanços na produção recombinante abre caminhos para aplicação industrial, tornando sua produção viável e estratégica para o desenvolvimento de tecnologias limpas, sendo este o primeiro relato de produção recombinante de LiP de *T. villosa* em *E. coli*.

Palavras-chave: Lignase, biocombustível, dinâmica molecular, poliporo, *E. coli*, atividade enzimática

Abstract

Lignin peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14) is an enzyme produced by white decay fungi and is of great biotechnological interest due to its ability to degrade lignin and its potential use in industrial and environmental applications, especially in biofuel production. Despite numerous studies with fungal extracts of LiP, production still faces challenges such as low yield, instability, and difficult purification. Alternatives that can be explored to overcome these limitations include recombinant production in *Escherichia coli*. Therefore, the objective of this work was to select, characterize *in silico*, and recombinantly produce, in *E. coli*, a consensus sequence for lignin peroxidase from the genome of the fungus *Trametes villosa*, for future application in bioethanol production. The results demonstrated that it was possible to select a consensus sequence for LiP from the genome of *T. villosa* (LiP1820), and the model generated from the sequence showed high reliability. In molecular dynamics studies, RMSD, Δ RMSF, and GR data indicate greater flexibility, better conformation, and compaction at pH 3, indicating a possible facilitator for substrate entry. rSurf presented a larger contact surface at pH 3, favoring a more adjusted conformation. However, when we evaluated MM-PBSA and FEL, we observed that at neutral pH the protein was more stable, indicating that this high stability may be associated with high rigidity at neutral pH, hindering substrate access, which is not observed at acidic pH. The *T. villosa* LiP1820 enzyme was expressed in *E. coli* with pET28a and pET32a vectors and strains BL21 (DE3), pLySs, and Rosetta™ (DE3). Only the pET32a construct in Rosetta™ (DE3), grown in TB medium, resulted in an active enzyme after *refolding*, with maximum activity at pH 4.0 and 6.0 at 50°C. Given this scenario of obtaining this enzyme in its active form and its biotechnological value, advances in recombinant production pave the way for industrial application, making its production viable and strategic for the development of clean technologies. This is the first report of recombinant production of LiP from *T. villosa* in *E. coli*.

Keywords: Lignase, biofuel, molecular dynamics, polypore, *E. coli*, enzymatic activity

Sumário

1- Introdução geral	12
2.1 Importância dos fungos	15
2.1.1 Fungos degradadores de lignina	15
2.2 <i>Trametes villosa</i>	16
2.3 Enzimas ligninolíticas	17
2.5 Produção recombinante enzimas ligninolíticas em <i>Escherichia coli</i>	21
2.4.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas na expressão de proteínas	22
2.4.2 Expressão de proteínas em plasmídeos pET em <i>Escherichia coli</i>	23
2.6 Modelagem molecular	25
2.7 Dinâmica Molecular	26
2- Objetivo geral	27
3.1 Objetivos específicos	28

CAPÍTULO I Caracterização *in silico* de uma lignina peroxidase de *Trametes villosa*

37

1- Introdução	38
2- Materiais e métodos	40
2.1 Obtenção, identificação e análise da estrutura primária das sequências codificantes	41
2.2 Seleção da sequência	42
2.3 Predição da estrutura tridimensional por modelagem comparativa	43
2.4 Preparação prévia dos modelos e dinâmica molecular	44
2.5 Acoplamento molecular	44
2.8 Parâmetros para ligante	44
2.9 Análise dos resultados da dinâmica molecular	45
2.9.1. Cálculos de MM-PBSA	46
2.9.2. Análise de paisagem de energia livre (Free Energy Landscape - FEL)	47
3 Resultados e discussão	48
3.1 Obtenção, identificação e análise da estrutura primária das sequências codificantes	48
3.2 Escolha da proteína molde	53
3.3 Simulação por Dinâmica	56
Referências	68
Anexo	73

CAPÍTULO II Produção recombinante e caracterização bioquímica de uma lignina peroxidase de *Trametes villosa*

76

1- Introdução	78
2 Materiais e métodos	79

2.1 Síntese do gene sintético de uma lignina peroxidase de <i>Trametes villosa</i>	79
2.2 Preparação de células quimiocompetentes.....	80
2.3 Transformação	80
2.3.1 Transformação do gene pET28a_LiP1820 e pET32a_LiP1820 nas células competentes	80
2.4 Teste de expressão e solubilidade	81
2.4.1 Teste de expressão e solubilidade em pequena escala com meio Luria-Bertani.....	81
2.4.2 Expressão, <i>refold</i> e purificação em grande escala para meio LB.	82
2.4.3 Teste de expressão e solubilidade em pequena escala com meio Terrific both	83
2.4.4 Expressão <i>refold</i> e purificação em grande escala para meio TB.	83
2.4.5 SDS-PAGE.....	84
2.5 Determinação da concentração da proteína por coeficiente de extinção	85
2.6 Cultivo do fungo <i>T. villosa</i> e obtenção do extrato enzimático.....	85
2.7 Dosagem de proteínas por Bradford	85
2.8 Teste de atividade enzimática da lignina peroxidase	86
2.9 Detecção de atividade da rLiP1820 em diferentes ph e temperaturas...	86
3 Resultados e discussão	87
3.1 Seleção das colônias por meio da transformação em cepas de <i>E. coli</i> .	87
3.2 Expressão e purificação da proteína recombinante a partir dos genes pET28a_LiP1820 e pET32a_LiP1820 em meio LB.....	88
3.3 Expressão e purificação da proteína recombinante do gene pET32a_LiP1820 em meio TB	91
3.4 Determinação da atividade ótima da enzima rLiP1820 em diferentes pH e temperatura.....	93
4 Conclusão	97
Referências.....	100

1- Introdução geral

O avanço da globalização trouxe inúmeros desafios, entre eles o aquecimento global e a dependência dos combustíveis fósseis. Nos últimos anos, alternativas voltadas à solução ou mitigação desses problemas têm sido propostas, como o uso de fontes de energia renovável, a exemplo dos biocombustíveis (Khan et al., 2021; Alfalih 2023). Os combustíveis fósseis estão entre as principais fontes de poluição atmosférica e de emissão de gases do efeito estufa (Perera; Nadeau, 2022).

A substituição dos combustíveis fósseis por combustíveis renováveis é vista como uma alternativa positiva não só para a redução dos impactos ambientais como também para as necessidades das futuras gerações (Khan et al., 2021). Para se ter uma ideia em 2023, a produção global de biocombustíveis líquidos ultrapassou 160 bilhões de litros, com destaque para o etanol, que representou 116 bilhões, e o biodiesel, cerca de 50 bilhões, sendo os Estados Unidos e o Brasil os principais produtores mundiais (“Brazilian Energy Balance. Balanço Energético Nacional”, 2024). Esse expressivo volume evidencia o impacto dos biocombustíveis na matriz energética e na redução de emissões (IFP Energies nouvelles, 2024).

Nesse contexto torna-se importante compreender que os biocombustíveis são derivados de biomassa e classificados como combustíveis produzidos a partir de matéria orgânica vegetal ou animal (Khan et al., 2021). Os principais biocombustíveis utilizados são o biodiesel e o bioetanol, empregados principalmente para veículos de transporte, proveniente de alguma cultura vegetal ou de biomassa residual (Salvi; Panwar, 2012; Yousuf, 2012; Vieira et al., 2020).

Dentro desse cenário mundial, o Brasil se destaca pela forte base agrícola que sustenta sua produção de biocombustíveis. No país ela está apoiada principalmente em culturas vegetais, para a produção de biodiesel são utilizados óleos vegetais sendo a soja representando (77%) da matéria prima, seguido de sebo bovino (7,6%) e do óleo de palma (2,2%) (Nascimento et al., 2022; Branco et al., 2025). Por sua vez, no que concerne o etanol, a cana-de-açúcar constitui a principal fonte, embora a produção de etanol a partir do milho venha apresentando crescimento expressivo nos últimos anos,

ampliando a diversidade da matriz bioenergética nacional (Manochio et al., 2017; Colussi et al., 2023)

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil em 2023 produziu 712,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, para a produção principalmente de açúcar e etanol (“Brazilian Energy Balance. Balanço Energético Nacional”, 2024), gerando toneladas de biomassa com alto valor energético que normalmente não são utilizadas pela indústria. Assim essa enorme quantidade de resíduo (biomassa) é queimada ou acumulados em aterros sanitários, podendo gerar grande impacto ambiental (Erdocia et al., 2021; Barciela et al., 2023).

A biomassa é um material rico em lignocelulose, com composição variável e heterogênea, o que faz dela uma fonte de obtenção de compostos químicos e bioquímicos (Bilal et al., 2018). Através do fracionamento polimérico e conversão de celulose, hemicelulose e lignina é possível obter vários produtos comercializáveis, como bioetanol, vanilina, xileno dentre outros (Bilal et al., 2018; Shukla et al., 2023).

A lignina é o terceiro componente da biomassa vegetal e a segunda maior fonte de carbono na terra, do ponto de vista bioquímico é considerada um material altamente recalcitrante (Cesarino et al., 2012; Glasser, 2019). Sua presença está na parte mais externa da parede celular vegetal estando associado a celulose e hemicelulose por meio de ligações covalentes (C-C), éster (R-COOR) e pontes de hidrogênio (Houfani et al., 2020)

Essa complexa rede de interações confere à lignina uma elevada resistência à degradação enzimática, explicada pela sua recalcitrância, configurando-se como um dos maiores empecilhos para a conversão da biomassa em açúcares fermentáveis, limitando o acesso das enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos. Para superar essa barreira existe três métodos de pré-tratamento, os físicos e químicos que geram compostos tóxicos e tem um alto custo e os métodos biológicos que são mais seguros e ecologicamente corretos, fazendo uso de microrganismos, principalmente fungos e bactérias (Shukla et al., 2023).

Microrganismos, principalmente fungos de decomposição branca como o *Trametes villosa*, são produtores de enzimas ligninolíticas, as principais representantes desse grupo são: lacase (EC 1.10.3.2), manganês peroxidase

(EC 1.11.1.13) e lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) (Carneiro et al., 2017). Cada uma dessas enzimas atua por mecanismos oxidativos diferentes na lignina, possibilitando sua fragmentação. As lacases são enzimas multi oxidases de cobre que age em compostos fenólicos (Paraschiv et al., 2022; Aza; Camarero, 2023). A Manganês peroxidase catalisa a oxidação de Mn^{2+} para Mn^{3+} que atua como agente oxidante que ataca a lignina e leva a sua despolarização (Saikia et al., 2023). A lignina peroxidase se destaca por oxidar estruturas aromáticas não fenólicas, altamente recalcitrante, que representa até 90% da lignina (Martínez, 2007; Gałazka; Jankiewicz; Orzechowski, 2025).

A lignina peroxidase é uma enzima contendo heme, com um mecanismo de ação dependente de peróxido de hidrogênio para promover a clivagem das ligações C-C e C-O na lignina (Pham et al., 2021). Sua versatilidade tem despertado interesses na indústria (Singh et al., 2024). Na biodegradação de compostos farmacêuticos como os desreguladores endócrinos, com ação despoluente em águas residuais (Falade et al., 2017). Na indústria Textil de papel e celulose usadas para o biobranqueamento da polpa substituindo os agentes agressivos que contaminam as efluentes (Hamedi; Vaez Fakhri; Mahdavi, 2020). Na biorremediação a lignina peroxidase é capaz de degradar compostos aromáticos tóxicos, fenóis clorados e outros contaminantes (Singh et al., 2024).

Apesar da reconhecida importância das ligninas peroxidases (LiPs) na degradação de lignina e nas aplicações industriais e ambientais, a maioria das enzimas caracterizadas até o momento pertence a espécies fúngicas já amplamente estudadas, como *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*. Pouco se conhece, no que diz respeito a estrutura, estabilidade e viabilidade biotecnológica da lignina peroxidase produzida por *Trametes villosa*, um fungo de decomposição branca promissor encontrado em ambientes tropicais e semiáridos. Além disso, os desafios associados à produção recombinante de LiPs em *E. coli* como a formação de corpos de inclusão, baixa solubilidade e perda de atividade catalítica — limitam o uso dessas enzimas em processos industriais. Diante disso, permanece a lacuna: é possível identificar e caracterizar estruturalmente, por ferramentas

computacionais e experimentais, uma lignina peroxidase de *T. villosa* com estabilidade funcional em pH ácido, e produzi-la de forma ativa em *E. coli* visando aplicações biotecnológicas?

2. Revisão de literatura

2.1 Importância dos fungos

Os fungos ocorrem em vários ambientes terrestres e possuem grande importância já que são os decompositores primários dos ecossistemas, fazendo parte do ciclo do carbono e ciclagem de nutrientes (Fernandez; Kennedy, 2016; Baldoni, 2019). Os fungos podem estar associados a outros organismos auxiliando na sua sobrevivência; ou são patógenos de plantas e animais (Berude et al., 2015; Baldoni, 2019).

Fungos são classificados como seres eucarióticos podendo se apresentar na forma micelial (fungos filamentosos) ou leveduriformes (fungos unicelulares). Os fungos filamentosos possuem grande importância na biotecnologia, pois possuem a capacidade de síntese de vários compostos de grande relevância na indústria de alimentos, na agricultura, na farmacêutica, na medicina, na fabricação de rações e de biocombustíveis (Andersen, 2014; Lange, 2014; Berude et al., 2015; Zarafi; Dauda, 2019; Wikandari; Hasniah; Taherzadeh, 2022;). Esses fungos também possuem mais genes que codificam proteínas do que outros fungos como as leveduras, crescem em uma diversidade de ambientes e são empregados atualmente na produção de enzimas nativas ou recombinantes (Lange, 2014; Wikandari; Hasniah; Taherzadeh, 2022).

O potencial biotecnológico dos fungos filamentosos se deve à produção de enzimas extracelulares secretadas abundantemente, de função primordial para a sobrevivência deles (Chavan; Deshpande, 2013; Troiano; Orsat; Dumont, 2020; Zarafi; Dauda, 2019). Essas enzimas secretadas em maior quantidade pode ser um grande atrativo para a biotecnologia, tendo potencial de degradação de resíduos vegetais ricos em lignina.

2.1.1 Fungos degradadores de lignina

Os fungos filamentosos são reconhecidos como degradadores naturais eficientes da parede celular de plantas (Andlar et al., 2018; Akbar aly et al.,

2025). Esses fungos são os principais degradadores de lignocelulose pois possuem capacidade de degradar madeira, apresentando grande diversidade, sendo a maioria pertencente ao filo Basidiomycota (Andlar et al., 2018). Os fungos que degradam madeira podem ser divididos em três grupos baseados na morfologia de degradação, são eles: fungos de decomposição macia, marrom e branca (Andlar et al., 2018; Li et al., 2022).

Os fungos de degradação macia são na maioria ascomicetos que normalmente degradam polissacarídeos que estão na camada superficial da planta (Andlar et al., 2018). São fungos que degradam a celulose e hemicelulose, mas quase não atacam a lignina, tornando a madeira escurecida e amolecida (Fukasawa, 2021). As enzimas produzidas por esses fungos são inespecíficas e tem função mais limitadas dos que as produzidas pelos fungos de degradação marrom e branca (Andlar et al., 2018).

Os fungos de decomposição marrom são basidiomicetos que degradam rapidamente celulose e hemicelulose, modificando ligeiramente a lignina. Eles não possuem enzimas decompositoras de lignina, exceto espécies reativas de pequenas moléculas para despolimerizar a lignina (Andlar et al., 2018; Fukasawa, 2021). Devido ao acúmulo de lignina na lamela média da parede celular da planta, a madeira podre adquire coloração marrom e apresenta textura em blocos (Fukasawa, 2021).

Entretanto, os fungos de decomposição branca podem secretar enzimas que fazem parte do processo de oxidação de degradação da lignina, como a lignina peroxidase, a manganês peroxidase e a lacase, assim como enzimas hidrolíticas como celulase, hemicelulase e pectinase, sendo responsável pela degradação completa de materiais lignocelulósicos (Kirk; Farrell, 1987; Rodríguez; Durán, 1988; Andlar et al., 2018; Fukasawa, 2021). Alguns fungos de decomposição branca podem deixar a celulose praticamente intacta degradando seletivamente a lignina da parede celular (Blanchette, 1991; Carneiro, 2011), deixando a madeira com aparência esbranquiçada, a exemplo do basidiomiceto *Trametes Villosa*.

2.2 *Trametes villosa*

O fungo *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel é um fungo filamentoso pertencente ao filo Basidiomycota, família Polyporaceae, possui um

basidiocarpo anual e pileado, apresentando no máximo 2 cm de largura e 1,7 mm de comprimento (Carneiro et al., 2017) (Figura1).



Figura 1: *Trametes villosa*. Fonte: Kuo (2005)

Essa espécie de fungo possui característica de colonizar madeira, são fungos de decomposição branca, comumente encontrado na região semiárida do Brasil, sendo um fungo promissor para a produção das 3 enzimas ligninolíticas mais importantes, Manganês peroxidase, Lignina peroxidase e Lacase (Bukh; Lund; Bjerrum, 2006; Silva et al., 2014; Carneiro et al., 2017).

Trametes villosa pode ser encontrado no sudoeste dos Estados Unidos da América, norte da Argentina e ao longo da América do Sul (Carneiro, 2011). É um fungo que ataca primeiramente a lignina, o que a torna um organismo de grande interesse para a biotecnologia, principalmente na decomposição de resíduos ricos em lignina.

2.3 Enzimas ligninolíticas

A degradação da lignina é um processo oxidativo atribuído principalmente ao metabolismo secundário ou por restrição de carbono, oxigênio e enxofre (Andlar et al., 2018; Qi et al., 2022). Os fungos produzem várias enzimas lignocelulíticas que catalisam a oxidação de um conjunto de substratos aromáticos, produzindo radicais aromáticos e mudando a estrutura das matérias primas que possuem lignocelulose e lignina (Andlar et al., 2018). Esse polímero de lignina é composto por três álcoois aromáticos do tipo fenilpropanóides: o p-cumarílico, o coniferílico e o sinapílico. Estes álcoois são os precursores para a formação de três tipos de unidades que são classificadas como, lignina p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S). As unidades aromáticas da lignina são unidas por ligações carbono-carbono C–C (β – β , β -5, 5-5 e β -1) e ligações éter C–O–C (α -O-4, β -O-4, e 4- O-5) que

fortalecem a estrutura da macromolécula (Figura 2) (Wong, 2009). Assim as enzimas geram radicais livres que quebram as ligações das unidades aromáticas, gerando compostos aromáticos menores (Wong, 2009).

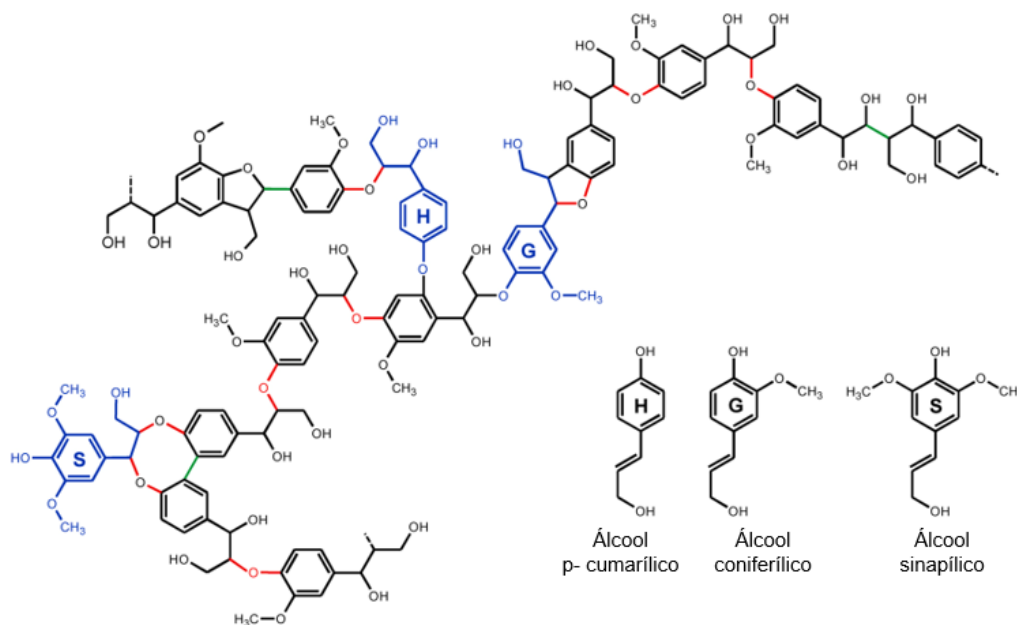


Figura 2: Ilustração esquemática da estrutura da lignina com as suas unidades monoméricas correspondentes p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) indicadas em azul, enquanto as ligações C-O-C e C-C são mostradas em vermelho e verde respectivamente. Embaixo são as estruturas químicas dos álcoois precursores da lignina, p- cumárico, coniférico e sinapílico Fonte: (Biko et al. 2020).

A remoção da lignina é um processo importante que ocorre por enzimas que compõem o complexo ligninolítico dos fungos de decomposição branca, são denominadas de Lacase (Lac), Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP) e Peroxidase Versátil (VP) (Wong, 2009). Dentro desse complexo enzimático destacam-se as Peroxidases de Classe II (MnP, LiP e VP) (Wong, 2009). Todas as peroxidases possuem um grupo heme porfirina- ferro por molécula, esse ferro é oxidado por H₂O₂ a um estado de oxidação maior o que torna a enzima capaz de oxidar a lignina e outros compostos (Wong, 2009).

A LiP possui uma ótima atividade à temperatura ambiente e em pH baixo, próximo a três, e é facilmente superoxidada pelo excesso de H₂O₂ à forma inativa (Wong, 2009).

A MnP tem máxima atividade a pH 4,5 (Wong, 2009). A MnP relaciona-se à LiP pois oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} , este último pode oxidar unidades fenólicas da lignina e, pode estar envolvido na sua fragmentação (Rajaratnam; Shashireka; Bano, 1992).

A lacase pertence ao grupo das oxidoreduases e é produzida por alguns fungos da decomposição branca tais como *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e por bactérias (Dong et al., 2023).

A lacase tem baixa especificidade para com o substrato, por esse motivo ela é utilizada para degradar poluentes orgânicos e transformar compostos recalcitrantes, incluindo compostos farmacêuticos como: antibióticos, clorofenóis e corantes (Dong et al., 2023).

As peroxidases fúngicas possuem resíduos de aminoácidos que estão envolvidos no sítio catalítico do grupo heme: na MnP possui sítios de ligação com o íon Mn^{2+} pelo resíduo de aspartato (Asp175) e glutamato (Glu36 e Glu40); já a LiP apresenta um triptofano localizado na superfície da proteína tendo função importante na catálise (Trp171); a VP apresenta um triptofano catalítico (Trp164) assim como possui os resíduos que estão presentes em MnP e de LiP (Ruiz-Duenas et al., 2008; Biko; Viljoen-Bloom; Van Zyl, 2020). A Figura 3 apresenta a estrutura da VP, MnP e LiP, apresentando tanto o sítio de ligação com uma esfera de Mn^{2+} em VP e MnP, quanto a localização do triptofano em seta vermelha em VP e LiP.

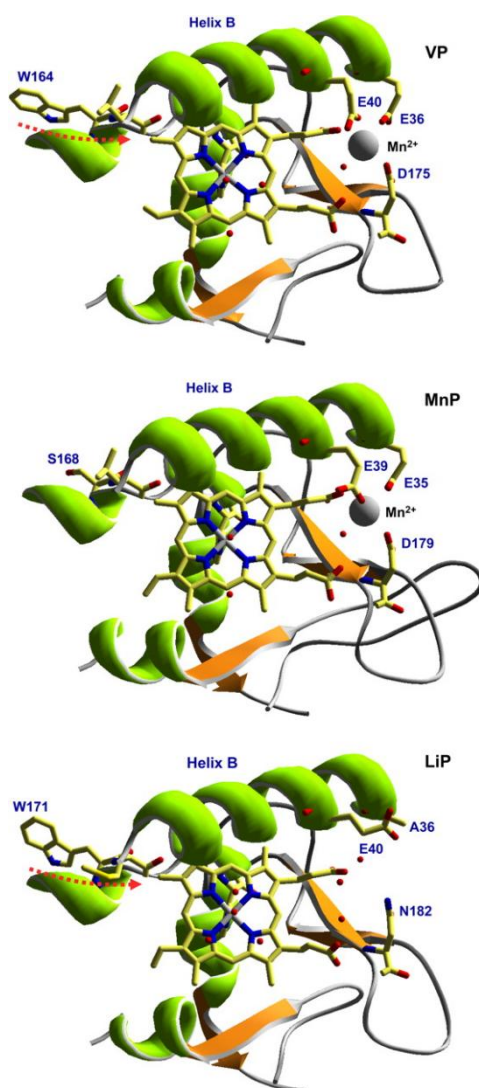


Figura 3: Estrutura das peroxidases de Classe II. Na imagem apresenta a estrutura da VP, MnP e LiP, apresentando tanto o sítio de ligação com uma esfera de Mn^{2+} em VP e MnP, quanto a localização do triptofano em seta vermelha em VP e LiP. Fonte: (Ruiz-Duenas et al., 2008).

As peroxidases tem grande importância na biotecnologia principalmente reduzindo a contaminação dos corantes gerados pela indústria têxtil nas águas residuais, assim como melhorando a digestibilidade da fibra bruta para alimentação animal, já que é um fator limitante no aproveitamento completo do volumoso (silagem ou bagaço-de-cana), melhorando a produção animal. A digestão incompleta dos compostos ligninolíticos reduz a lucratividade, necessitando de um aumento da ingestão para compensar as necessidades do animal (Masran et al., 2016; Yesilada; Birhanli; Geckil, 2018; Adesogan et al., 2019; Giap et al., 2022).

Mesmo reconhecendo-se o potencial biotecnológico das peroxidases, ainda existem grandes desafios para a obtenção dessas enzimas em sua

forma ativa e em quantidades suficientes para aplicações industriais (Conesa; Punt; Van Den Hondel, 2002). Essas dificuldades estão relacionadas a diferentes fatores, entre eles as condições de cultivo, uma vez que parâmetros como a fonte de nitrogênio presente no substrato de crescimento podem influenciar diretamente a degradação da lignina (Rajarithnam; Shashireka; Bano, 1992).

Apesar de todas as dificuldades que norteiam a produção dessas enzimas, os estudos de Moiseenko et al. (2023) observaram a presença de lignina peroxidase no fungo *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, enquanto Asgher et al. (2012) obtiveram uma boa atividade específica do extrato em torno de 553 U/mg em *T. versicolor* IBL-04.

Outro fungo desse grupo, e de grande interesse, é o *T. villosa* Kreisel, citado por alguns autores como uma espécie promissora na despolimerização seletiva de compostos ligninocelulósicos, devido à alta produtividade de lacase (Leite et al., 2003; Yamanaka et al., 2008). Estudos realizados por Carneiro et al. (2017) e Jönsson et al. (1992), comprovaram a síntese de LiP por esse fungo, o que aumenta seu potencial de aplicação industrial e ambiental.

Ferreira et al. (2018) descreveu o genoma do *T. villosa*, do qual possibilitou a análise das sequências codificantes do complexo das enzimas lignolíticas dessa espécie, possibilitando estudos estruturais e de produção recombinante em sistemas de expressão heterólogo para aplicação na degradação de resíduos agroindustriais, podendo ser utilizados em outros setores industriais.

2.5 Produção recombinante enzimas lignolíticas em *Escherichia coli*

A produção recombinante de enzimas lignolíticas em *E. coli*, tem se destacado como uma estratégia promissora para superar os desafios da obtenção dessas enzimas diretamente de fungos ligninolíticos. Fungos de decomposição branca como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Cyathus stercoreus* e *Ceriporiopsis subvermispora* (Novotný et al., 2004; Suryadi et al., 2022), produzem as enzimas LiP, MnP e lacases altamente eficientes na degradação da lignina, contudo sua expressão em sistemas nativos é frequentemente limitada devido

ao baixo rendimento, baixa atividade enzimática e tempo de cultivo prolongado (Biko et al., 2020; Gong et al., 2023).

No entanto nos últimos anos para superar essas desvantagens genes de enzimas lignolíticas de diferentes fontes foram clonados e expressos em hospedeiros heterólogos principalmente *E.coli* (Lin et al., 2018; Wadgaonkar et al., 2022; Li et al., 2024). O hospedeiro bacteriano é amplamente utilizado por apresentar rápido crescimento e baixo custo de cultivo para produção de proteínas recombinantes (Íncir, Kaplan 2024). Estudos demonstram que, apesar de desafios relacionados ao correto enovelamento proteico, formação de corpos de inclusão e necessidade de cofatores específicos, já foi possível obter formas ativas dessas enzimas lignolíticas (Eggenreich et al 2016; Wang et al., 2016; Mital et al., 2021; Li et al., 2024).

A produção em *E.coli* contribui para maior escalabilidade, padronização e viabilidade econômica, além de abrir perspectivas para aplicações em biotecnologia, na produção de biocombustíveis e processos de biorremediação, nos quais a degradação da lignina é um passo crucial.

2.4.1 Cepas de *Escherichia coli* utilizadas na expressão de proteínas

Existem inúmeras cepas de *E.coli* que podem ser utilizadas para aplicação da técnica de transformação, cada cepa tem benefícios inerentes a sua composição, fazendo com que algumas sejam mais eficientes na expressão de proteínas que outras (Mital et al., 2021; Agrawal et al., 2024). Dentre as cepas de *E. coli* comerciais, as mais utilizadas são a BL21 e seus derivados. (Verma; Verma, 2012).

As cepas de BL21 (DE3) possui expressão simples controlada pelo promotor T7 pois ele contém em seu cromossomo o gene da RNA polimerase T7 (Joseph; Pichaimuthu; Srimeenakshi, 2015; Agrawal et al., 2024). Já a BL21 (DE3) pLYsS é composta pelo plasmídeo pLYsS que possui o gene da lisozima T7, ela reduz a expressão de proteínas tóxicas para a célula (Verma; Verma, 2012).

Outra linhagem muito importante é a Rosetta e Rosetta (DE3), que possuem genes que codificam aminoacil-tRNA sintetases para Arg, Ile, Leu, Pro e Gly (são co-expressos) e possuem o plasmídeo pRARE (Verma; Verma, 2012), que possibilita a expressão de códons raros comumente usados em

eucariotos e raramente usados por *E. coli* (Tegel et al., 2010; Riggs, 2018; Agrawal et al., 2024).

2.4.2 Expressão de proteínas em plasmídeos pET em *Escherichia coli*

O uso de plasmídeo é importante para o processo de expressão, eles são moléculas de DNA, geralmente circulares de fita simples, estão presentes em organismos procariontes e possuem a capacidade de replicar e expressar seus genes de forma independente da célula hospedeira (Riggs, 2018; Lloyd, Thomas, 2023).

Os vetores pET são os sistemas de expressão mais utilizados para produção de proteínas recombinantes em *E. coli*, isso se deve ao fato de possuir alta seletividade de RNA polimerase do promotor T7 (Mierendorf et al., 1997; Ramos et al., 2004). A expressão de proteínas utilizando esses vetores plasmidiais tem altos níveis de regulação e quando induzida produz altos níveis de transcritos e de proteínas recombinantes, outro benefício do sistema pET é a capacidade de manter os genes alvo silenciados na transcrição quando não são submetidos a indução com IPTG (Mierendorf et al., 1997).

Esses vetores possuem marcadores de resistência que podem ser Ampicilina ou Canamicina (Mierendorf et al., 1997).

Vários vetores pET possui uma etiqueta de afinidade (HisTag) composta por seis resíduos de histidina consecutivos que permite a purificação da proteína de fusão em colunas carregadas (Mierendorf et al., 1997; Ramos et al., 2004). As séries de pET28 possuem etiquetas de afinidade em ambas as extremidades da proteína que permitem fusões de HisTag nos terminais N e C, que é uma solução para evitar a expressão de proteínas truncadas (Mierendorf et al., 1997).

Em contrapartida, as series de vetores pET32 produzem uma proteína de fusão de tioredoxina que aumenta o rendimento da proteína na fração solúvel, que é um dos facilitares no processo de expressão pois muitas proteínas se apresentam na fração insolúvel (Mierendorf et al., 1997; Young, 2006).

A escolha e definição do melhor vetor para a proteína alvo pode otimizar a produção da enzima de forma recombinante para posterior

aplicação, desde a agricultura, quanto na indústria têxtil, como na degradação dos resíduos agroindustriais.

2.4.3 Produção recombinante de lignina peroxidase em *Escherichia coli*

A primeira lignina peroxidase (LiP) de *Phanerochaete chrysosporium* expressa em sistema heterólogo usou baculovírus recombinantes em célula SF-9, no entanto, essa estratégia foi cara e apresentou pouco rendimento (Johnson et al., 1992).

Nesse contexto a expressão em *E.coli* passou a ser amplamente explorada, uma vez que esse sistema apresenta vantagens bem estabelecidas já definidas anteriormente (2.4). A maioria dos estudos de LiP recombinante usam as cepas BL21 (DE) e BL21 (DE) pLySs com os vetores pEt21 e pET23, esses trabalhos demonstraram que após a clonagem e expressão, as enzimas foram recuperadas em corpos de inclusão, sendo necessários processo de redobrimento, que leva a menores rendimentos (Tabela 1). Até então não foi obtido nenhuma LiP em forma solúvel, o que limita sua recuperação na forma ativa. Entretanto, métodos mais recentes estão sendo aplicadas, como estratégia de redobrimento e protocolos otimizados de purificação, com o objetivo de aumentar a eficiência da recuperação da enzima na forma ativa.

Tabela 1: Lignina Peroxidase (LiP) fúngicas recombinantes produzidas em *E. coli*

Enzima	Vetor	Cepa de <i>E.coli</i>	Organismo de origem	Referência
LipH8	pET21a	BL21(DE3)pLysS	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ambert-Balay et al. (1998)
LipH2	pET21a	BL21(DE3)pLysS	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Nie et al. (1998)
Lip	pET23	BL21(DE3)pLysS	<i>Trametes cervina</i>	Miki et al. (2011)
Lip	pFLAG1-99382	BL21(DE3)pLysS	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Fernández-Fueyo et al. (2012)
Lip	pET21a	BL21(DE3)	<i>Phanerochaete chrysosporium UAMH 3641</i>	Semba et al. (2015)

LipH8	pET23a	BL21(DE3)pLysS	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Romero et al. (2019)
Lip	pET21a	BL21	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Li et al. (2024)

Atualmente o que tem se buscado para minimizar os custos é a produção da enzima de forma solúvel e ativa, testando novas construções, assim como mudanças de temperaturas no processo de indução.

Apesar de não ter sido encontrado na literatura lignina peroxidase na forma solúvel e ativa. Mohorčič et al. (2009) produziu uma peroxidase versátil de *Bjerkandera adusta* na forma solúvel usando uma etiqueta de tiorredoxina do pET32a em cepas de BL21 (DE3) pLysS e em Rosetta. Outro estudo também utilizou vetor pET 32a em cepa de *E.coli* BL21 (DE3) e produziu na forma solúvel uma peroxidase de *Pleurotus eryngii* Bao et al. (2012). Assim a construção em vetores diferentes pode auxiliar na solubilização da proteína.

Para além dos processos de construção da proteína recombinante é necessário analisar a sequência de lignina peroxidase por parâmetros de bioinformática, incluindo estudos de caracterização físico-química e estruturais, para garantir que ela é uma boa candidata a produção heteróloga pela caracterização *in silico* dos parâmetros ótimos de atividade.

2.6 Modelagem molecular

Com os avanços da tecnologia computacional e da bioinformática é possível responder muitas questões biológicas a partir da análise da estrutura tridimensional de proteínas, sem a necessidade de uso de experimentos de alto custo como a cristalografia de raios X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Silva et al., 2021). A bioinformática estrutural aborda as questões biológicas a nível tridimensional, envolvendo técnicas de química computacional ou modelagem molecular (Silva et al., 2021).

A modelagem molecular é uma área dentro da biologia estrutural com o objetivo de prever estruturas 3D de proteínas (Janku 2023). O método se baseia em utilizar uma estrutura de proteína já conhecida com uma alta resolução (molde) para gerar uma outra proteína 3D que ainda não tem

estrutura determinada (alvo), mas que apresenta similaridade com a proteína molde conhecida (Janku 2023).

A modelagem molecular é um método comumente usado e seu limite de predição está ligado ao grau de similaridade entre a sequência alvo e molde, que é de pelo menos 30% de caracteres idênticos no alinhamento global entre as sequências (Verli 2014). Sequências que possuem uma identidade sequencial acima de 50% são consideradas modelos de alta confiabilidade (Bordoli et al. 2009; Shukla et al. 2023).

Para a construção de um modelo é necessário seguir algumas etapas: 1- Seleção da proteína com estrutura 3D conhecida experimentalmente que será usada como molde; 2- Alinhamento global da sequência alvo com a sequência molde; 3- construção do modelo; 4- Validação do modelo obtido, a partir de métricas como o gráfico de Ramachandran, Z-SCORE e Q-MEAN score (Verli 2014; Ferreira 2016).

A modelagem molecular é muito importante para auxiliar nos estudos estruturais de novas proteínas, observando a partir dos parâmetros de qualidade se ela é promissora para prosseguir com estudos de validação através dos processos de variação conformacional por dinâmica molecular, e se apresentar características de qualidade, ser promissora para produção de proteína recombinante.

2.7 Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular (DM) é um procedimento de simulação computacional dos movimentos dos sistemas em relação ao tempo, ou seja, elas não são estáticas, mas se modificam em soluções biológicas (Verli 2014). Esses movimentos analisados são cadeias laterais e interações com diferentes moléculas (enzima e substrato, proteína e proteína, fármaco e receptor) (Verli 2014).

A DM permite obter modelos de moléculas próximos a realidade biológica pois permite incluir características como flexibilidade temporal e temperatura (Yadava 2018). O movimento molecular de cada sistema durante o processo de DM é definido como campo de força do qual utiliza equações matemáticas para descrever o comprimento das ligações e comportamento dos ângulos durante a DM (Verli 2014).

Para analisar o comportamento da estrutura proteica ao longo da simulação, algumas ferramentas são utilizadas como o RMSD (do inglês *root mean square deviation* ou desvio quadrático médio) o RMSF (do inglês *root mean square fluctuation* ou flutuação quadrática média), raio de giro, distância entre átomos ou agrupamento e a evolução do conteúdo da estrutura secundária como função do tempo (Verli 2014).

O RMSD demonstra o quanto a estrutura da proteína de interesse se modifica ao longo de uma simulação, em relação a proteína de referência. Ele é uma medida da distância média entre os átomos de proteínas sobrepostas, sendo possível simular o efeito da temperatura e pH na estabilidade da proteína (Sargsyan et al. 2017). O sistema sai do ponto 0 seguindo para um ponto de equilíbrio quando atinge um patamar, esse patamar vai depender das características da proteína em estudo, no entanto comumente um valor em torno de 3 Å é quando todos os átomos do sistema estão dentro do esperado, valores acima podem indicar perda da estrutura secundária, e valores abaixo indica que o sistema está próximo a proteína de referência (Verli 2014).

O RMSF não apresenta dependência com a estrutura de referência, mas ele descreve a posição dos átomos durante a simulação indicando a flexibilidade do sistema, julgando os principais resíduos de aminoácidos que são afetados quando se muda uma temperatura ou um pH (Passamani 2023). Maiores valores de RMSF indicam presença de alças, já valores baixos indicam hélices α . Outro parâmetro analisado é o raio de giro que descreve a compactação da estrutura da proteína, ou seja, quanto menor o valor, maior a compactação (Verli 2014; Passamani 2023).

Dessa forma é importante avaliar por dinâmica molecular o comportamento da proteína em estudo como forma de entender como ela irá funcionar nos sistemas biológicos podendo simular diferentes condições de pH e temperatura, pois a DM é um sistema mais rápido e barato comparado ao sistema *in vitro*.

2- Objetivo geral

Caracterizar estruturalmente *in silico* e produzir de forma recombinante uma lignina peroxidase de *Trametes villosa* em *Escherichia coli*.

3.1 Objetivos específicos

- Selecionar uma sequência codificante de lignina peroxidase a partir do genoma de *T. villosa*;
- Analisar por modelagem molecular a sequência selecionada;
- Analisar por dinâmica molecular a melhor condição de pH para a atividade da proteína na presença do ligante;
- Expressar e purificar a enzima de forma recombinante em células de *E. coli*;
- Determinar as condições ótimas *in vitro* de pH e temperatura para a atividade da proteína.

Referências

- ADESOGAN, A. T. *et al.* Symposium review: Technologies for improving fiber utilization. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 6, p. 5726–5755, jun. 2019.
- AGRAWAL, Shilpi *et al.* Optimizing Recombinant Cas9 Expression: Insights from *E. coli* BL21(DE3) Strains for Enhanced Protein Purification and Genome Editing. **Biomedicines**, v. 12, n. 6, p. 1226, 31 maio 2024.
- AKBAR ALY, Abdul Basith; SHANMUGARAJ, Balamurugan; RAMALINGAM, Sathishkumar. Industrial applications of Phanerochaete chrysosporium lignin-degrading enzymes: current status, production challenges, and future directions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 5, p. 171, maio 2025.
- ALFALIH, Abdullah Abdulmohsen. The ecological impact assessment of globalization dimensions and human capital: a dynamic approach in the case of selected fossil fuel-rich countries. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 16, p. 47712–47726, 6 fev. 2023.
- AMBERT-BALAY, Katia; FUCHS, Stephen M.; TIEN, Ming. Identification of the Veratryl Alcohol Binding Site in Lignin Peroxidase by Site-Directed Mutagenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, n. 1, p. 283–286, out. 1998.
- ANDERSEN, M. R. Elucidation of primary metabolic pathways in Aspergillus species: Orphaned research in characterizing orphan genes. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 6, p. 451–455, 1 nov. 2014.
- ANDLAR, Martina *et al.* Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 11, p. 768–778, nov. 2018.
- ASGHER, Muhammad; IQBAL, Hafiz Muhammad Nasir; IRSHAD, Muhammad. Characterization of purified and Xerogel immobilized Novel Lignin Peroxidase produced from Trametes versicolor IBL-04 using solid state medium of Corncobs. **BMC Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 46, dez. 2012.
- AZA, Pablo; CAMARERO, Susana. Fungal Laccases: Fundamentals, Engineering and Classification Update. **Biomolecules**, v. 13, n. 12, p. 1716, 28 nov. 2023.
- BALDONI, Daiana Bortoluzzi. **Prospecção de fungos quitinolíticos e produção de quitinases por fermentação em estado sólido**. Tese de Doutorado—[S.l.]: Universidade Federal de Santa Maria, 2019.
- BAO, Xue *et al.* Direct over-expression, characterization and H₂O₂ stability study of active Pleurotus eryngii versatile peroxidase in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 8, p. 1537–1543, ago. 2012.

BARCIELA, Paula *et al.* Utility Aspects of Sugarcane Bagasse as a Feedstock for Bioethanol Production: Leading Role of Steam Explosion as a Pretreatment Technique. **Processes**, v. 11, n. 11, p. 3116, 31 out. 2023.

BERUDE, Marciana Christo *et al.* Micorrizas e sua importância agroecológica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 132, 2015.

BIKO, Odwa D. V.; VILJOEN-BLOOM, Marinda; VAN ZYL, Willem H. Microbial lignin peroxidases: Applications, production challenges and future perspectives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 141, p. 109669, nov. 2020.

BILAL, Muhammad *et al.* Engineering Ligninolytic Consortium for Bioconversion of Lignocelluloses to Ethanol and Chemicals. **Protein & Peptide Letters**, v. 25, n. 2, p. 108–119, 2 maio 2018.

BLANCHETTE, R. A. Delignification by Wood-Decay Fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 381–403, set. 1991.

BORDOLI, Lorenza *et al.* Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 1–13, jan. 2009.

BRANCO, José Eduardo Holler *et al.* Evaluation of the greenhouse gas emissions of the Brazilian biodiesel and the impact of the mandatory blending of the biofuel into commercial diesel fuel. **Chemosphere**, v. 376, p. 144268, maio 2025.

Brazilian Energy Balance. Balanço Energético Nacional. . [S.l.]: Empresa de Pesquisa Energética – EPE, 2024.

BUKH, Christian; LUND, Martin; BJERRUM, Morten J. Kinetic studies on the reaction between *Trametes villosa* laccase and dioxygen. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 9, p. 1547–1557, set. 2006.

CARNEIRO, Rita Terezinha De Oliveira. **PRODUÇÃO DAS ENZIMAS LIGNINA E MANGANÊS PEROXIDASES; ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE DA LIP DE UMA LINHAGEM DE *Trametes villosa* ISOLADA DO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO.** Tese de Doutorado—Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2011.

CARNEIRO, Rita Terezinha De Oliveira *et al.* *Trametes villosa* Lignin Peroxidase (TvLiP): Genetic and Molecular Characterization. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 179–188, 28 jan. 2017.

CESARINO, Igor *et al.* An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. **Brazilian Journal of Botany**, v. 35, n. 4, p. 303–311, 2012.

COLUSSI, Joana *et al.* Brazil emerges as corn-ethanol producer with expansion of second crop corn. **Farmadoc daily**, v. 13, 2023.

CONESA, Ana; PUNT, Peter J.; VAN DEN HONDEL, Cees A. M. J. J. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 143–158, fev. 2002.

DONG, Cheng-Di *et al.* Laccase: A potential biocatalyst for pollutant degradation. **Environmental Pollution**, v. 319, p. 120999, fev. 2023.

EGGENREICH, Britta *et al.* Production strategies for active heme-containing peroxidases from *E. coli* inclusion bodies – a review. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 75–83, jun. 2016.

ERDOCIA, Xabier *et al.* Lignin extraction and isolation methods. *In: Lignin-Based Materials for Biomedical Applications*. [S.l.]: Elsevier, 2021. p. 61–104.

FALADE, Ayodeji O. *et al.* Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 1, p. e00394, fev. 2017.

FERNANDEZ, Christopher W.; KENNEDY, Peter G. Revisiting the ‘Gadgil effect’: do interguild fungal interactions control carbon cycling in forest soils? **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1382–1394, mar. 2016.

FERNÁNDEZ-FUEYO, Elena *et al.* Lignin-degrading Peroxidases from Genome of Selective Ligninolytic Fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 20, p. 16903–16916, maio 2012.

FERREIRA, Dalila Souza Santos *et al.* Draft genome sequence of *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel CCMB561, a tropical white-rot Basidiomycota from the semiarid region of Brazil. **Data in Brief**, v. 18, p. 1581–1587, jun. 2018.

FERREIRA, Francis Barbosa. **Planejamento Baseado na Estrutura da Metaloprotease BpMP-I e Avaliação de Tiossemicarbazonas Ativas contra a Peçonha da Serpente *Bothrops pauloensis***. Tese de Doutorado—Seropédica: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 2016.

FUKASAWA, Yu. Ecological impacts of fungal wood decay types: A review of current knowledge and future research directions. **Ecological Research**, v. 36, n. 6, p. 910–931, nov. 2021.

GAŁĄZKA, Agnieszka; JANKIEWICZ, Urszula; ORZECZOWSKI, Sławomir. The Role of Ligninolytic Enzymes in Sustainable Agriculture: Applications and Challenges. **Agronomy**, v. 15, n. 2, p. 451, 12 fev. 2025.

GIAP, Vu Dinh *et al.* Lignin peroxidase from the white-rot fungus *Lentinus squarrosulus* MPN12 and its application in the biodegradation of synthetic dyes and lignin. **BioResources**, v. 17, n. 3, p. 4480–4498, 9 jun. 2022.

GLASSER, Wolfgang G. About Making Lignin Great Again—Some Lessons From the Past. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 565, 29 ago. 2019.

GONG, Gaowa *et al.* Construction and Identification of a Food-Grade Recombinant *Cyberlindnera jadinii* Strain Expressing Lignin Peroxidase. **Applied Sciences**, v. 13, n. 10, p. 6277, 20 maio 2023.

HAMEDI, J.; VAEZ FAKHRI, A.; MAHDAVI, S. Biobleaching of mechanical paper pulp using *Streptomyces rutgersensis* UTM 2445 isolated from a lignocellulose-rich soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 161–170, jan. 2020.

HOUFANI, Aicha Asma *et al.* Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars— a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 134, p. 105481, mar. 2020.

IFP ENERGIES NOUVELLES. **Biofuels Dashboard 2024**. , 2025. Disponível em: <<https://www.ifpenergiesnouvelles.com/article/biofuels-dashboard-2024>>. Acesso em: 11 set. 2025

İNCİR, İbrahim; KAPLAN, Özlem. *Escherichia coli* as a versatile cell factory: Advances and challenges in recombinant protein production. **Protein Expression and Purification**, v. 219, p. 106463, jul. 2024.

JANKU, Tatiane Aparecida Buzanello. **Expressão heteróloga, purificação, caracterização e estudos de modelagem molecular das proteínas quinases: piridoxal quinase (PdxK) de *Escherichia coli* e quinase dependente de ciclina 10 (CDK10) hum.** Doutorado em Química Orgânica e Biológica—São Carlos: Universidade de São Paulo, 11 ago. 2023.

JOHNSON, Todd M. *et al.* Production and characterization of recombinant lignin peroxidase isozyme H2 from *Phanerochaete chrysosporium* using recombinant baculovirus. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 296, n. 2, p. 660–666, ago. 1992.

JÖNSSON, L.; NYMAN, P. O. Characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Biochimie**, v. 74, n. 2, p. 177–182, fev. 1992.

JOSEPH, Bilgimol C.; PICHAIMUTHU, Suthakaran; SRIMEENAKSHI, Sankaranarayanan. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. **Journal of Cell Science & Therapy**, v. 06, n. 05, 2015.

KHAN, M. Anwar H. *et al.* Investigation of Biofuel as a Potential Renewable Energy Source. **Atmosphere**, v. 12, n. 10, p. 1289, 3 out. 2021.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 465–501, out. 1987.

KUO, Alan; BUSHNELL, Brian; GRIGORIEV, Igor V. Fungal genomics: sequencing and annotation. In: **Advances in Botanical Research**. Academic Press, 2014. p. 1-52.

LANGE, Lene. The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. **IMA Fungus**, v. 5, n. 2, p. 463–471, dez. 2014.

LEITE, Clarice Loguercio *et al.* Wood decay caused by a white-rot, *Trametes vilosa* (Fr.) Kreisel (Basidiomycetes, Fungi), in *Eucalyptus viminalis* Labill and *Myrcia Rostrata* DC. (Myrtaceae). **Biotemas**, v. 16, p. 7–16, 2003.

LI, Shouzhi *et al.* Preparing the pure lignin peroxidase and exploring the effects of chemicals on the activity. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 660–667, 2 maio 2024.

LIN, Meng-I.; NAGATA, Takashi; KATAHIRA, Masato. High yield production of fungal manganese peroxidases by *E. coli* through soluble expression, and examination of the activities. **Protein Expression and Purification**, v. 145, p. 45–52, maio 2018.

LLOYD, Georgina S.; THOMAS, Christopher M. Microbial Primer: The logic of bacterial plasmids: This article is part of our Microbial Primers collection. **Microbiology**, v. 169, n. 7, 3 jul. 2023.

MANOCHIO, C. *et al.* Ethanol from biomass: A comparative overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 743–755, dez. 2017.

MARTÍNEZ, Ángel T. High Redox Potential Peroxidases. *In*: POLAINA, Julio; MACCABE, Andrew P. (Orgs.). **Industrial Enzymes**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 477–488.

MASRAN, Ruqayyah *et al.* Harnessing the potential of ligninolytic enzymes for lignocellulosic biomass pretreatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5231–5246, jun. 2016.

MIERENDORF, Robert C. *et al.* Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *In*: REISCHL, Udo (Ed.). **Molecular Diagnosis of Infectious Diseases**. New Jersey: Humana Press, 1997. v. 13 p. 257–292.

MIKI, Yuta; ICHINOSE, Hirofumi; WARIISHI, Hiroyuki. Determination of a catalytic tyrosine in *Trametes cervina* lignin peroxidase with chemical modification techniques. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 7, p. 1423–1427, jul. 2011.

MITAL, Suraj; CHRISTIE, Graham; DIKICIOGLU, Duygu. Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 208, 30 out. 2021.

MOHORČIČ, Martina *et al.* Expression of soluble versatile peroxidase of *Bjerkandera adusta* in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 851–858, jan. 2009.

MOISEENKO, Konstantin V. *et al.* Exoproteomic Study and Transcriptional Responses of Laccase and Ligninolytic Peroxidase Genes of White-Rot

Fungus *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 Grown in the Presence of Monolignol-Related Phenolic Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 17, p. 13115, 23 ago. 2023.

NASCIMENTO, Tassio Lessa Do *et al.* O biodiesel na matriz energética brasileira: da sua inserção aos dias atuais. **Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, v. 60, n. 2, p. 593, 30 jun. 2023.

NIE, Guojun; READING, N. Scott; AUST, Steven D. Expression of the Lignin Peroxidase H2 Gene from *Phanerochaete chrysosporium* in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, n. 1, p. 146–150, ago. 1998.

NOVOTNÝ, Čeněk *et al.* Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1545–1551, out. 2004.

PARASCHIV, Gigel *et al.* Laccases—Versatile Enzymes Used to Reduce Environmental Pollution. **Energies**, v. 15, n. 5, p. 1835, 2 mar. 2022.

PASSAMANI, Fabiana. **Planejamento por modelagem e dinâmica molecular de filtros solares seguros**. Vitória, ES: Universidade Federal do Espírito Santo, 2023.

PERERA, Frederica; NADEAU, Kari. Climate Change, Fossil-Fuel Pollution, and Children's Health. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 24, p. 2303–2314, 16 jun. 2022.

PHAM, Le Thanh Mai *et al.* Experimental and theoretical insights into the effects of pH on catalysis of bond-cleavage by the lignin peroxidase isozyme H8 from *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 108, dez. 2021.

QI, Jiyun *et al.* Fungi's selectivity in the biodegradation of *Dendrocalamus sinicus* decayed by white and brown rot fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115726, nov. 2022.

RAJARATHNAM, Somasundaram; SHASHIREKA, Mysore Nanjarajurs; BANO, Zakia. Biopotentialities of the Basidiomycetes. *In: Advances in Applied Microbiology*. [S.l.]: Elsevier, 1992. v. 37 p. 233–361.

RAMOS, C. R. R. *et al.* A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, p. 1103–1109, ago. 2004.

RIGGS, Paul D. Overview of Protein Expression Vectors for *E. coli*. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 17, n. 1, p. e23, nov. 2018.

RODRÍGUEZ, j; DURÁN, N. Some new aspects enzymatic lignin biodegradation. **Rev bras pesqui med biol**, p. 411, 1988.

ROMERO, Jefferson O. *et al.* Binding and Catalytic Mechanisms of Veratryl Alcohol Oxidation by Lignin Peroxidase: A Theoretical and Experimental Study. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 1066–1074, 2019.

RUIZ-DUEÑAS, Francisco J. *et al.* Site-Directed Mutagenesis of the Catalytic Tryptophan Environment in *Pleurotus eryngii* Versatile Peroxidase. **Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1685–1695, 1 fev. 2008.

SAIKIA, Shilpa *et al.* Bioremediation mediated by manganese peroxidase – An overview. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 41, n. 3, p. 161–173, 4 maio 2023.

SALVI, B. L.; PANWAR, N. L. Biodiesel resources and production technologies – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 3680–3689, ago. 2012.

SEMBA, Yasuyuki *et al.* Ancestral amino acid substitution improves the thermal stability of recombinant lignin-peroxidase from white-rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium* strain UAMH 3641. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 28, n. 7, p. 221–230, jul. 2015.

SHUKLA, Akanksha *et al.* Strategies of pretreatment of feedstocks for optimized bioethanol production: distinct and integrated approaches. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 16, n. 1, p. 44, 13 mar. 2023.

SILVA, Leticia Xavier; BASTOS, Luana Luiza; SANTOS, Lucianna Helene. Modelagem computacional de proteínas. *In*: MARIANO, Diego *et al.* (Orgs.). **BIOINFO - Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**. 1. ed. [S.l.]: Alfahelix, 2021.

SILVA, Marília Lordêlo Cardoso *et al.* Production of Manganese Peroxidase by *Trametes villosa* on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 05, n. 14, p. 1067–1077, 2014.

SURYADI, Herman *et al.* Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. **Heliyon**, v. 8, n. 2, p. e08865, fev. 2022.

TEGEL, Hanna *et al.* Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3). **Protein Expression and Purification**, v. 69, n. 2, p. 159–167, fev. 2010.

VERLI, Hugo. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1. ed. São Paulo: [S.n.].

VERMA, Mahendra K.; VERMA, Yogendra K. New Generation Expression Host System- Aiming high for commercial production of recombinant protein. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSRJPBS)**, v. 1, p. 9–16, 2012.

VIEIRA, Sabrina *et al.* Sustainability of sugarcane lignocellulosic biomass pretreatment for the production of bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122635, mar. 2020.

WADGAONKAR, Manasee; TALE, Vidya; CHAVAN, Yashwant. Cloning of laccase gene from *Coriolopsis caperata* into heterologous *E.coli* host. **Vegetos**, v. 36, n. 1, p. 195–200, 2 dez. 2022.

WANG, Nan *et al.* Expression of a fungal manganese peroxidase in *Escherichia coli*: a comparison between the soluble and refolded enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 87, dez. 2016.

WIKANDARI, Rachma; HASNIAH, Nurul; TAHERZADEH, Mohammad J. The role of filamentous fungi in advancing the development of a sustainable circular bioeconomy. **Bioresource Technology**, v. 345, p. 126531, fev. 2022.

WONG, Dominic W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174–209, maio 2009.

YADAVA, Umesh. Search algorithms and scoring methods in protein-ligand docking. **Endocrinology&Metabolism International Journal**, v. 6, n. 6, 13 nov. 2018.

YAMANAKA, Renata *et al.* Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* ccb176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 78–84, mar. 2008.

YESILADA, Ozfer; BIRHANLI, Emre; GECKIL, Hikmet. Bioremediation and Decolorization of Textile Dyes by White Rot Fungi and Laccase Enzymes. *In*: PRASAD, Ram (Org.). **Mycoremediation and Environmental Sustainability**. Fungal Biology. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 121–153.

YOUNG, STEPHANIE. Attempts to Amplify EDTA Monooxygenase A for Cloning into the pET-32a Expression Vector. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, p. 41–45, 2006.

YOUSUF, Abu. Biodiesel from lignocellulosic biomass – Prospects and challenges. **Waste Management**, v. 32, n. 11, p. 2061–2067, nov. 2012.

ZARAFI, A. B.; DAUDA, W. P. 2. Exploring the importance of fungi in agricultural biotechnology. **International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**, v. 7, p. 1–12, 2019.

CAPÍTULO I

Caracterização *in silico* de uma lignina peroxidase de *Trametes villosa*

Edjane Bastos Ferreira^{1,2}; Cleidineia Souza de Santana^{1,2}; Samuel Silva Pita^{3,4}; Humberto Fonseca de Freitas^{3,4}; Raquel Guimarães Benevides⁵

¹LAPEM, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil;

²PPGBiotec, programa de Pós graduação em biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil;

³Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular (LaBiMM), Av. Barão de Jeremoabo, 141, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Ondina, CEP: 40170-115, Salvador, Bahia, Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Av. Transnordestina, S/N, Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), CEP: 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

⁵Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, CEP 60.440-900, Fortaleza-CE, Brasil.

Resumo

A lignina peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14), é uma enzima crucial para a degradação de biomassa lignocelulolítica, pois possui capacidade de oxidar estruturas aromáticas não fenólicas, altamente recalcitrante, que representa até 90% da lignina, proporcionando a sua utilização para a obtenção de biocombustíveis. Como essa enzima atua majoritariamente em pH ácido, é necessário compreender a relação do pH na atividade enzimática para a degradação de compostos como a lignina. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi selecionar uma sequência de lignina peroxidase do fungo *Trametes villosa* e analisar por modelagem e dinâmica molecular (DM) o melhor pH de atuação da enzima para aplicação industrial. Nesse estudo foi selecionada uma sequência de lignina peroxidase de *T. villosa*. Em seguida foram realizados estudos de modelagem e dinâmica molecular. O modelo predito apresentou alta confiabilidade. Nos estudos de DM os dados de RMSD, Δ RMSF e RG apontaram maior flexibilidade, melhor conformação e compactação em pH 3, indicando um possível facilitador para a entrada do substrato. O rSurf apresentou uma maior superfície de contato em pH 3 o que favorece uma conformação mais ajustada, no entanto quando avaliamos o MM-PBSA e o FEL, observamos que em pH neutro a proteína se apresenta mais estável. Essa estabilidade conformacional pode estar associada a algum tipo de “funil energético”, resultando em maior rigidez da enzima, que pode limitar o acesso às mudanças conformacionais necessárias para uma catálise eficiente, confirmando que em pH 3 é o mais indicado para essa enzima. Assim essa enzima é uma possível candidata para os estudos *in vitro*, possibilitando a aplicação na degradação de resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: Fungo, enzima lignase, modelagem molecular, dinâmica molecular, estabilidade térmica

Abstract

Lignin peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14) is a crucial enzyme for the degradation of lignocellulolytic biomass because it has the ability to oxidize highly recalcitrant non-phenolic aromatic structures, which represent up to 90% of lignin, allowing its use to obtain biofuels. Since this enzyme acts mainly at acidic pH, it is necessary to understand the relationship of pH in the enzymatic activity for the degradation of compounds such as lignin. Thus, the objective of this work was to select a lignin peroxidase sequence from the fungus *Trametes villosa* and to analyze by modeling and molecular dynamics (MD) the best pH for the enzyme to act for industrial application. In this study, a lignin peroxidase sequence from

T. villosa was selected. Modeling and molecular dynamics studies were then performed. The predicted model showed high reliability. In the MD studies, the RMSD, Δ RMSF and GR data showed greater flexibility, better conformation and compaction at pH 3, indicating a possible facilitator for substrate entry. rSurf showed a larger contact surface at pH 3, which favors a more adjusted conformation. However, when we evaluated MM-PBSA and FEL, we observed that at neutral pH the protein was more stable. This conformational stability may be associated with some type of “energy funnel”, resulting in greater rigidity of the enzyme, which may limit access to the conformational changes necessary for efficient catalysis, confirming that pH 3 is the most suitable for this enzyme. Thus, this enzyme is a possible candidate for in vitro studies, enabling its application in the degradation of agro-industrial waste.

Keywords: Fungus, lignase enzyme, molecular modeling, molecular dynamics, Thermal stability

1- Introdução

A lignina peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14) tem um papel importante na biodegradação da lignina na parede celular vegetal (Piontek; Smith; Blodig, 2001; Vandana et al., 2019). É uma enzima que contém heme com um mecanismo de ação dependente de peróxido de hidrogênio para promover a clivagem das ligações C-C e C-O na lignina (Pham et al., 2021).

A lignina peroxidase se destaca por oxidar estruturas aromáticas não fenólicas, altamente recalcitrante, que representa até 90% da lignina

(Martínez, 2007; Gałązka; Jankiewicz; Orzechowski, 2025).

O ciclo catalítico da Lignina peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14) (Figura 1) é muito parecido com os das outras peroxidases que utilizam o peróxido de hidrogênio como substrato (Falade et al., 2017). No primeiro momento, a LiP é ativada mediante a oxidação de dois elétrons da enzima férrica em repouso (Fe^{3+}) por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para formar o intermediário conhecido como composto I (Fe^{4+}) em que o ferro e porfirina estão em estado oxidado. A segunda etapa, o composto I é reduzido por um substrato (por exemplo: álcool veratrílico (AV)), formando o composto II (forma oxidada com 1 elétron). Na terceira etapa, o composto II recebe um elétron do substrato reduzido, retornando a enzima ao estado de oxidação férrica nativo para concluir o ciclo de oxidação (Wong, 2009; Abdel-Hamid; Solbiati; Cann, 2013; Falade et al., 2017).

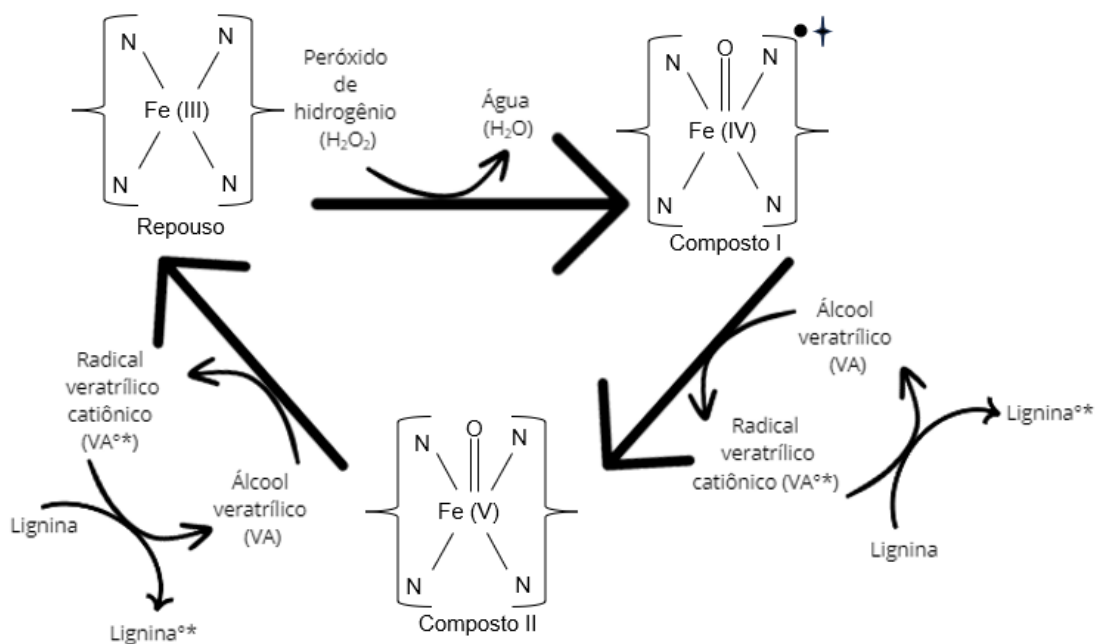


Figura 1: Ciclo catalítico da lignina peroxidase. Primeiro ocorre a ativação da enzima férrica em repouso pelo peróxido de hidrogênio formando o composto I, em seguida o composto I é reduzido pelo álcool veratrílico (VA) (substrato) formando o composto II que é reduzido novamente pelo mesmo substrato (VA) retornando a enzima para seu estado em repouso, nesse processo o radical veratrílico catiônico ($\text{VA}^{\bullet+}$) oxida a lignina atacando as ligações C-C ou C-O-C de unidades não fenólicas. Adaptado de Pollegioni et al., (2015).

Essa enzima possui grande importância industrial, já que ela é utilizada em vários setores como na produção de biocombustíveis, cosméticos, alimentos, biopolpação e biolixiviação (Biko; Viljoen-Bloom; Van Zyl, 2020).

As LiPs geralmente exibem uma atividade oxidativa dependente de pH, com um pH ótimo próximo de 3,0 (Nguyen et al., 2024). No entanto as LiPs das espécies fúngicas *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinus squarrosulus* MPN12 apresentaram atividades ótimas em torno de 4,2 e 5,0, respectivamente (Giap et al., 2022; Li et al., 2022).

Embora as LiPs atuem em meio ácido com base nos dados já disponíveis, não existe descrição do comportamento em relação ao substrato e pH da LiP de *Trametes villosa*, um fungo basidiomiceto que teve o genoma sequenciado e montado o (Ferreira et al. 2018; Tomé et al. 2022) disponível para acesso no Genbank (PUDQ000000000; GCA_002964805.2), isto possibilita a realização de novos estudos, visando caracterizar a LiP de *T. Villosa*.

Dessa forma esse estudo selecionou uma sequência de LiP do genoma do fungo *T. villosa*, objetivando caracterizar sua estrutura através de modelagem por homologia e investigação por dinâmica molecular da estabilidade em condições ácidas (pH = 3), comumente empregada em ensaios cinéticos), e condições fisiológicas (pH = 7), frequente em tampões de testes celulares.

2- Materiais e métodos

Os materiais e métodos das atividades desenvolvidas foram seguindo o fluxograma abaixo (Figura 2).

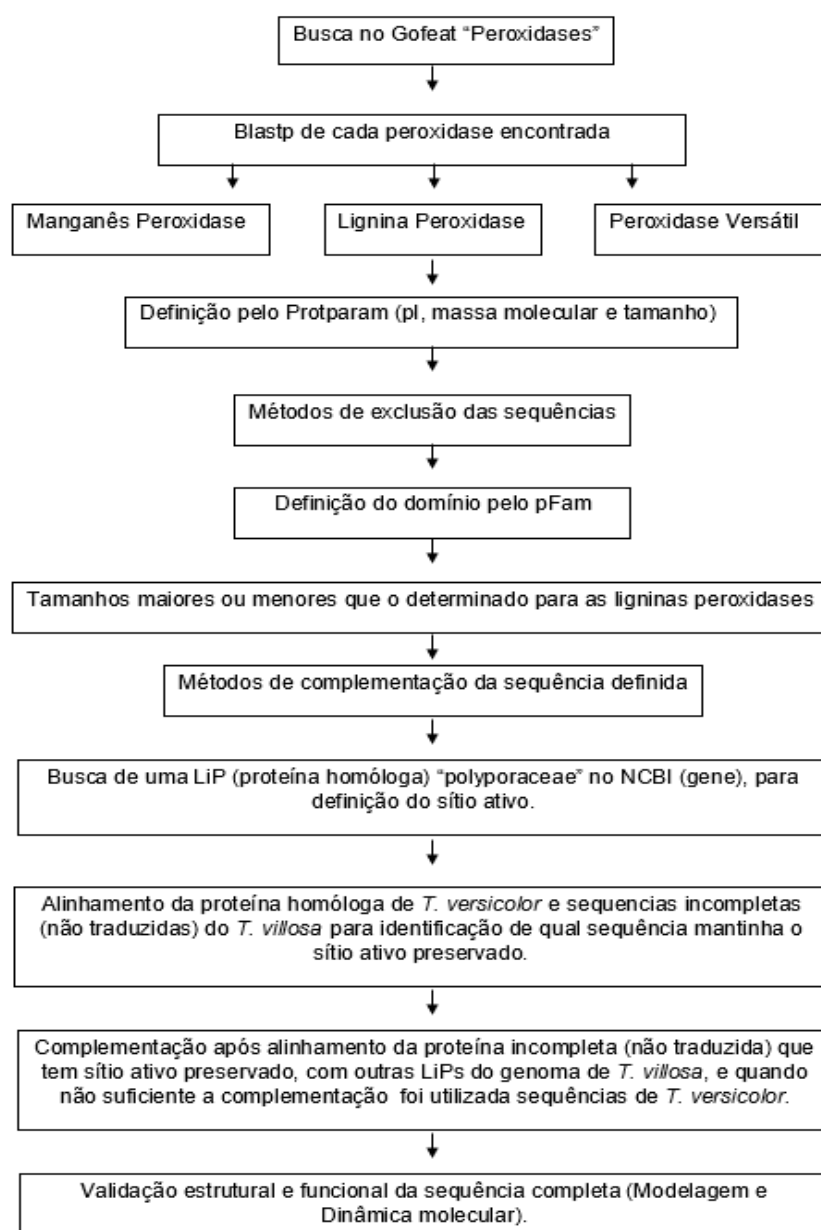


Figura 2: Fluxograma de atividades desenvolvidas para obtenção de 1 sequência de lignina peroxidase de *T. villosa*, onde possibilitou a validação por Modelagem e Dinâmica molecular.

2.1 Obtenção, identificação e análise da estrutura primária das sequências codificantes

As sequências codificantes de Lignina peroxidase (LiP) foram obtidas a partir do genoma do fungo *Trametes villosa* disponibilizado por Ferreira et al. (2018).

As sequências de LiP estavam devidamente depositadas na plataforma de uso restrito GoFeat (Gene Ontology Functional Enrichment Annotation Tool) através do acesso (<https://computationalbiology.ufpa.br/gofeat/index/login>), onde se encontra o

sequenciamento do fungo *T. villosa*. Esse genoma disponibilizado por Ferreira et al. (2018) está disponível para acesso no Genbank (PUDQ000000000).

No primeiro momento, foram realizadas buscas no GoFeat com o termo “Peroxidases”. Em seguida, todos os genes descritos pelo servidor GoFeat foram submetidas ao servidor Bacello (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/pred.htm>) para predição da localização subcelular. As sequências selecionadas da via secretora foram alinhadas no BLASTp para confirmar seu alinhamento com LiP, tendo como parâmetros sequências com mais de 80% de identidade e com E- value mais próximo de 0.

Para definição do sítio ativo e identificação dos resíduos envolvidos na catálise, utilizou-se o Software ProSite (De Castro et al., 2006). Já para estimar o Peso molecular e o pI teórico foi utilizada a ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), em seguida foi confirmado o domínio e a família através do servidor Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) (Finn et al., 2016).

2.2 Seleção da sequência

Como as sequências gênicas de LiP de *Trametes villosa* não estavam completas, usamos a estratégia de buscar uma sequência de lignina peroxidase de um organismo filogeneticamente próximo ao *T. villosa*.

No primeiro momento foi realizada uma busca no NCBI com o termo “lignin peroxidase polyporales” para busca por gene, em seguida selecionou-se uma sequência de isoenzima lignina peroxidase de *Trametes versicolor* (EIW63274.1), essa sequência foi usada como modelo para definição do sítio ativo utilizando o Software ProSite (<https://prosite.expasy.org/>).

Após identificação do sítio ativo dessa enzima foi pesquisado dentro de todas as sequências pré-selecionadas traduzidas do genoma de *T. villosa* as que possuíam o sítio ativo preservado.

A sequência com sítio ativo preservado selecionada estava incompleta, então foi realizado um alinhamento múltiplo com auxílio do programa Clustal Omega de todas as 10 sequencias de LiP de *T. villosa* separadas inicialmente do GoFeat com o termo “peroxidases” e que estivesse sendo secretada.

Esse alinhamento permitiu preencher as informações pontuais

incompletas utilizando como base a sequência do genoma de *T. villosa*, e quando não suficiente foi utilizada a do genoma de *T. versicolor* (EIW63274.1), gerando a sequência definida como LiP1820. A sequência traduzida de lignina peroxidase de *T. versicolor* usada como base para as análises foi definida como LiPTV.

As sequências LiP1820 e LiPTV foram submetidas ao alinhamento múltiplo a partir do programa Clustal Omega, para visualizar as regiões similares entre elas. O peso molecular e o pI teórico da LiP1820, bem como a presença de peptídeo sinal foram previstos através dos servidores ProtParam e SignalP - 6, (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>).

As sequências tiveram suas estruturas tridimensionais previstas por modelagem molecular.

2.3 Predição da estrutura tridimensional por modelagem comparativa

A conformação da proteína derivada da sequência peptídica em estudo (proteína alvo) não se encontra resolvida por experimentos biofísicos. Por isso, foram utilizadas ferramentas que permitissem a geração de um modelo tridimensional da proteína alvo utilizando estruturas resolvidas experimentalmente e de alta resolução (proteína molde) e que apresentassem identidade sequencial superiores a 60% com a sequência da proteína alvo.

A predição da estrutura tridimensional da sequência de LiP1820 foi realizada por modelagem comparativa a partir do método de corpos rígidos implementado no servidor Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Waterhouse et al., 2018).

Após a seleção da melhor proteína-molde para a sequência em estudo, o modelo construído na plataforma SWISSMODEL foi analisado quanto aos parâmetros GMQE e QMEAN, os quais avaliam a qualidade da estrutura. O GMQE (*Global Model Quality Estimation*) e o QMEAN (*Qualitative Model Energy Analysis*) apresentam valores de 0 a 1, onde valores mais próximos de 1 apresentam maior confiabilidade (Biasini et al., 2014).

Em seguida, o modelo foi visualmente analisado com auxílio do programa PyMOL (v 1.3), (Schrödinger, 2009) para identificar erros no processo de modelagem, como nós entre as estruturas secundárias e analisar

a compatibilidade entre a estrutura 3D da proteína molde e o modelo gerado.

A fim de verificar a qualidade estereoquímica do modelo comparativo, por meio da geração do gráfico de Ramachandran, foi usado o servidor PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993) disponível na plataforma online SAVES v 6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) e foi verificado o ambiente dos resíduos de aminoácidos pelo Verify3D (Eisenberg; Lüthy; Bowie, 1997). Ao final, o desvio quadrático médio (*Root Mean Square Deviation* ou RMSD) foi calculado no programa Pymol para estimar a distância entre as cadeias principais dos resíduos (similaridade) entre as proteínas molde e alvo.

2.4 Preparação prévia dos modelos e dinâmica molecular

Após a modelagem, a estrutura da LiP1820 foi submetida ao programa SYBYL 2.1.1 para preparação da adição de hidrogênios e determinação dos estados de protonação dos resíduos ácidos e básicos nos pHs (3,0 e 7,0). Os estados de protonação foram estimados após submissão do modelo ao servidor propka 3.1 (<http://propka.org/>). Por fim, cargas parciais Gasteiger-Huckel foram calculados para a proteína e para grupo heme com ferro pré-ativado (Fe IV) em campo de força Tripos.

2.5 Acoplamento molecular

O estudo de acoplamento molecular foi realizado para determinar a conformação preferencial do álcool veratrílico (AV) no sítio catalítico dos modelos da LiP1820 previamente preparada nas duas condições de pH (3,0 e 7,0). Utilizou-se o módulo Surflex-Dock, implementado no programa Sybyl-X 2.1.1 no qual o espaço de busca ("protomol") foi definido a partir do sítio ativo, centrada no íon de ferro do grupo heme (raio = 10 Å) e gerada com os parâmetros *threshold* = 0,5 e *bloat* = 6,0. O modo geométrico (Geomx), que prioriza a precisão geométrica, foi usado para gerar as conformações com o ligante, que foi mantido flexível, enquanto os resíduos da proteína permaneceram rígidos durante as simulações. A seleção da conformação final para os ensaios de Dinâmica Molecular foi baseada na análise das poses feita com auxílio do programa PyMOL 1.3.

2.8 Parâmetros para ligante

As coordenadas da proteína isolada (branco), proteína contendo o grupo heme (apo) e proteína contendo o grupo heme e o ligante acoplado (holo) foram submetidas ao servidor PRODRG para realização dos cálculos de topologia. Os parâmetros de carga atômica, comprimento de ligação, ângulos torcionais e diedros foram calculados em campo de força GROMOS 54A7.FF.

2.9 Análise dos resultados da dinâmica molecular

Foi utilizado o software GROMACS 2021.3 (Van Der Spoel et al., 2005) para as simulações de DM onde foram empregados os seguintes parâmetros: tempo = 280 ns, P= 1 atm, T= 303 K (~30°C), pH= 3 e 7, campo de força GROMOS-54A7 (Oliveira; Pires; Machuqueiro, 2020), tratamento eletrostático (PME) (Darden; York; Pedersen, 1993) com raio de corte = 1,0 nm para interações não covalentes, condições de contorno periódicas (PBC), taxa de escrita de 2 ps, modelo de água SPC/E (Berendsen; Grigera; Straatsma, 1987; Bryk; Haymet, 2004), caixa de simulação dodecaédrica. Para garantir a isotonicidade do sistema Na⁺ e Cl⁻ foram adicionados ao sistema numa concentração de 40 nM (Turcano et al., 2020).

Após concluídas essas etapas, o sistema foi minimizado (*steepest descent*/ gradiente conjugado) até que as forças fossem menores que 10 kJ/mol nm. Em seguida, foi realizada uma simulação de 1 ns com restrição a posição dos átomos “pesados” (etapa de pré-equilíbrio) no *ensemble* NPT. As simulações foram realizadas de forma independente na forma branco, apo, holo (com ligante - álcool veratrílico). As topologias dos ligantes para as simulações dos complexos foram definidas pelo servidor ATB (*Automated Topology Builder*, <http://compbio.biosci.uq.edu.au/atb/>) (Stroet et al., 2018).

As análises de flutuações médias (RMSF) se deu no módulo *rmsf* do GROMACS 2021-3, assim como as de RMSD e Raio de Giro (RG) (Abraham et al., 2015; Berendsen; Van Der Spoel; Van Drunen, 1995; Van Der Spoel et al., 2005). A análise de ligações hidrogênio, no módulo H-bond (Van Der Spoel et al., 2005) e no programa HbMap2Grace, (<http://lmdm.biof.ufrj.br/software/hbmap2grace/index.html>). A análise da área de superfície molecular foi feita no SurfinMD (<http://lmdm.biof.ufrj.br/software/surfinmd/>).

2.9.1. Cálculos de MM-PBSA

Para estimar a energia livre de ligação (ΔG_{bind}) entre a Lip1820 e o álcool veratrílico (AV), foi empregado o método de Mecânica Molecular/Área de Superfície de Poisson-Boltzmann (MM-PBSA), utilizando a ferramenta *g_mmpbsa* do pacote GROMACS. Esta abordagem, aplicada sobre a trajetória de dinâmica molecular, permite uma avaliação mais robusta da estabilidade termodinâmica do complexo (Kumari et al., 2014). A energia livre de ligação é calculada como a soma da energia potencial média em vácuo ($\Delta E_{\text{binding}}$), que representa a média de dois termos energéticos: a energia potencial no vácuo (ΔE_{MM}) e a energia livre de solvatação ($\Delta G_{\text{solvation}}$), conforme descrito na Equação (1):

$$\Delta E_{\text{binding}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solvation}} \quad (1)$$

O termo de energia da mecânica molecular (ΔE_{MM}) é calculado com base nos componentes de interação eletrostática (ΔE_{elec}) e de van der Waals (ΔE_{vdW}), de acordo com os parâmetros do campo de força da mecânica molecular (Kumari et al., 2014). A energia de solvatação é computada com base na energia de solvatação polar (ΔG_{pol}), usando a equação de Poisson–Boltzmann (PB) (Baker et al., 2001), e na energia de solvatação não polar (ΔG_{nonpol}), estimada a partir da área de superfície acessível ao solvente (SASA), incluindo forças atrativas e repulsivas entre soluto e solvente, geradas pela formação de cavidades e interações de van der Waals (Kumari et al., 2014). Para decompor a energia de ligação, ΔE_{MM} , ΔG_{pol} e ΔG_{nonpol} foram inicialmente calculadas separadamente para cada resíduo e depois somadas para se obter a contribuição de cada resíduo na energia de ligação (Kumari et al., 2014).

Os componentes energéticos E_{MM} , G_{pol} e G_{nonpol} da Lip1820 (apo) e dos complexos Lip1820-AV foram calculados a partir de 500 snapshots extraídos a cada 0,1 ns das trajetórias de produção previamente determinadas. E_{MM} foi calculada usando os potenciais de Lennard-Jones (LJ) e Coulomb. Para calcular G_{pol} , uma caixa foi gerada usando as coordenadas extremas do complexo molecular em cada dimensão. Essa caixa foi então expandida em

cada dimensão em 1,5 vezes para obter uma caixa de grade grosseira ($cfac = 1.5$). Uma caixa de grade mais fina foi então posicionada dentro da caixa grosseira, estendendo-se 5 Å ($fadd = 5$) além das coordenadas extremas do complexo em cada direção. Uma força iônica de 0,150 M de NaCl com raios de 0,95 e 1,81 Å para os íons sódio e cloreto, respectivamente, foi utilizada em todos os cálculos de G_{pol} . Os valores das constantes dielétricas para o vácuo ($vdie$), solvente ($sdie$) e soluto ($pdie$) foram tomados como 1,8 e 2,0, respectivamente. O raio do solvente foi definido como 1,4 Å e a temperatura como 303 K. A equação linear de PB foi resolvida utilizando o programa APBS 3.4.1 (Baker et al., 2001). $G_{nonpolar}$ foi calculada utilizando modelos não polares baseados na área de superfície acessível ao solvente (SASA), com uma tensão superficial ($gamma$) de 0,0226778 KJ/(mol·Å²) e um raio da sonda de 1,4 Å.

2.9.2. Análise de paisagem de energia livre (Free Energy Landscape - FEL)

Para investigar os movimentos coletivos e de larga amplitude da proteína e dos complexos Lip1820-VA (pH 3,0 e 7,0), foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*). A PCA reduz a complexidade dos movimentos atômicos ao diagonalizar a matriz de covariância das posições dos átomos de *backbone*, extraída da porção estabilizada da trajetória (REF). Este procedimento gera um conjunto de autovetores e autovalores, onde cada autovetor (ou componente principal) descreve a direção de um movimento coletivo, e seu autovalor correspondente indica a amplitude desse movimento. Os cálculos foram realizados com os módulos *covar* e *anaeig* do GROMACS.

Subsequentemente, a Paisagem de Energia Livre (FEL, do inglês *Free Energy Landscape*) foi construída para mapear os estados conformacionais dos complexos e as barreiras de energia cada estado. A FEL foi gerada projetando-se a trajetória de DM sobre os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), que representam os movimentos mais significativos do sistema. A energia livre de Gibbs (ΔG) para cada conformação foi calculada a partir da probabilidade de sua ocorrência (P) durante a simulação, utilizando a equação $\Delta G = -kBT \ln(P)$ (Temperatura de 303 K), por meio do módulo *sham*

do GROMACS.

3 Resultados e discussão

3.1 Obtenção, identificação e análise da estrutura primária das sequências codificantes.

Na análise do genoma de *T. villosa* disponibilizado por Ferreira et al., 2018 através da plataforma GoFeat foram identificados 16.711 genes putativos codificadores de proteína na montagem do genoma, que filogenicamente é uma espécie próxima ao *T. versicolor* (Carlson; Justo; Hibbett, 2014). Foram encontradas 45 proteínas dentro do genoma de *T. villosa* empregando o termo “Peroxidase”.

As proteínas selecionadas pela busca pelo termo “peroxidase” foram analisadas pelo programa Bacello, para determinação da localização subcelular, dentre as 45 “peroxidases” previamente identificadas, 23 delas são secretadas, 17 estão no citoplasma, 4 na mitocôndria e 1 no núcleo. O complexo enzimático que degrada a lignina é composto por Lacase (Lac), Lignina peroxidase (LiP), Manganês peroxidase (MnP) e peroxidase versátil (VP), e elas são classificadas como Peroxidases de classe II (PODs). Estas proteínas fazem parte de um grupo de proteínas secretoras que contém um grupo heme prostético e utilizam peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para degradação da lignina (Levasseur et al., 2013; Riley et al., 2014).

Dessa forma as 23 proteínas que são secretadas pelo fungo foram submetidas ao alinhamento através do BLASTp de forma que dez se alinharam com a estrutura primária de lignina peroxidase (Anexo - Tabela 1 e Figura 1), duas com sequência de peroxidase versátil e duas com a sequência de manganês peroxidase. Outras nove sequências não houve alinhamento satisfatório, pois os valores de identidade nem de E-value ficaram dentro dos parâmetros determinados. Segundo o Newell et al (2013) o valor E é um parâmetro que descreve o número de ocorrências que se pode esperar ver por acaso ao pesquisar em um banco de dados de um determinado tamanho. Quanto menor o valor E, mais significativa é a correspondência (Newell et al., 2013).

Na Tabela 1 apresenta as 10 proteínas extracelulares alinhadas com Lignina peroxidase, apenas 2 sequências estavam completamente definidas

(traduzidas) peroxidase 8 e 14, sendo assim possível determinar o peso molecular e o pI (ponto isoelétrico).

Tabela 1: Análise realizada através do servidor ProtParam, para identificação do número de resíduos de aminoácidos das 10 sequências de lignina peroxidase de *T. villosa*, pI teórico e Peso molecular.

IDENTIFICAÇÃO	Nº DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS	PESO MOLECULAR (DA)	pI TEÓRICO
Peroxidase 1*	354	Indefinido**	Indefinido**
Peroxidase 8	171	18341,30	4,57
Peroxidase 9*	207	Indefinido**	Indefinido**
Peroxidase 10*	364	Indefinido**	Indefinido**
Peroxidase 11*	364	Indefinido**	Indefinido**
Peroxidase 14	190	20510,82	3,97
Peroxidase 31*	364	Indefinido**	Indefinido**
Peroxidase 32*	196	Indefinido**	Indefinido**
Peroxidase 35*	301	Indefinido**	Indefinido**
Peroxidase 37*	345	Indefinido**	Indefinido**

*Sequência completa de lignina peroxidase

** A sequência contém vários aa indefinidos consecutivos, portanto seu p.I teórico e Peso molecular não podem ser calculados.

Para a seleção de apenas 1 sequência foi realizada a análise pelo servidor Pfam para confirmação do domínio e família, todas as sequências apresentaram domínio (peroxidase de ligação ao heme), exceto a lignina peroxidase 32. Dessa forma eliminamos essa sequência das posteriores análises.

Em seguida foi realizada uma curadoria manual, onde na avaliação as sequências que não possuíam um comprimento esperado para peroxidases foram removidas. As peroxidases de Classe II (PODs) apresentam um comprimento que varia entre 345 a 427 resíduos (Janusz et al., 2013; Martínez, 2007; Wong, 2009), dessa forma foram removidas as sequências 8, 9, 14 e 35 que não estão dentro do valor esperado (171, 207, 196 e 301 resíduos de aminoácidos, respectivamente).

As sequências 1, 10, 11, 31 e 37 selecionadas da análise anterior, não

possuem regiões de não identificação (impossibilitava as análises de sítio ativo), assim, como alternativa foi selecionada uma sequência de lignina peroxidase de um organismo filogeneticamente próximo ao *T. villosa* (Welti et al., 2012), como modelo para conseguir fazer a identificação do sítio ativo.

Para a seleção da sequência foi realizada uma busca no NCBI por uma lignina peroxidase já estudada. A sequência selecionada foi de *Trametes versicolor* FP-101664 SS1 (XP_008033880.1), pois apenas desse organismo estava disponibilizada a sequência na forma de gene, assim a mesma foi definida como LiPTV. Em seguida foi definido o sítio ativo da lignina peroxidase de *Trametes versicolor* através do servidor Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) (Figura 3).

```
MAFKLLSSFVALAAALQGVSTAALNRRVACPDGVHTASNEACCQLFAVREDLQKNL
FDGAQCNAEAHESLRLTFHDAIAISPALEAQGTFGGGGADGSIAIFSHIETAFHPNIGL
DEIVEKQRPFIERHNLGVADFIQFAGALGASNCPGAPQLSAFVGRKDTRPAPDGLV
PEPFHTPDMIFDRLADASQGEFDPILTVWLLTAHTVAAANDVDPTIPGSPFDSTPSQF
DSQFFLETQLKGTLPFGDGNQGEVESPMRGEFRLQSDFAIARDERTACEWQSFV
NNQTKVQQMFQVFHDLSLFGQNITDLVDCTEVIPVPKPLREATHFPAGFTVRDIEH
ACAETPFPTLPTQAGPRTSVAPVPS
```

Figura 3: Sequência de resíduos de aminoácidos de lignina peroxidase de *Trametes versicolor* (LiPTV) (identificação no NCBI: XP_008033880.1) com o sítio ativo destacado em amarelo.

Após a definição do sítio ativo da lignina peroxidase de *Trametes versicolor*, foi então possível identificar qual das sequências de *T. villosa* estava com sítio ativo preservado. Para esse processo foi realizado um alinhamento através do programa Clustal Omega da sequência de *T. versicolor* com cada sequência de *T. villosa* selecionadas anteriormente sendo elas. 1,10,11,31 e 37.

De todas as sequências analisadas (alinhadas com a sequência do *T. versicolor*), apenas a 31 houve completa conservação do seu sítio ativo. Como a sequência 31 possuía regiões incompletas (não traduzidas), foi realizada um segundo alinhamento ainda utilizando o software Clustal Omega sendo que dessa vez foram utilizadas todas as 10 sequências de lignina peroxidase de *T. villosa* identificadas na fase inicial (Figura 4).

Esse alinhamento foi necessário para preencher as informações pontuais incompletas utilizando como base a sequência complementar do genoma de *T. villosa*, e quando não suficiente foi utilizada a do genoma de *T. versicolor* (EIW63274.1) (Figura 5) gerando a sequência definida como

LiP1820. A sequência traduzida de lignina peroxidase de *Trametes versicolor* usada como base para as análises foi definida como LiPTV.

P9	MAFKXXXXXXXXXXQGAS-AALTRRVACPDGKNTATNAACQQLFAIRDDIQTNLFHGA	59
P10	MAFKXXXXXXXXXXXXXXXX-XXXTRRVACPDGKNTATNAACQQLFAIRDDIQTNLFHGA	59
P32	MAFRTLLSIVSLAAATQGTSA-ALTRRVSCPDGVNTATNAACQQLFAVREDLQQNLFHGG	59
P14	-----	0
P31	MAFKXXXXXXXXXXQGAVNAA-LNRRVACPDGVHTASNEACQQLFAIRDDLQNLFDGG	59
P35	-----	0
P8	-----	0
P37	MAFKXXXXXXXX-XXXXXGTNAALTRRVACPDGVNTATNAACQQLFAVREDLQQNLFHGG	59
P1	MAFKSLLSIVSI-XXXXXXXXXXXXRRVACPDGKNTATNAACQQLFAVREDLQQNLFHGG	59
P11	MAFKSLLSIVSI-XXXXXXXXXXXXRRVACPDGKNTATNAACQQLFAVREDLQQNLFHGG	59
P9	QCGENAHESLRITFHDAISFSPXXXXXXXXXXXXXXXXXIFPEIETAFHANIGLDEIVA	119
P10	QCGENAHESLRITFHDAISFSPXXXXXXXXXXXXXXXXXIFPEIETAFHANIGLDEIVA	119
P32	LCTAEAHESLRLTFHDAIAISPALQXXXXXXXXXXXXXXXXXPEIETNFHPNIGLDEIVQ	119
P14	-----	0
P31	QCNAEAHESLRLTFHDAIAISPALQXXXXXXXXXXXXXXXXXHIETAFHPNIGLDEVVE	119
P35	----EAHESLRLTFHDAIAISPALQXXXXXXXXXXXXXXXXXHIETAFHPNIGLDEVVE	56
P8	-----	15
P37	LCTAEAHESLRLTFHDAIAISPALQXXXXXXXXXISIFPEIETAFHPNIGLDEIVA	119
P1	LCTAEAHESLRLTFHDAIAISPALQXXXXXXXXXISIFPEIETAFHPNIGLDEIVA	119
P11	LCTAEAHESLRLTFHDAIAISPALQXXXXXXXXXISIFPEIETAFHPNIGLDEIVA	119
P9	EQKPLIARHNI SHADFI MFAGAL GASNCPGAPRLDFFLGRKDATRPAPNGLVPEPFDLLE	179
P10	EQKPLIARHNI SHADFI MFAGAL GASNCPGAPRLDFFLGRKDATRPAPNGLVPEPFDLLE	179
P32	LQKPFVARHNL SVADFI QFAGAI GASNCPGAPQLSAFVGRIDATQAPADGLVPEPFFHTPD	179
P14	-----	5
P31	KQRPFIERHNLGVADFI QFAGAL GASNCPGAPQLSAFVGRKDATQAPADGLVPEPFFHTPD	179
P35	KQRPFLQRHNI GVADFI QFAGAL GASNCPGAPQLSAFVGRKDATRPAPDGLVPEPFFHTPD	116
P8	LQKPFVARHNI SHADFI QFAGAI GASNCPGAPQLAFAFVGRKDATQAPADGLVPEPFFHTPD	75
P37	LQKPFQARHNL SHADFLHFXXXXXXXXXXXPQLAFAFVGRVDTQAPADGLVPEPFFHTPD	179
P1	LQKPFQARHNL SHADFLHFXXXXXXXXXXXPQLAFAFVGRKDATQAPADGLVPEPFFHTPD	179
P11	LQKPFQARHNL SHADFLHFXXXXXXXXXXXPQLAFAFVGRKDATQAPADGLVPEPFFHTPD	179
. :		
P9	DVFARLADASSGEFDEILTVWLLTAHTIAASDHLDETI PGTPMDSTPHVWDTQFFIETQL	239
P10	DVFARLADASSGEFDEILTVWLLTAHTIAASDHLDETI PGTPMDSTPHVWDTQFFIETQL	239
P32	QIFARLADASSGEFDEI-----	196
P14	QIFARLADASSGEFDEILTVWLLVAHTVAAANDVDPTVPGSPFDSTPEVWDTQFFVHVLL	65
P31	MIFDRLADASSGEFDPILTVWLLTAHTVAAANDVDPTIPGSPFDSTPGQFDSQFFLETQL	239
P35	QIFARLADASSGEFDEILTVWLLTAHTIAAANDVDPTLVGAPFDSTPELFDSTQFFLETQL	176
P8	QIFDRIADASSGEFDPILTVWLLTAHTVAAANDIDPAHSGLPFDSTPELWDTQFFLETQL	135
P37	QIFDRIADASSGEFDPILTVWLLTAHTVAAANDVDPTKSGLPFDSTPELWDTQFFLETQL	239
P1	QIFDRLADASSGEFDPILTVWLLTAHTVAAANDVDPTKNGLPFDSTPELWDTQFFVETQL	239
P11	QIFDRLADASSGEFDPILTVWLLTAHTVAAANDVDPTKNGLPFDSTPEIWDQFFVETQL	239
:* :****.**** *		
P9	RGTAFFPGKGNHGEVMSPLKGEIRLQTDHLLARDSRTACEWQSFVNNQQAQDMFAFVFH	299
P10	RGTAFFPGKGNHGEVMSPLKGEIRLQTDHLLARDSRTACEWQSFVNNQQAQDMFAFVFH	299
P32	-----	196
P14	NGTTFPGTGNQGEVASPIQGEFRLQSDFAIARDSRSACEWQSFVDNQPKAQAMFQFVFH	125
P31	KGTLPFGDGNKGEVESPLHGEFRLQSDFAIARDERTACEWQSFVNNQTKVQQMFQFVFH	299
P35	KGTLPFGDGNKGEVLSPLRGEFRLQSDFAIARDPRSACEWQSFVNNQTKVQQMFQFVFH	236
P8	RGTSFPGTGNQGEVESPLAGEMRLQSDHTIARDSR-----	171
P37	RGTAFFPGSGGNQGEVESPLAGEMRLQSDHTIARDSRTACEWQSFVDNQPKAQAMFQFVFQ	299
P1	RGTLFPGKGNQGEVESPLAGEIRLQSDHTIARDPRTACEWQSFVDNQPKAQAMFQFVFQ	299
P11	RGTLFPGKGNQGEVESPLAGEMRLQSDHTIARDSRTACEWQSFVDNQPKAQAMFQFVFQ	299
P9	DLSMLGQDPDSLIDCSELIPQAPVTTKAHFPAGLTNKDIEQACADTFPPTLPTEPGPKT	359
P10	DLSMLGQDPDSLIDCSELIPQAPVTTKAHFPAGLTHKDIEQACADTFPPTLPTEPGPKT	359
P32	-----	196
P14	DLSILGQDINSILDCTEVVVPAPLQGVTHFPAGLTVNDIEQPCVETFPPTLPDTPGPAT	185
P31	DLSLFGQNIDDLVDCTEVIPIPKPLRQATHFPAGFTVRDIEHTCAETFPPTLPDTPGPAT	359
P35	DLSILGQNIDDLVDCTEVIPIPKPLRTRTHFPAGLTHRDIEQCAETFPPTLPDTPGPAT	296
P8	-----	171
P37	VLTTLGQNQDDLVDCTEVVPIPAAPQGHTHFPAGLTVADIEQACAE-----	345
P1	VLTTLGQNQDDLVDCTEVVPIPAAPQGRTHLPAGMTHNDIEQCAETFPPTLPID----	354
P11	VLTTLGQNQDDLVDCTEVVPIPAAPQGRTHLPAGMTHNDIEQCAETFPPTLPID----	354
P9	TVAPV	364
P10	TVAPV	364
P32	----	196
P14	SVAPV	190
P31	SVAPV	364
P35	GVAPV	301

Figura 4: Alinhamento Múltiplo através do servidor CLUSTAL OMEGA das 10 sequências de Lignina peroxidase provenientes do genoma de *T. villosa* disponível no Gofeat. Em amarelo a sequência 31 da lignina peroxidase e em roxo os resíduos de aminoácidos das sequências previamente selecionadas que foram substituídos nas regiões incompletas da sequência 31.

Lip	MAFKSLLSIVSLAAALQGVNAA-LNRRVACPDGVHTASNEACCQLFAIRDDLQKNLFDGG	59
LipXP_008033880.1	MAFKLLSSFVALAAALQGVSTAALNRRVACPDGVHTASNEACCQLFAVREDLQKNLFDGA	60
	**** * *:*****.:* *****:*****:*****.	
Lip	QCNAEAHESLRLTFHDAIAISPALAEQXXXXXXXXXXSISIFPHIETAFHPNIGLDEVVE	119
LipXP_008033880.1	QCNAEAHESLRLTFHDAIAISPALAEQ QTFGGGGADG SIAIFSHIETAFHPNIGLDEIVE	120
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****.	
Lip	KQRPFIERHNLGVADFIQFAGALGASNCPGAPQLSAFVGRKDATQPAPDGLVPEPFHTPD	179
LipXP_008033880.1	KQRPFIERHNLGVADFIQFAGALGASNCPGAPQLSAFVGRKDATRPAPDGLVPEPFHTPD	180
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****.	
Lip	MIFDRLADASQGEFDPILTVWLLTAHTVAAANDVDPTIPGSPFDSTPGQFDSQFFLETQL	239
LipXP_008033880.1	MIFDRLADASQGEFDPILTVWLLTAHTVAAANDVDPTIPGSPFDSTPGQFDSQFFLETQL	240
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****.	
Lip	KGTLFPGDGNKGEVESPLHGEFRLQSDFAIARDERTACEWQSFVNNQTKVQQMFQVFVH	299
LipXP_008033880.1	KGTLFPGDGNKGEVESPMRGEFRLQSDFAIARDERTACEWQSFVNNQTKVQQMFQVFVH	300
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****.	
Lip	DLSLFGQNIDDLVDCTEVIPIPKPLRQATHFPAGFTVRDIEHTCAETPFPTLPTQPGPKT	359
LipXP_008033880.1	DLSLFGQNITDLVDCTEVIPIPKPLREATHFPAGFTVRDIEHACAETPFPTLPTQAGPRT	360
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****.	
Lip	SVAPV-- 364	
LipXP_008033880.1	SVAPVPS 367	

Figura 5: Alinhamento da sequência através do servidor CLUSTAL OMEGA de lignina peroxidase 31 de *T. villosa* com lignina peroxidase de *Trametes versicolor* (XP_008033880.1). Em verde a sequência de resíduos de aminoácidos de lignina peroxidase que foram substituídas da sequência do *Trametes versicolor* para o *T. villosa*.

Após as substituições, a sequência 31 modificada ficou completa conforme Figura 6, sendo definida como LiP1820. As marcações são correspondentes as substituições, sendo roxo (resíduos do genoma do *T. villosa*), verde (resíduos do *T. versicolor*), amarelo (sítio ativo preservado), letras em azul (peptídeo sinal) usando o servidor (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) para determinar o peptídeo sinal. (Anexo - Figura 2).

```
MAFSLLSIVSLAAALQGVNAA-
LNRRVACPDGVHTASNEACCQLFAIRDDLQKNLFDGGQCNAEAHESLRLTFHDAIAIS
PALEAQQTFGGGGADGSISIFPHIETAFHPNIGLDEVVEKQRPFIERHNLGVADFIQFA
GALGASNCPGAPQLSAFVGRKDATQPAPDGLVPEPFHTPDMIFDRLADASQGEFDPI
LTWLLTAHTVAAANDVDPTIPGSPFDSTPGQFDSQFFLETQLKGTLFPGDGNKGE
VESPLHGEFRLQSDFAIARDERTACEWQSFVNNQTKVQQMFQVFVHDLLSLFGQNID
DLVDCTEVIPIPKPLRQATHFPAGFTVRDIEHTCAETPFPTLPTQPGPKTSVAPV
```

Figura 6: Sequência de resíduos de aminoácidos de lignina peroxidase de *T. villosa* modificada (LiP1820). Roxo: Resíduos de aminoácidos que foram substituídos da região conservada do genoma do *T. villosa*. Verde: Resíduos de aminoácidos substituídos do gene de *Trametes versicolor*. Amarelo: sítio ativo. Letras em azul: peptídeo sinal.

A lignina peroxidase é uma proteína globular cujo peso molecular varia entre 37 e 43 kDa e ponto isoelétrico entre 3,3 e 4,7 (Paramjeet; Manasa; Korrapati, 2018). A sequência da LiP1820 completa (com peptídeo sinal) apresentou pI teórico de 4,65 e a massa molecular de 39 kDa, ao passo que a sequência sem o peptídeo sinal possui pI teórico de 4,66 e massa de 37 kDa. A remoção do peptídeo sinal da sequência favorece a superexpressão da proteína na forma solúvel quando se quer fazer expressão heteróloga (Kim et al., 2010) e ainda reduz a carga celular em algumas cepas de *E. coli* (Chen et al., 2023).

Após definição da sequência de lignina peroxidase LiP1820 (com as substituições e sem peptídeo sinal), foram realizadas outras análises de bioinformática.

3.2 Escolha da proteína molde

A modelagem comparativa é uma técnica usada para prever a estrutura tridimensional de uma proteína com base em uma ou mais proteínas com estrutura resolvida experimentalmente (molde) (Ginalski, 2006).

A construção dos modelos 3D foi realizada através do SWISS-MODEL, pela metodologia de corpos rígidos (Waterhouse et al., 2018). A metodologia utilizada de corpos rígidos se baseia na avaliação da conservação de estruturas proteicas por homologia ou por nível de identidade, levando a construção de um modelo com boa qualidade.

Proteínas moldes com qualidade (resolução < 2,0 Å), identidade (> 50%), cobertura suficiente foram buscadas para modelar a maior parte da proteína alvo. Nessa etapa, a proteína lignina peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium* (PDB ID: 1B80) reúne condições satisfatórias apresentando resolução de 1,8 Å e maior identidade sequencial, 66,98%, em relação à sequência da LiP1820. Isso permite a construção de modelos 3D confiáveis (Bordoli et al., 2009).

A qualidade do modelo tridimensional gerado para a LiP1820 foi quantitativamente avaliada pelas métricas GMQE (*Global Model Quality Estimation*) e QMEAN (*Qualitative Model Energy Analysis*) disponíveis no servidor SWISS-MODEL. O GMQE métrica estima a precisão do modelo

predito com base no alinhamento com a estrutura molde, onde valores mais próximos de 1 indicam maior confiabilidade (Biasini et al., 2014). A validação foi complementada pelo QMEAN (*Qualitative Model Energy Analysis*), que compara as características geométricas do modelo com estruturas experimentais de alta resolução. Nesta análise, modelos com valores de Z-score superiores à -4 são aceitáveis (Biasini et al., 2014; Waterhouse et al., 2018). O modelo obteve um escore GMQE = 0,86 e QMEAN = -0,33 (Figura 7) sugerindo que apresenta uma estrutura similar em termos conformacionais à proteína molde e proteínas de alta resolução, portanto adequada para as análises subsequentes.

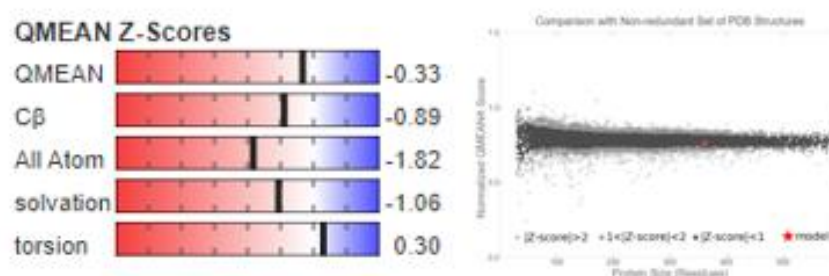


Figura 7: Dados da estimativa da qualidade dos modelos por QMEAN e QMEAN, gerado pelo servidor SWISS – modelo LiP1820.

A análise da qualidade estereoquímica do modelo foi realizada pelo gráfico de Ramachandran (Ramachandran; Ramakrishnan; Sasisekharan, 1963), sendo possível avaliar a distribuição dos ângulos diédricos da cadeia polipeptídica, permitindo determinar a porcentagem dos resíduos dos modelos nas regiões permitidas e não permitidas. Conforme o critério estabelecido por Laskowski et al. (1993), um modelo de alta qualidade deve possuir mais de 90% dos seus resíduos nas regiões conformacionais mais favorecidas. A análise do modelo LiP1820 revelou que 91,5% dos resíduos estão localizados nestas regiões mais favorecidas e 8,1% restantes em regiões permitidas (Figura 8). Portanto, o modelo atende plenamente ao critério de qualidade da geometria da estrutura gerada.

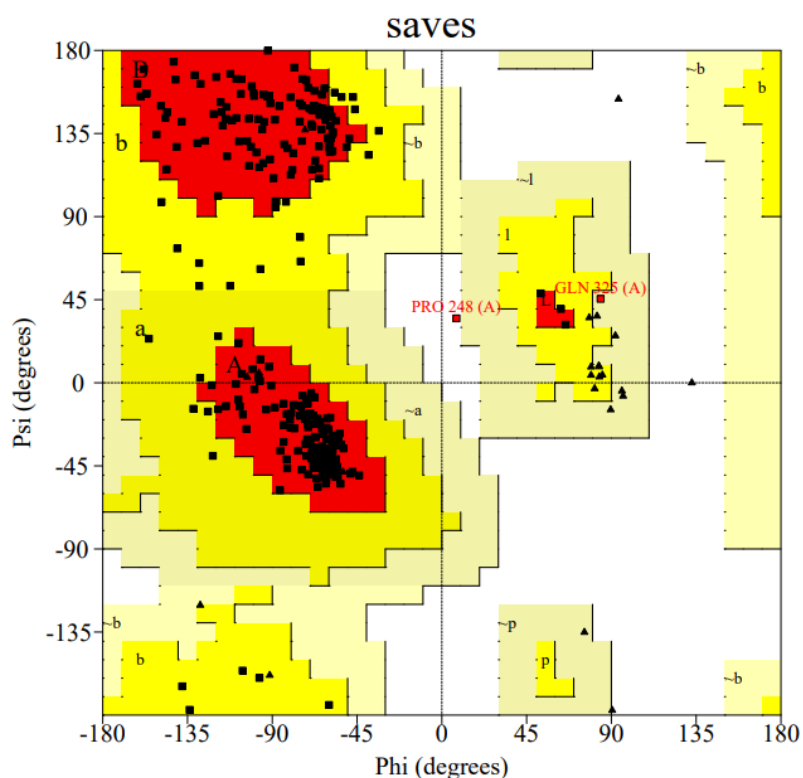


Figura 8: Gráfico de Ramachandran, mostrando os resíduos que estão em regiões altamente favorecidas (região em vermelho), os resíduos que estão na região permitidas (região em amarelo) no modelo da LiP1820.

A validação do modelo foi complementada pela análise de seu perfil 3D- 1D, utilizando a ferramenta Verify3D. Este método avalia a compatibilidade da estrutura tridimensional com sua própria sequência de aminoácidos, sendo que um modelo é considerado de boa qualidade quando pelo menos 80% dos resíduos apresentam um escore $\geq 0,1$ (Eisenberg; Lüthy; Bowie, 1997). O modelo da LiP1820 satisfaz este critério, com 83,67% de seus resíduos alcançando a pontuação necessária.

Finalmente, a sobreposição estrutural do modelo com a proteína molde foi inspecionada visualmente (Figura 9). A inspeção confirmou um enovelamento global altamente conservado (RMSD = 0,06 Å), com as divergências mais notáveis restritas a regiões de alças flexíveis, como é comum em modelagem por homologia. Em conjunto, estas análises atestam a alta qualidade do modelo gerado sendo possível prosseguir para os estudos de dinâmica.

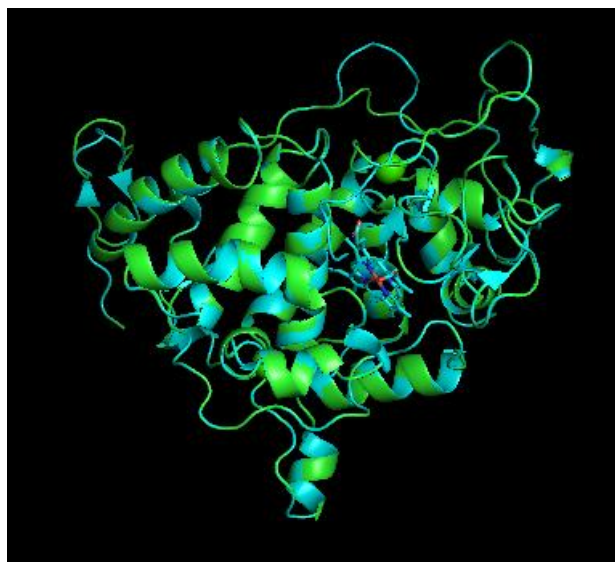


Figura 9: Alinhamento da estrutura do modelo LiP1820 com o molde (1b80) gerado pela ferramenta PyMol.

3.3 Simulação por Dinâmica

Após a validação do modelo estrutural, a estabilidade conformacional da LiP1820 foi investigada por meio de simulações de Dinâmica Molecular (DM). Foram avaliados três sistemas distintos em pH 3 e pH 7: a forma *Branco* (proteína sem cofator ou substrato), a forma *Apo* (proteína com o cofator heme) e a forma *Holo* (proteína com o cofator e o substrato álcool veratrílico). A estabilidade estrutural ao longo do tempo foi quantificada pelo cálculo do Desvio Quadrático Médio (RMSD) dos átomos do *backbone* em relação à estrutura inicial.

Os resultados, sumarizados na Tabela 2 e ilustrados nas Figuras 10 e 11, indicam que a proteína exibe diferentes perfis de estabilidade dependendo do pH e da presença do substrato.

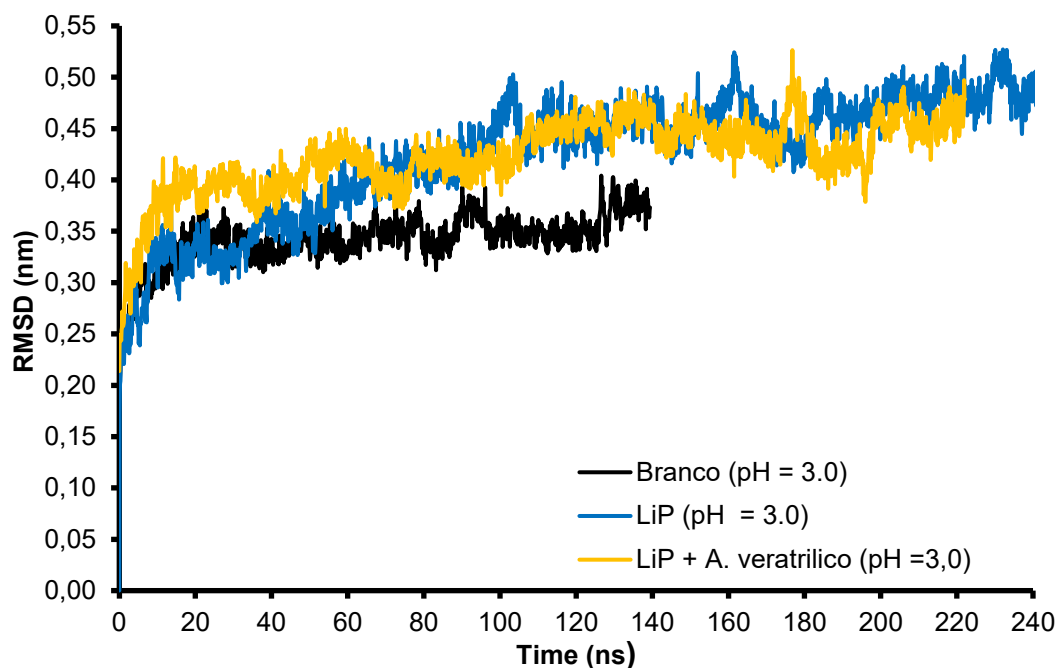


Figura 10: Desvio quadrado médio (RMSD) em pH 3 dos átomos da proteína durante a DM de 240ns. Branco (lignina peroxidase); LiP (lignina peroxidase + cofator – (heme e cálcio)) e LiP + A. veratrílico (Lignina peroxidase + co fator – (heme e cálcio) + substrato (álcool veratrílico)).

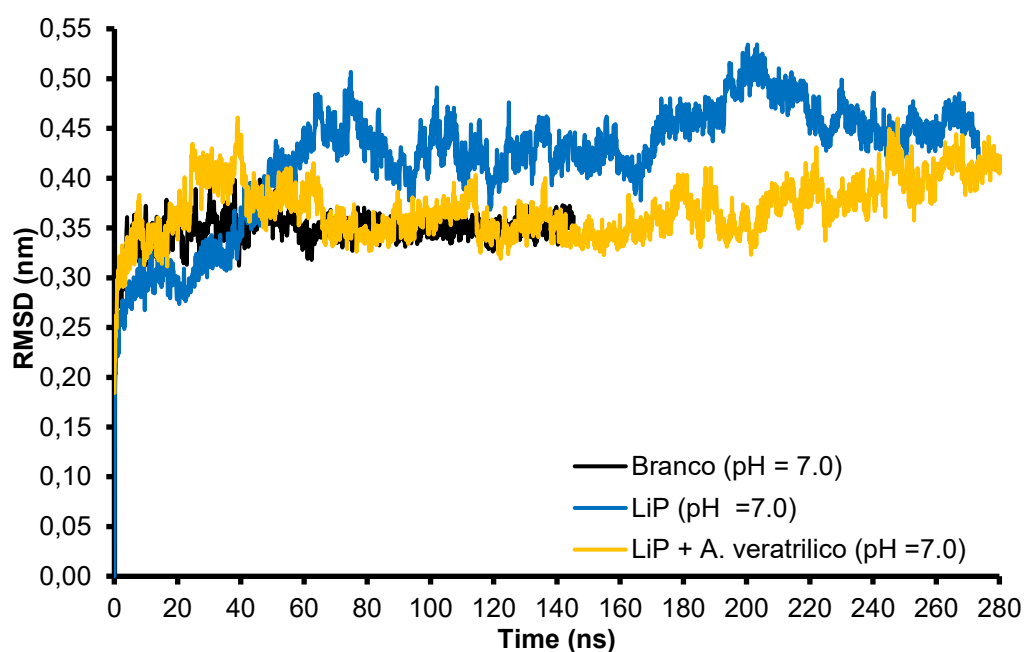


Figura 11: Desvio quadrado médio (RMSD) em pH 7 dos átomos da proteína durante a DM de 280ns. Branco (lignina peroxidase); LiP (lignina peroxidase + co fator – (heme e cálcio)) e LiP + A. veratrílico (Lignina peroxidase + co fator – (heme e cálcio) + substrato (álcool veratrílico)).

Tabela 2: Desvio quadrado médio (RMSD) de dados comparativos nos pHs 3,0 e 7,0.

pH		Branco	<i>Apo</i>	<i>Holo</i>
	Fase produtiva	30-130 ns	100-200 ns	110-210 ns
3,0	RMSD Médio \pm Desvio padrão	0,35 \pm 0,01 nm	0,46 \pm 0,02 nm	0,45 \pm 0,02 nm
	Fase produtiva	40-140 ns	90-190 ns	110-210 ns
7,0	RMSD Médio \pm Desvio padrão	0,35 \pm 0,01 nm	0,43 \pm 0,02 nm	0,36 \pm 0,01 nm

Nas fases produtivas (Tabela 2), observa-se que todos os sistemas estabilizaram em baixos valores de RMSD ($< 0,5$ nm) indicando que em média as posições atômicas se mantiveram próximas as estruturas de referência com mínimas mudanças conformacionais gerais.

Contudo, pequenas diferenças foram observadas entre os pHs e tipos de sistemas. Em pH ácido as formas *apo* e *holo* da LiP1820 exibem valores médios de RMSD mais elevados, sugerindo maior flexibilidade ou desvio estrutural nessa condição em relação a estrutura de partida. Em contrapartida, a forma *holo* em pH neutro apresentou maior rigidez (RMSD = $0,36 \pm 0,01$ nm), valor significativamente menor que o observado para a forma *Apo* (RMSD = $0,46 \pm 0,02$ nm), bem como para a forma *Holo* em pH ácido (RMSD = $0,45 \pm 0,02$ nm). Estes resultados sugerem que a interação com o substrato ou o estado de protonação dos resíduos em pH 7,0 reduzem o grau de flexibilidade da estrutura da enzima. Embora um efeito “estabilizador” do álcool veratrílico seja esperado, visto que é o principal substrato da lignina peroxidase segundo (Recabarren; Fuenzalida-Valdivia; Alzate-Morales, 2016), para o sistema em pH ácido, a presença do substrato aparentemente não foi convertida em uma mudança significativa de flexibilidade da enzima. De fato, essas diferenças, embora significativas para os parâmetros da simulação de dinâmica molecular, por si só, não é um preditor direto de uma maior atividade catalítica. A catálise enzimática frequentemente depende de um balanço fino entre estabilidade e flexibilidade, logo, proteínas mais flexíveis podem superar barreiras energéticas de ativação, e consequentemente, acelerar a reação enzimática (Nestl; Hauer, 2014).

Uma possível explicação mecanicista para essa dinâmica dependente de pH, reside na rede de ligações de hidrogênio da enzima, que são cruciais

tanto para a integridade estrutural quanto para a atividade catalítica (Fang et al., 2023).

A alteração no estado de protonação dos resíduos (de pH 7,0 para 3,0) pode modular essa rede de interações, induzindo a uma maior flexibilidade estrutural observado. De fato, o aumento na mobilidade estrutural global observada em pH 3,0 pode facilitar o acesso do substrato ao canal do grupo heme, promovendo uma interação mais eficaz no sítio ativo e, potencialmente, uma maior atividade enzimática, como sugerido para outras peroxidases (Francesca Gerini et al., 2003).

Para identificar as regiões da proteína que mais flutuaram durante as simulações, foi calculada a Flutuação Quadrática Média (RMSF) para o esqueleto polipeptídico. O RMSF quantifica a flexibilidade de cada resíduo, onde classicamente valores elevados indicam maior mobilidade, enquanto valores baixos sugerem regiões estruturalmente mais estáveis (Arnittali et al., 2021; Passamani, 2023). Neste estudo foram calculados os valores de Δ RMSF para quantificar diferença de flexibilidade entre as formas *apo* e *holo*, permitindo isolar o efeito da ligação do substrato na dinâmica da proteína em cada condição de pH. Os valores positivos de Δ RMSF indicam aumento de flexibilidade na forma *holo* em relação à forma *apo*, enquanto valores negativos representam rigidez estrutural.

A análise do Δ RMSF revelou padrões distintos de alterações conformacionais induzidas pela ligação do substrato álcool veratrílico em diferentes condições de pH (Figura 12). Em pH neutro, a ligação do substrato promoveu alterações conformacionais mais pronunciadas, caracterizadas por flutuações amplas no Δ RMSF ao longo da sequência proteica. Em contraste, em pH ácido, as alterações conformacionais foram mais moderadas, ocorrendo de forma distribuída na proteína.

Esses resultados se alinham com as diferenças observadas entre os RMSDs da forma Apo e Holo das proteínas nos diferentes pHs, sugerem que a proteína em pH ácido parece estar em uma conformação “pré-organizada” para a ligação do substrato. Contudo, a ligação do substrato parece afetar regiões específicas, alguns dos quais são funcionalmente cruciais para a enzima como os resíduos 35-58; resíduos 135-153 e 160-184; e resíduos 244-255 e 300-327. Primeiramente, os resíduos 35-58 que

apresentaram notável redução de flexibilidade (valores negativos de ΔRMSF) em pH 3,0 em relação ao pH 7,0. Essa região contém os resíduos do sítio catalítico Arg43, Phe46 e His47 que formam o bolso de ligação para o peróxido de hidrogênio e interagem diretamente com o íon ferro do grupo heme, sendo essenciais para o início do ciclo catalítico (Francesca Gerini et al., 2003).

No segundo grupo de resíduos (135-153 e 160-184) também exibem diferenças de flexibilidade e rigidez dependente do pH e correspondem a alças que funcionam como canais de acesso ao grupo heme segundo dados de RMSF da lignina peroxidases realizados por Francesca Gerini et al. (2003). Essa região também possui o triptofano catalítico (Trp171), importante resíduo para atividade da Lip atuando como um doador de elétrons de longa distância.

As flutuações observadas nos resíduos 244-255 e 300-327 podem estar relacionadas à dinâmica de resíduos importantes para a atividade enzimática, como Glu168, Trp171, Asp264 e Phe267, que foram previamente identificados como relevantes para a catálise por outras peroxidases (Recabarren; Fuenzalida-Valdivia; Alzate-Morales, 2016).

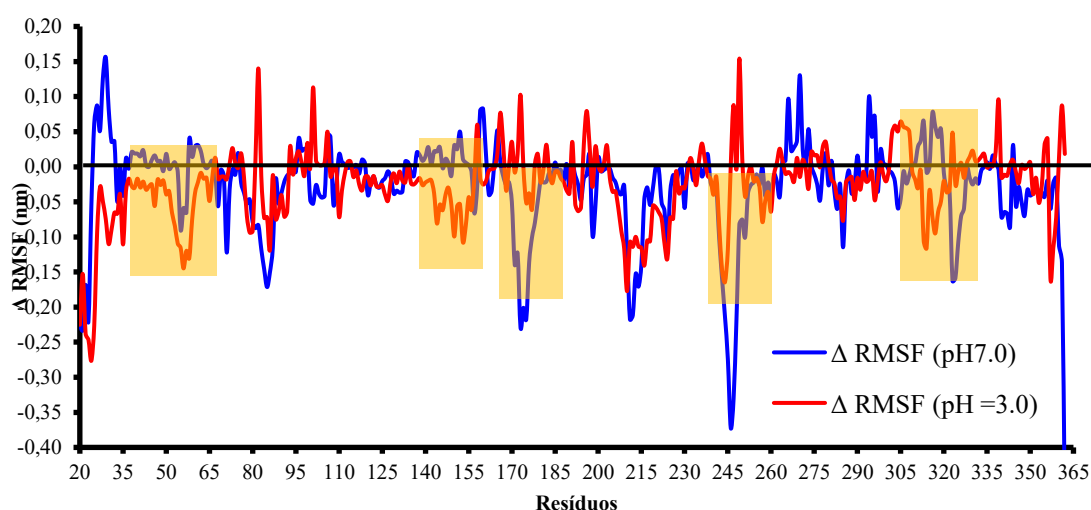


Figura 12: Gráfico das diferenças do RMSF (ΔRMSF) da proteína *holo* em relação a *apo* nos pHs 3,0 (linha vermelha) e 7,0 (Linha azul). Quadros amarelos destacam regiões de maior flutuação (> que a média de RMSF).

Para avaliar a compactação e a integridade do enovelamento global da proteína durante as simulações, foi calculado o Raio de Giro (RG). Esta métrica quantifica a distribuição da massa da proteína em torno de seu centro,

onde valores de RG menores indicam uma estrutura mais compacta, enquanto flutuações ou aumentos no valor podem sugerir um processo de desnaturação ou expansão estrutural (Passamani, 2023; Sneha; George Priya Doss, 2016).

Os resultados, apresentados nas Figuras 13 e 14 e sumarizados na Tabela 3, revelam que a compactação da enzima também é influenciada pelo pH e pela ligação do substrato.

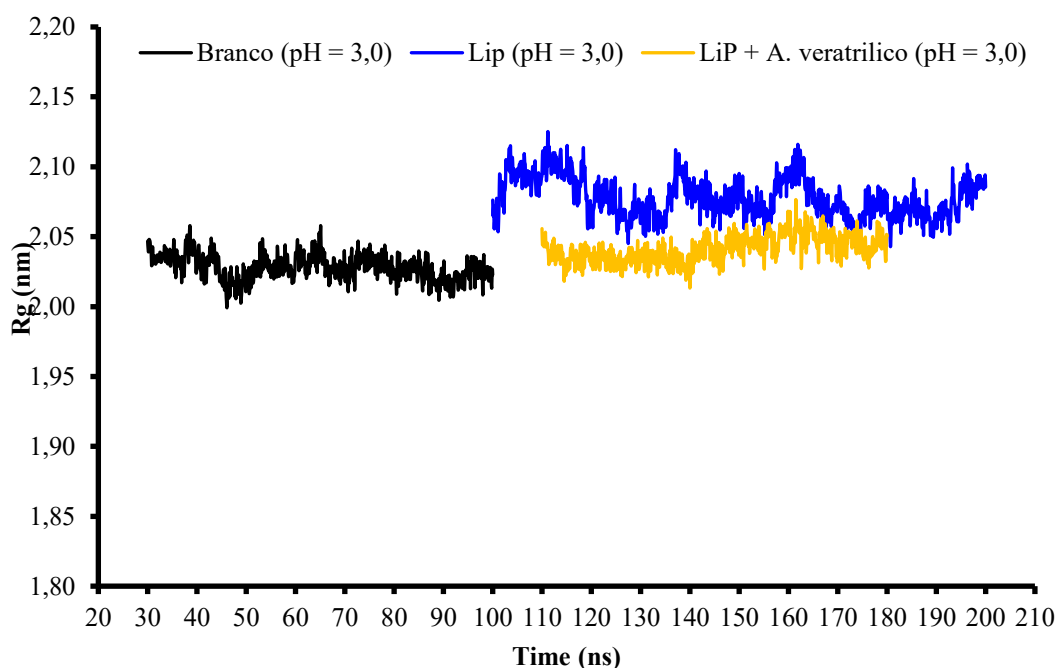


Figura 13: Gráfico do Raio de Giração (RG) da lignina peroxidase em pH 3. Linha em preto (branco), linha em azul (forma apo), linha amarela (forma holo).

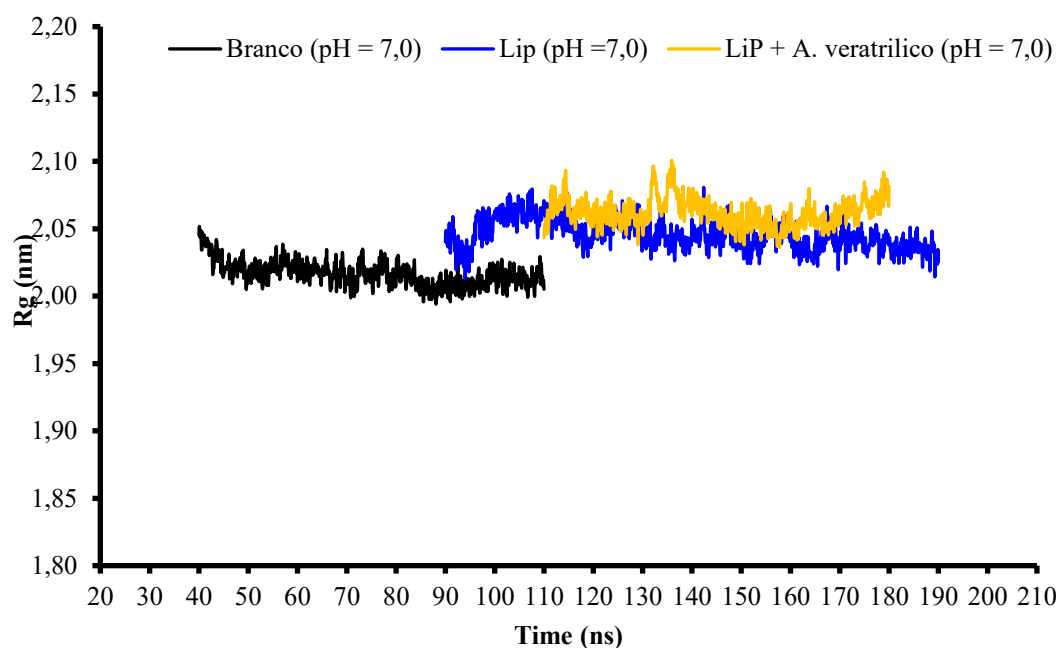


Figura 14: Gráfico do Raio de Giração (RG) da lignina peroxidase em pH 7. Linha em preto (branco), linha em azul (forma apo), linha amarela (forma holo).

Tabela 3: Raio de giro (RG) de dados comparativos nos pHs 3,0 e 7,0.

		Rg		
pH		Branco	<i>Apo</i>	<i>Holo</i>
3,0	Média ± Desvio padrão	2,03 ± 0,01 nm	2,08 ± 0,01 nm	2,04 ± 0,01 nm
7,0	Média ± Desvio padrão	2,02 ± 0,01 nm	2,05 ± 0,01 nm	2,06 ± 0,01 nm

A observação mais notável na Tabela 3 é que em pH ácido a forma holo apresentou o menor valor médio de RG ($2,04 \pm 0,01$ nm), indicando ser a conformação mais compacta que a proteína Apo.

Ao comparar os dados de compactação com a flexibilidade estrutural (ver RMDS) e flutuações em regiões funcionais (ver RMSF) sugere-se que num ambiente ácido a LiP1820 em complexo com o álcool veratrílico pode adotar estados conformacionais diferentes da proteína Apo. Tais características podem representar um estado cataliticamente favorável (Pham et al., 2021), no qual a compactação mantém a integridade do enovelamento, enquanto a flexibilidade localizada facilita o reconhecimento do substrato, a catálise e a liberação do produto. Em pH neutro, essa diferenciação entre apo e holo não é observada, e a distribuição homogênea da flexibilidade pode refletir um estado menos eficiente.

As simulações de DM também trazem informações a respeito das interações por ligações de hidrogênio que são fundamentais para a estabilização estrutural dos sítios de interação (Hollingsworth; Dror, 2018). Para obter uma compreensão mecanicista da dinâmica observada, foram investigadas as interações moleculares entre a enzima e o substrato, bem como o perfil de exposição dos resíduos ao solvente em cada pH. As interações por ligações de hidrogênio, fundamentais para a estabilização dos sítios de interação, foram mapeadas para identificar os pontos de ancoragem do substrato.

A análise revelou que os resíduos Arg68 e His72 são os principais responsáveis por ancorar o substrato através de ligações de hidrogênio, com uma frequência de interação notavelmente similar em ambos os pHs (Arg68: 62,3% em pH 3 vs. 61,8% em pH 7; His72: 37,7% em pH 3 vs. 38,1% em pH 7). Este resultado demonstra que independentemente do estado de protonação geral do sistema estes dois resíduos, que fazem parte do bolso de ligação do H_2O_2 , devem funcionar como um suporte estável para o álcool veratrílico durante a aproximação com o grupo heme (Francesca Gerini et al., 2003).

Em contraste com essa ancoragem estável, o perfil de exposição ao solvente (calculado pelo r_{suf}) mostrou-se marcadamente dependente do pH (Figura 15). De forma geral, observa-se um aumento significativo da superfície de contato em pH 3,0, indicando que esse ambiente favorece uma conformação mais ajustada para a interação proteína-ligante. Em contraste, os dados obtidos em pH 7,0 mostram uma distribuição mais restrita e reduzida das interações, com poucos resíduos apresentando contato significativo com o álcool veratrílico, o que pode refletir uma conformação menos favorável à catálise.

Vale destacar a diferença de exposição nos dois pHs entre os resíduos Arg68, Phe71, His72 que são importantes para ativação da enzima (Francesca Gerini et al., 2003). Esta alteração no perfil de exposição é uma consequência direta da mudança no estado de protonação dos resíduos, que remodela a superfície da proteína e suas interações.

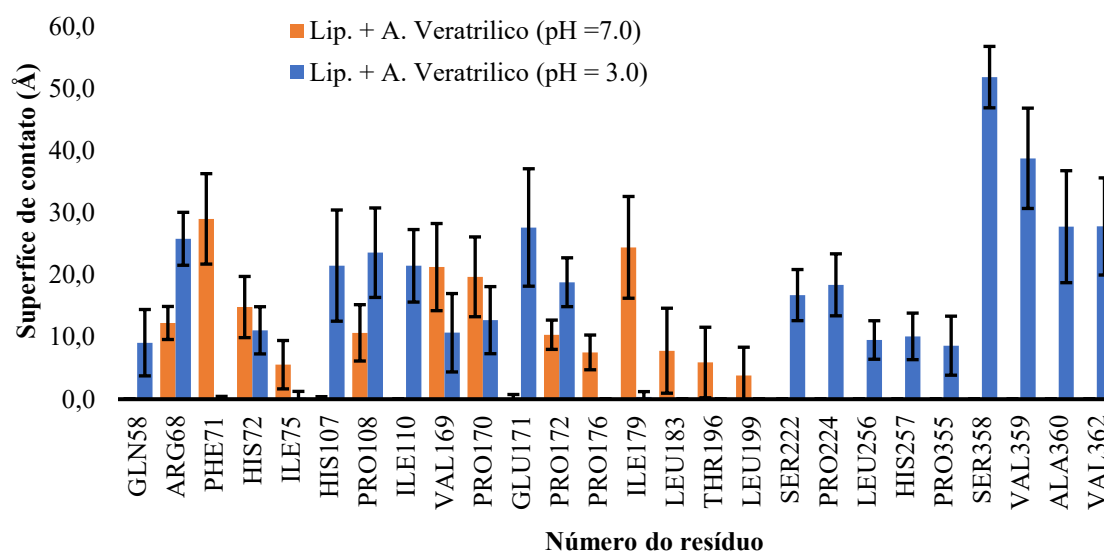


Figura 15: Gráfico de rsuf dos pH 3 e 7. Mostrando a diferença de exposição ao substrato da lignina peroxidase ao álcool veratrílico.

Embora o perfil de interações entre a Lip1820 e o álcool veratrílico seja bastante heterogêneo, as mudanças no estado de protonação dos resíduos ionizáveis nos pHs podem alterar significativamente as contribuições eletrostáticas e de solvatação polar, impactando diretamente a energia livre de ligação. Para investigar a influência do pH nos complexos enzima-substrato da LiP1820, empregou-se a análise de MM-PBSA (*Molecular Mechanics - Poisson- Boltzmann Surface Area*). Este método computacional híbrido combina cálculos de mecânica molecular com modelos de solvatação contínua para estimar energias livres de ligação entre biomoléculas (REF), os quais para este estudo foram representados na forma de energia decorrente de interações eletrostáticas (Coulomb) e de Van der Waals (Lennard-Jones). A análise do perfil energético dos complexos indica que em ambos os pHs as contribuições eletrostáticas são levemente mais importantes que as contribuições hidrofóbicas, embora não seja significativa (Tabela 4).

Tabela 4. Contribuições eletrostáticas e de não-polares para o complexo Complexo Lip1820-AV nos pHs 3,0 e 7,0

Complexo Lip1820-AV	Energia de interações (Kcal/mol)	
	Coulomb	Lennard-jones
pH 3,0	-74.63 ± 17.96	-50.20 ± 11.78
pH 7,0	-80.98 ± 11.01	-52.78 ± 09.65

O complexo LiP1820-álcool veratrílico apresenta interações eletrostáticas mais favoráveis em pH neutro (diferença de $\sim 6,35$ kcal/mol). Esta observação indica que o estado de protonação em pH 7,0 promove uma configuração de cargas mais complementar entre a enzima e o substrato, resultando em maior estabilização eletrostática do complexo. A diferença mínima ($\sim 2,58$ kcal/mol) nas interações de van der Waals sugere que as interações hidrofóbicas entre enzima e substrato são pouco afetadas pelo pH. Isso indica que a estrutura do bolso de ligação permanece geometricamente similar, mantendo contatos não-polares eficientes em ambas as condições.

Os dados MM-PBSA portanto indicam uma maior estabilidade termodinâmica em pH neutro do que em pH ácido. Não está claro como isso implica em menor capacidade de catalise, mas considerando que o complexo proteína-substrato buscou mimetizar a etapa lenta da reação (Ver Figura 1), pode-se interpretar que a maior estabilidade poderia dificultar a progressão catalítica.

Uma vez que o MM-PBSA análise de forma global, fornecendo uma média termodinâmica da energia de ligação ao longo de toda a simulação, foram realizados estudos complementares que buscam revelar a distribuição populacional e heterogeneidade conformacional dos estados visitados através da análise de paisagem de energia livre (FEL, *Free Energy Landscape*).

O FEL é um mapa bidimensional que representa todas as conformações que uma proteína pode adotar durante uma simulação de dinâmica molecular ao projetar a dinâmica da proteína em componentes principais (geralmente as duas) permitindo correlacionar com suas estabilidades relativas, e os caminhos de transição entre eles. Cada ponto no mapa corresponde a uma configuração específica da proteína, e as cores indicam a estabilidade energética: regiões roxas/azuis (vales) representam conformações de baixa energia livre (estáveis), enquanto regiões amarelas (picos) representam estados de alta energia livre (instáveis).

A análise dos gráficos de FEL revela uma diferença importante no comportamento dinâmico do complexo nos dois pHs (Figura 16).

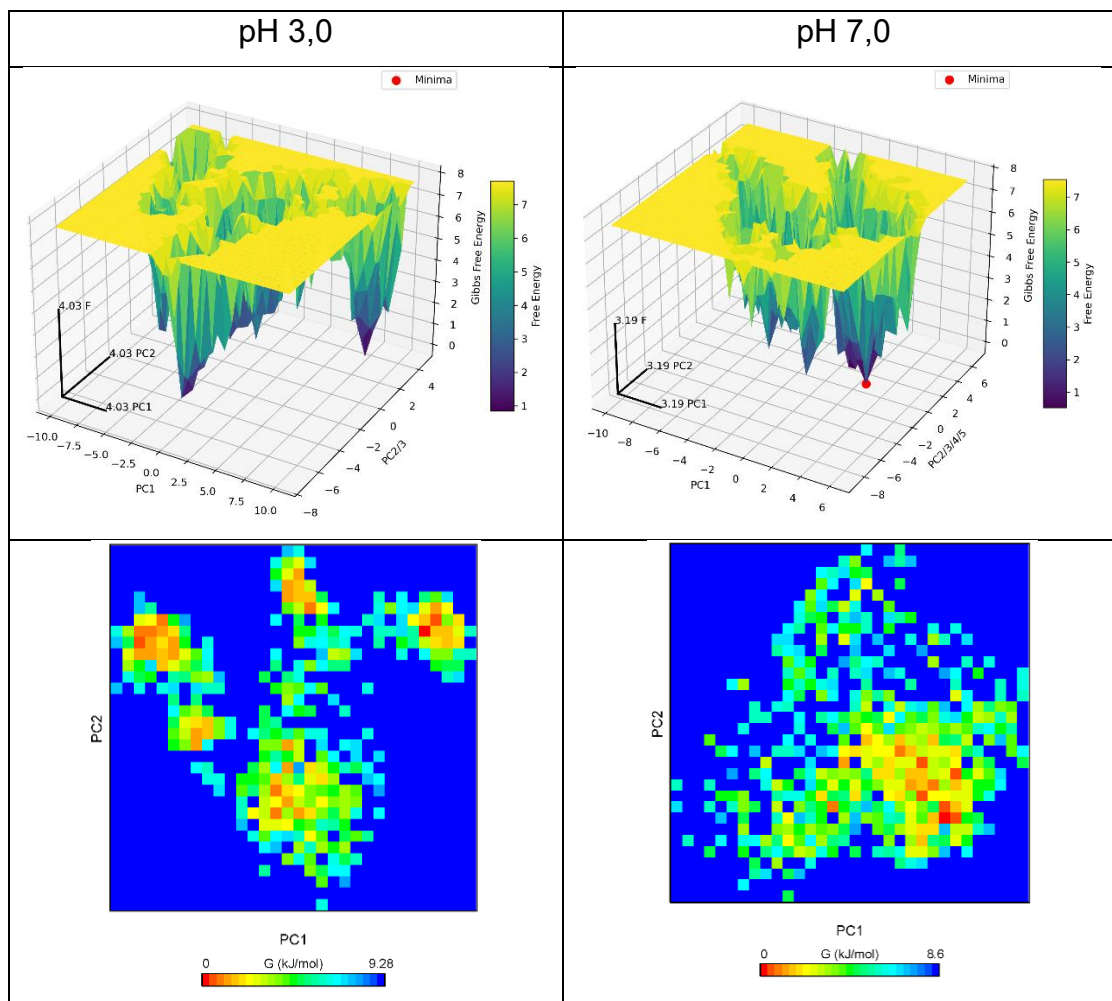


Figura 16: Superfície de energia livre da Lip1820 em complexo com Álcool veratrílico. Em pH3 observa vários fragmentos distribuídos já em pH7 se observa uma paisagem energética mais organizada.

Em pH ácido, a paisagem energética apresenta múltiplos mínimos fragmentados e distribuídos, indicam que o sistema não converge para uma única conformação estável. Isso sugere que a eficiência catalítica neste pH pode não se relacionar com um único estado conformacional, pela transição em várias conformações. Em contrapartida, em pH neutro se observa uma paisagem energética mais organizada, caracterizada por uma região de baixa energia mais coesa e centralizada. Esta topografia mais uniforme indica que a enzima converge para um estado conformacional mais estável e termodinamicamente favorável. Confrontando com os dados sobre eficiência enzimática neste pH, esta estabilidade conformacional pode estar associada a algum tipo de “funil energético”, resultando em maior rigidez da

enzima que pode limitar o acesso às mudanças conformacionais necessárias para uma catálise eficiente.

4- Conclusão

A sequência de lignina peroxidase do fungo *Trametes villosa* LiP1820, foi complementada nas suas regiões indefinidas com outra sequência de LiP filogeneticamente próxima, isto permitiu realizar os estudos de dinâmica molecular avaliando a melhor condição de pH da proteína para sua estabilidade de conformação.

A DM, os dados de RMSD, Δ RMSF e RG apontaram maior flexibilidade, melhor conformação e compactação em pH 3 indicando um possível facilitador para a entrada do substrato. O rSurf apresentou uma maior superfície de contato em pH 3 o que favorece uma conformação mais ajustada, no entanto quando avaliamos o MM-PBSA e o FEL, observamos que em pH neutro a proteína se apresenta mais estável termodinamicamente e mais organizada.

Os resultados obtidos reforçam a importância de tais análises para orientar aplicações *in vitro*, uma vez que o desempenho enzimático depende fortemente do microambiente químico. Além disso, estudos dessa natureza contribuem para o direcionamento de estratégias de engenharia de proteínas, otimização de condições experimentais e desenvolvimento de processos biotecnológicos mais eficientes. A compreensão do comportamento da LiP1820 em diferentes condições também é relevante para o avanço de pesquisas voltadas à produção recombinante, ao uso industrial em biorrefinarias e à aplicação na conversão sustentável da biomassa lignocelulósica.

Referências

- ABDEL-HAMID, Ahmed M.; SOLBIATI, Jose O.; CANN, Isaac K. O. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *In: **Advances in Applied Microbiology***. [S.l.]: Elsevier, 2013. v. 82 p. 1–28.
- ABRAHAM, Mark James *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, set. 2015.
- ARNITTALI, Maria *et al.* Structure and Thermal Stability of wtRop and RM6 Proteins through All-Atom Molecular Dynamics Simulations and Experiments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5931, 31 maio 2021.
- BAKER, Nathan A. *et al.* Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 18, p. 10037–10041, 28 ago. 2001.
- BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 6269–6271, nov. 1987.
- BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1–3, p. 43–56, set. 1995.
- BIASINI, Marco *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W252–W258, 1 jul. 2014.
- BIKO, Odwa D. V.; VILJOEN-BLOOM, Marinda; VAN ZYL, Willem H. Microbial lignin peroxidases: Applications, production challenges and future perspectives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 141, p. 109669, nov. 2020.
- BORDOLI, Lorenza *et al.* Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 1–13, jan. 2009.
- BRYK, Taras; HAYMET, A. D. J. The Ice/Water Interface: Density–Temperature Phase Diagram for the SPC/E Model of Liquid Water. **Molecular Simulation**, v. 30, n. 2–3, p. 131–135, 15 fev. 2004.
- CARLSON, Alexis; JUSTO, Alfredo; HIBBETT, David S. Species delimitation in *Trametes*: a comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 735–745, jul. 2014.
- CHEN, Po-Yen *et al.* Heterologous Expression of Toxic White Spot Syndrome Virus (WSSV) Protein in Engineered *Escherichia coli* Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 195, n. 7, p. 4524–4536, jul. 2023.

DARDEN, Tom; YORK, Darrin; PEDERSEN, Lee. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 jun. 1993.

DE CASTRO, E. *et al.* ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Web Server, p. W362–W365, 1 jul. 2006.

EISENBERG, David; LÜTHY, Roland; BOWIE, James U. [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *In: Methods in Enzymology*. [S.l.]: Elsevier, 1997. v. 277 p. 396–404.

FALADE, Ayodeji O. *et al.* Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 1, p. e00394, fev. 2017.

FANG, Wenhan *et al.* Understanding the Key Roles of pH Buffer in Accelerating Lignin Degradation by Lignin Peroxidase. **JACS Au**, v. 3, n. 2, p. 536–549, 27 fev. 2023.

FERREIRA, Dalila Souza Santos *et al.* Draft genome sequence of *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel CCMB561, a tropical white-rot Basidiomycota from the semiarid region of Brazil. **Data in Brief**, v. 18, p. 1581–1587, jun. 2018.

FINN, Robert D. *et al.* The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 4 jan. 2016.

FRANCESCA GERINI, M. *et al.* Molecular Dynamics Simulations of Lignin Peroxidase in Solution. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 6, p. 3883–3893, jun. 2003.

GAŁĄZKA, Agnieszka; JANKIEWICZ, Urszula; ORZECOWSKI, Sławomir. The Role of Ligninolytic Enzymes in Sustainable Agriculture: Applications and Challenges. **Agronomy**, v. 15, n. 2, p. 451, 12 fev. 2025.

GIAP, Vu Dinh *et al.* Lignin peroxidase from the white-rot fungus *Lentinus squarrosulus* MPN12 and its application in the biodegradation of synthetic dyes and lignin. **BioResources**, v. 17, n. 3, p. 4480–4498, 9 jun. 2022.

GINALSKI, Krzysztof. Comparative modeling for protein structure prediction. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, n. 2, p. 172–177, abr. 2006.

HOLLINGSWORTH, Scott A.; DROR, Ron O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, set. 2018.

JANUSZ, Grzegorz *et al.* Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 1, p. 1–12, jan. 2013.

KIM, Hee Taek *et al.* Overexpression and molecular characterization of Aga50D from *Saccharophagus degradans* 2-40: an exo-type β -agarase

producing neoagarobiose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 227–234, mar. 2010.

KUMARI, Rashmi *et al.* *g_mmpbsa* —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 7, p. 1951–1962, 28 jul. 2014.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LEVASSEUR, Anthony *et al.* Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41, 2013.

MARTÍNEZ, Ángel T. High Redox Potential Peroxidases. *In*: POLAINA, Julio; MACCABE, Andrew P. (Orgs.). **Industrial Enzymes**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 477–488.

NESTL, Bettina M.; HAUER, Bernhard. Engineering of Flexible Loops in Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 9, p. 3201–3211, 5 set. 2014.

NEWELL, Peter D. *et al.* A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST. **Journal of Microbiology & Biology Education**, v. 14, n. 2, p. 238–243, jan. 2013.

NGUYEN, Trang Vu Thien *et al.* Lignin Peroxidase-Catalyzed Selective Cleavage of C–C Bonds in Lignin at Room Temperature. **ACS Catalysis**, v. 14, n. 15, p. 11733–11740, 2 ago. 2024.

OLIVEIRA, Nuno F. B.; PIRES, Inês D. S.; MACHUQUEIRO, Miguel. Improved GROMOS 54A7 Charge Sets for Phosphorylated Tyr, Ser, and Thr to Deal with pH-Dependent Binding Phenomena. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 16, n. 10, p. 6368–6376, 13 out. 2020.

PARAMJEET, Saroj; MANASA, P.; KORRAPATI, Narasimhulu. Biofuels: Production of fungal-mediated ligninolytic enzymes and the modes of bioprocesses utilizing agro-based residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 57–71, abr. 2018.

PASSAMANI, Fabiana. **Planejamento por modelagem e dinâmica molecular de filtros solares seguros**. Vitória, ES: Universidade Federal do Espírito Santo, 2023.

PHAM, Le Thanh Mai *et al.* Experimental and theoretical insights into the effects of pH on catalysis of bond-cleavage by the lignin peroxidase isozyme H8 from *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 108, dez. 2021.

PIONTEK, K.; SMITH, A. T.; BLODIG, W. Lignin peroxidase structure and function. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, n. 2, p. 111–116, 1 maio 2001.

POLLEGIONI, Loredano; TONIN, Fabio; ROSINI, Elena. Lignin-degrading enzymes. **The FEBS Journal**, v. 282, n. 7, p. 1190–1213, abr. 2015.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 95–99, jul. 1963.

RECABARREN, Rodrigo; FUENZALIDA-VALDIVIA, Isabel; ALZATE-MORALES, Jans. Studying the binding mechanisms of veratryl alcohol to *P. chrysosporium* lignin peroxidase: insights from theoretical approaches. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 135, n. 3, p. 71, mar. 2016.

RILEY, Robert *et al.* Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, p. 9923–9928, 8 jul. 2014.

SCHRÖDINGER. **The PyMOL Molecular Graphics System**. [S.l.]: Schrödinger, LLC, 2009.

SNEHA, P.; GEORGE PRIYA DOSS, C. Molecular Dynamics. *In: Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. [S.l.]: Elsevier, 2016. v. 102 p. 181–224.

STROET, Martin *et al.* Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 14, n. 11, p. 5834–5845, 13 nov. 2018.

TOMÉ, Luiz Marcelo Ribeiro *et al.* Hybrid Assembly Improves Genome Quality and Completeness of *Trametes villosa* CCMB561 and Reveals a Huge Potential for Lignocellulose Breakdown. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 142, 30 jan. 2022.

TURCANO, Lorenzo *et al.* Spiro-containing derivatives show antiparasitic activity against *Trypanosoma brucei* through inhibition of the trypanothione reductase enzyme. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. e0008339, 21 maio 2020.

VAN DER SPOEL, David *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, dez. 2005.

VANDANA, Thammaiah *et al.* Purification, characterization, and biodelignification potential of lignin peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **BioResources**, v. 14, n. 3, p. 5380–5399, 22 maio 2019.

WATERHOUSE, Andrew *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WELTI, Stéphane *et al.* Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera, and description of a new genus *Leiotrametes*. **Fungal Diversity**, v. 55, n. 1, p. 47–64, jul. 2012.

WONG, Dominic W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174–209, maio 2009.

Anexo

Tabela 1: Sequências do genoma do fungo *T.villosa* de lignina peroxidase alinhadas pelo Blastp, para identificação

Seq.	Código de acesso da sequência de alinhamento	Tipo de peroxidase	Organismo	Valor de identidade %	E-value	Similaridade %	Query cover %
1	XP_008044196.1	prepropeptide lignin peroxidase	<i>Trametes versicolor</i>	85,88	0.0	88	100
8	<u>KAI0358486.1</u>	prepropeptide lignin peroxidase	<i>Trametes cingulata</i>	96,49%	2e-115	99	100
9	<u>KAI0356396.1</u>	prepropeptide lignin peroxidase	<i>Trametes cingulata</i>	85,71	0.0	89	100
10	<u>KAI0356396.1</u>	prepropeptide lignin peroxidase	<i>Trametes cingulata</i>	85,71	0.0	89	100
11	XP_008043623.1	Prepropeptide lignin peroxidase	<i>Trametes versicolor</i>	85,59	0.0	88	100
14	XP_008033881.1	lignin peroxidase isozyme	<i>Trametes versicolor</i>	97.37%	8e-129	98	100
31	<u>XP_008033880.1</u>	lignin peroxidase isozyme	<i>Trametes versicolor</i>	87.67%	0.0	90	100
32	XP_008033881.1	lignin peroxidase isozyme	<i>Trametes versicolor</i>	84.69%	2e-112	89	100
35	XP_008043778.1	lignin peroxidase VLG1 precursor white-rot fungus	<i>Trametes versicolor</i>	88.04%	0.0	91	100
37	<u>XP_008043623.1</u>	Prepropeptide lignin peroxidase	<i>Trametes versicolor</i>	83.77%	0.0	86	100

➤ **Peroxidase 1**

MAFKSLLSIVSIXXXXXXXXXXXXXRRVACPDGKNTATNAACCQLFAVREDLQQNLFHGGLCTAEAHESL
RLTFHDGIAISPALEAQXXXXXXXXXXXXXISIFPEIETAFHPNIGLDEIVALQKPFQARHNLSHADFLHFXXXX
XXXXXXXXXPQLAAFIGRKDATQPAPDGLVPEPFHTPDQIFDRLADASEGEFDPILTVWLLTAHTVAAAND
VDPTKNGLPFDSTPELWDTQFFVETQLRGTLFPGKGGNQGEVESPLAGEIRLQSDHTIARDPRTACEW
QSFVDNQPKAQMFQFVFQVLTTLGQNQDDLIDCTEVVPIAAPQGRTHLPAGMTHNDIEQACAETPF
PTLPID

➤ **Peroxidase 8**

ETAFHPNVGLDEIVALQKPFARHNISHADFIQFAGAIGASNCAGAPQLAAVGRKDATQPAPDGLVPEP
FHTPDQIFDRIADASQGEFDPILTVWLLTAHTVAAANDIDPAHSGLPFDSTPELWDTQFFLETQLRGTSF
PGTGGNQGEVESPLAGEMRLQSDHTIARDSR

➤ **Peroxidase 9**

MAFKXXXXXXXXXXXXXQGASAAALTRRVACPDGKNTATNAACCQLFAIRDDIQTNLFHGAQCGENAHES
LRITFHDAISFSPXXXXXXXXXXXXXXXXXIFPEIETAFHANIGLDEIVAEQKPLIARHNISHADFIMFAGAL
GASNCPGAPRLDFFLGRKDATRPAPNGLVPEPFDLTEDVFARLADASSGEFDEILTVWLLTAHTIAASD
HLDETIPGTPMDSTPHVWDTQFFIETQLRGTAFFPGKGGNHGEVMSPLKGEIRLQTDHLLARDSRTACE
WQSFVNNQKKAQDMFAFVFHDL SMLGQDPDSLIDCSELIPQAPVTTKAHFPAGLTNKDIEQACADTPF
PTLPTEPGPKTTVAPV

➤ **Peroxidase 10**

MAFKXXXXXXXXXXXXXQGASAAALTRRVACPDGKNTATNAACCQLFAIRDDIQTNLFHGAQCGENAHES
LRITFHDAISFSPXXXXXXXXXXXXXXXXXIFPEIETAFHANIGLDEIVAEQKPLIARHNISHADFIMFAGAL
GASNCPGAPRLDFFLGRKDATRPAPNGLVPEPFDLTEDVFARLADASSGEFDEILTVWLLTAHTIAASD
HLDETIPGTPMDSTPHVWDTQFFIETQLRGTAFFPGKGGNHGEVMSPLKGEIRLQTDHLLARDSRTACE
WQSFVNNQKKAQDMFAFVFHDL SMLGQDPDSLIDCSELIPQAPVTTKAHFPAGLTNKDIEQACADTPF
PTLPTEPGPKTTVAPV

➤ **Peroxidase 11**

MAFKSLLSIVSIXXXXXXXXXXXXXRRVACPDGKNTATNAACCQLFAVREDLQQNLFHGGLCTAEAHESL
RLTFHDGIAISPALEAQXXXXXXXXXXXXXISIFPEIETAFHPNIGLDEIVALQKPFQARHNLSHADFLHFXXXX
XXXXXXXXXPQLAAFIGRKDATQPAPDGLVPEPFHTPDQIFDRLADASEGEFDPILTVWLLTAHTVAAAND
VDPTKNGLPFDSTPEIWDQFFVETQLRGTLFPGKGGNQGEVESPLAGEMRLQSDHTIARDSRTACEW
QSFVDNQPKAQMFQFVFQVLTTLGQNQDDLIDCTEVVPIAAPQGRTHLPAGMTHNDIEQACAETPF
PTLPID

➤ **Peroxidase 14**

FHTPDQIFARLADASQGEFDEILTVWLLVAHTVAAANDVDPTVPGSPFDSTPEVWDTQFFVEVLLNGTT
FPGTGNNQGEVASPIQGEFRLQSDFAIARDSRSACEWQSFVDNQPKAQAMFQFVFHDL SMLGQDINSL
VDCTEVVPVAPLQGVTHFPAGLTVDIEQPCVETPFPTLPDGPATSVAPV

➤ **Peroxidase 31**

MAFKXXXXXXXXXXXXXQGVNAA-
LNRRVACPDGVHTASNEACCQLFAIRDDLQKNLFDGGQCNAEAHESLRLTFHDAIAISPALEAQXXXXX
XXXXXXXXXXHIETAFHPNIGLDEVVEKQRPFIERHNLGVADFIQFAGALGASNCPGAPQLSAFVGRKD
ATQPAPDGLVPEPFHTPD MIFDRLADASQGEFDPILTVWLLTAHTVAAANDVDPTIPGSPFDSTPGQFD
SQFFLETQLKGTLPFGDGPNGKEVESPLHGEFRLQSDFAIARDERTACEWQSFVNNQTKVQQMFFQFV
FHDLSLFGQNIDDLVDCTEVIPIPKPLRQATHFPAGFTVRDIEHTCAETPFPTLPDGPKTSVAPV

➤ **Peroxidase 32**

MAFRTLLSIVSLAAALQGTSAALTRRVSCPDGVNTATNAACCQLFAVREDLQQNLFHGGLCTAEAHESL
RLTFHDAIAISPALEAQXXXXXXXXXXXXXPEIETNFHPNIGLDEIVQLQKPFVARHNLSVADFIQFAGA
IGASNCAGAPQLSAFVGRIDATQPAPDGLVPEPFHTPDQIFARLADASQGEFDEI

➤ **Peroxidase 35**

EAHESLRLTFHDAIAISPALEAQXXXXXXXXXXXXXHIETAFHPNIGLDEVVEKQRPFLQRHNIGVAD
FIQFAGALGASNCAGAPQLSAFVGRKDATRPAPDGLVPEPFHTPDQIFARLADASQGEFDEILTVWLLT
AHTIAAANDVDPTLVGAPFDSTPELFD SQFFLETQLKGTLPFGDGPNGKEVLSPLRGEFRLQSDFAIARD
PRSACEWQSFVNNQTKVQQMFFQFVFHDL SMLGQNIDDLVDCTEVIPIPKPLRTRTHFPAGLTNRDIEQAC
AETPFPTLPDGPKTGVAPV

➤ **Peroxidase 37**

MAFKXXXXXXXXXXXXXGTNAALTRRVACPDGVNTATNAACCQLFAVREDLQQNLFHGGLCTAEAHES
LRLTFHDGIAISPAMEAQXXXXXXXXXXXXXISIFPEIETAFHPNIGLDEIVALQKPFQARHNLSHADFLHFXX
XXXXXXXXXPQLAAVGRVDATQPAPDGLVPEPFHTPDQIFDRVADASQGEFDPILTVWLLTAHTVAA
ANDVDPTKSGLPFDSTPELWDTQFFLETQLRGTAFFPGSGGNQGEVESPLAGEMRLQSDHTIARDSRTA
CEWQSFVDNQPKAQMFQFVFQVLTTLGQNQDDLVDCTEVVPIAAPQGHTHFPAGLTVDIEQACAE

Figura 1: Sequência Fasta de Lignina peroxidase de *T. villosa* de acordo com o Gofeat, que após passada pelo servidor Bacello foram definidas como secretadas. Em todas as sequências aparecem regiões com alguns “x”, são fragmentos que possuem baixa qualidade ou incerteza dos resíduos de aminoácidos presentes.

CAPÍTULO II

Produção recombinante e caracterização bioquímica de uma lignina peroxidase de *Trametes villosa*

Edjane Bastos Ferreira¹; Cleidineia Souza de Santana¹; Thaise Rosa da Silva¹; Monalisa Macêdo Ferreira²; Keilane Silva Farias²; Hélio Mitoshi Kamida¹; Carlos Priminho Pirovani²; Sandra Aparecida de Assis³; Gildomar Lima Valasques Júnior⁴; Humberto Fonseca de Freitas³; Raquel Guimarães Benevides^{5*}.

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil;

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil;

³Departamento de Saúde; Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil;

⁴Departamento de Química e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié, Bahia, Brasil.

⁵Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

*autor de correspondência

Resumo

A lignina peroxidase é uma enzima estudada pelo potencial de seu uso em aplicações industriais, algumas das aplicações incluem a deslignificação de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de bioetanol. A obtenção dessa enzima através de fungos é uma alternativa de menor impacto ambiental para obtenção dessa fonte de energia renovável. O objetivo desse trabalho foi produzir e caracterizar uma lignina peroxidase recombinante do fungo *Trametes villosa* em células de *Escherichia coli*. Para tal finalidade, uma sequência de lignina peroxidase de *T. villosa* denominada LiP1820, foi clonada nos vetores pET28a e pET32a com códons otimizados para expressão em *E. coli*. A LiP1820 recombinante foi expressa em diferentes condições de temperatura e concentração de IPTG em cepas de *E. coli* BL21(DE3) pLysS e Rosetta TM (DE3) nos meios LB e TB e purificada usando coluna de níquel. Apenas a enzima recombinante da construção em pET32a expressa na cepa Rosetta TM (DE3) usando os meios LB e TB foi purificada com sucesso, apresentando massa molecular de 54 kDa em SDS-PAGE. A enzima recombinante crescida em meio TB (rLiP1820), após adição de EDTA, DTT e Triton x -100 na lise e *refolding* com CaCl₂, hemina e glutatona oxidada,

apresentou atividade enzimática usando o substrato álcool veratrílico, com atividade máxima em pH 4,0 e 6,0 e 50°C. O uso dessa enzima para aplicações industriais é recomendável. Esse é o primeiro registro de produção recombinante de lignina peroxidase de *T. villosa* em células de *E.coli*.

Palavras-chave: Fungo, lignase, decomposição branca, produção heteróloga, *E.coli*.

Abstract

Lignin peroxidase is an enzyme studied for its potential use in industrial applications, some of which include the delignification of sugarcane bagasse for the production of bioethanol. Obtaining this enzyme from fungi is an alternative with lower environmental impact for obtaining this renewable energy source. The objective of this work was to produce and characterize a recombinant lignin peroxidase from the fungus *Trametes villosa* in *Escherichia coli* cells. For this purpose, a lignin peroxidase sequence from *T. villosa* called LiP1820, was cloned into the pET28a and pET32a vectors with codons optimized for expression in *E. coli*. Recombinant LiP1820 was expressed under different temperature conditions and IPTG concentrations in *E. coli* BL21(DE3) pLysS and Rosetta TM (DE3) strains in LB and TB media and purified using a nickel column. Only the recombinant enzyme from the pET32a construct expressed in the Rosetta TM (DE3) strain using LB and TB media was successfully purified, presenting a molecular mass of 54 kDa in SDS-PAGE. The recombinant enzyme grown in TB medium (rLiP1820), after addition of EDTA, DTT and Triton x -100 in lysis and *refolding* with CaCl₂, hemin and oxidized glutathione, showed enzymatic activity using the substrate veratryl alcohol, with maximum activity at pH 4.0 and 6.0 and 50°C. The use of this enzyme for industrial applications is recommended. This is the first record of recombinant production of lignin peroxidase from *T. villosa* in *E.coli* cells.

Keywords: Fungus, lignase, white decay, heterologous production, *E.coli*.

1- Introdução

As guerras entre países fornecedores de petróleo, a instabilidade dos preços dos combustíveis fósseis, assim como a busca por reduzir as emissões de gases de efeito estufa e a grande vulnerabilidade econômica causam grande dependência de importações dessas fontes de energia (Hille, 2023; Igeland et al., 2024). Consequentemente tem se pensado em alternativas de energia renovável que proporcione uma maior segurança energética, e que tenha um menor impacto ambiental (Ridelensky, 2021; Adeyinka et al., 2024; Igeland et al., 2024; Giedraityte et al., 2025).

As principais fontes de energia renovável são a eólica, solar, hidroelétrica, geotérmica e biomassa. Todas elas possuem uma dependência climática, exceto a energia de biomassa. Segundo Sherwood (2020), biomassa é um termo geral aplicável a todos os materiais derivados de plantas e animais; os de origem vegetal, são utilizados para fazer alimentos e ração animal assim como para fornecimento de energia renovável.

Em 2023 o Brasil produziu 712,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, para a produção principalmente de açúcar e etanol (“Brazilian Energy Balance. Balanço Energético Nacional”, MAPA, 2024), gerando toneladas de biomassa que não são totalmente utilizados pela indústria. Esse enorme volume de resíduos normalmente é queimado ou acumulados em aterros sanitários, gerando um grande impacto ambiental (Erdocia et al., 2021; Dos Santos, 2023; Barciela et al., 2023).

Como uma fonte alternativa de energia, a biomassa de cana de açúcar é composta por celulose, hemicelulose e lignina que seria descartada no meio ambiente, pode ser utilizada para a produção de etanol de segunda geração (Sherwood, 2020; Erdocia et al., 2021). A produção de etanol de segunda geração evita que a biomassa seja descartada de forma incorreta e possibilite a produção de bioetanol que é menos agressivo ao meio ambiente em comparação ao combustível fóssil, gerando mais lucro sem necessitar de mais área de cultivo de cana de açúcar (Barciela et al., 2023).

Para a produção de bioetanol a partir de biomassa pode-se usar diversas técnicas, dentre elas métodos químicos e físicos, que geram subprodutos tóxicos ao meio ambiente e apresentam algumas limitações

principalmente para degradação da lignina (Biko; Viljoen-Bloom; Van Zyl, 2020). Uma alternativa que gera menos impacto é o uso de microrganismos que possuem a capacidade de produzir enzimas lignolíticas extracelulares, como a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e Lacase (La).

O fungo *Trametes villosa* é um basidiomiceto de degradação branca, promissor para a produção de enzima lignolíticas, principalmente a lignina peroxidase, uma enzima capaz de degradar a lignina (Carneiro et al., 2017). Ferreira et al. (2018) sequenciaram o genoma desse fungo - acesso no Genbank:PUDQ000000000 -, em seguida o genoma foi montado por Tomé et al. (2022) - acesso no Genbank GCA_002964805.2 -, essas informações disponibilizadas em base de dados, permitiu estudos prévios de uma sequência de Lignina peroxidase, denominada LiP1820 (Capítulo I), sendo a primeira enzima deste fungo a ser estudada, tendo um grande potencial para aplicação em resíduos agroindustriais.

Nesse contexto, a obtenção e caracterização de uma lignina peroxidase recombinante de *T. villosa* a partir de células de *Escherichia coli* possibilitará a produção dessa enzima em escala industrial, o que permitirá ter inúmeras aplicações desde a deslignificação do bagaço proveniente da cana de açúcar em segmentos da industrial têxtil, assim como na melhora da digestibilidade da fibra bruta para alimentação animal.

2 Materiais e métodos

2.1 Síntese do gene sintético de uma lignina peroxidase de *Trametes villosa*

A sequência de resíduos de aminoácidos de LiP1820 para expressão foi codon otimizada pela Genome visando maximizar a expressão heteróloga em *Escherichia coli*. O gene sintético resultante foi sintetizado e clonado no vetor de expressão pET-28a (+) entre os sítios de restrição *Bam*HI e *Nde*I. Essa construção, denominada pET28a_LiP1820.

Uma segunda construção foi proposta pelas dificuldades encontradas na primeira construção, onde a mesma sequência de nucleotídeos de LiP1820 foi sintetizada em pET32a (+) entre os sítios de restrição de *Nco*I e *Xho*I, produzido pela FastBio. Essa construção, denominada pET32a_LiP1820, possui otimização para códons de bactéria.

2.2 Preparação de células quimiocompetentes

Para preparação das células quimiocompetentes para inserção dos genes pET28a_LiP1820 e pET32a_LiP1820, foi realizada a preparação das cepas de *E. coli* (BL21(DE3) pLysS) e (Rosetta TM (DE3)) em 5 mL de Meio (L.B) Luria- Bertani (Tryptona a 1%; Extrato de levedura a 0,5%; NaCl a 1%), por 16 horas a 180 rpm e 37°C. Em seguida as cepas foram centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rpm. Logo após foram eliminados os sobrenadantes e ressuspensado o pellet em 100 mL de L.B. e incubadas a 37 °C até atingir a densidade ótima de 0,6 medida no espectrofotômetro (600 nm).

Em seguida, as células foram incubadas no gelo por 10 minutos e centrifugadas a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensado em 10 mL de Cloreto de magnésio a 100 m/L. Foi realizada uma segunda centrifugação na mesma condição anterior, onde foi descartado o sobrenadante e o *pellet* ressuspensado em 25 mL de Cloreto de cálcio a 100 mM/L. Uma terceira centrifugação foi necessária onde removeu o sobrenadante e o pellet foi ressuspensado em 5 mL de Cloreto de cálcio e glicerol 15%, em seguida as células foram armazenadas a -80°C.

2.3 Transformação

Foram realizadas três transformações sendo uma do gene pET28a_LiP1820 nas células Rosetta TM (DE3) e duas do gene pET32a_LiP1820 nas células BL21(DE3) pLysS e em Rosetta TM (DE3).

2.3.1 Transformação do gene pET28a_LiP1820 e pET32a_LiP1820 nas células competentes

Foram utilizados 50 µl das células quimiocompetentes BL21(DE3) pLysS ou Rosetta TM (DE3) e 1 µl dos genes pET28a_LiP1820 ou pET32a_LiP1820 na concentração de 1/20. Após a homogeneização, a cultura foi incubada por 30 minutos em banho de gelo. Logo após as células foram submetidas ao choque de temperatura a 42°C por 2 minutos.

Após a transformação foi adicionado 1000 µl de meio Luria-Bertani a cultura, em seguida as células foram incubadas a 37°C por 1 hora. Logo após as culturas centrifugadas por 1 minuto a 5000 rpm, 800 µl do sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspensado com os 200 µl de meio restante.

Subsequentemente as células foram inoculadas em placas de Petri com meio Luria-Bertani com Kanamicina a 50 mg/mL e Clorafenicol a 34 mg/mL para a LiP pET28a_LiP1820 e Ampicilina a 50 mg/mL e Clorafenicol a 34 mg/mL para pET32a_LiP1820. As placas foram incubadas a 37°C de forma invertida *overnight*.

2.4 Teste de expressão e solubilidade

As colônias crescidas tanto da construção pET28a_LiP1820 quanto da pET32a_LiP1820 foram removidas com o auxílio de uma ponteira e incubadas por 16 horas a 37°C com agitação de 180 rpm em tubos falcon com 5 mL de meio Luria-Bertani com Kanamicina a 50 mg/mL e Clorafenicol a 34 mg/mL para LiP pET28a_LiP1820 e Ampicilina a 50 mg/mL e Clorafenicol a 34 mg/mL para pET32a_LiP1820. Em seguida as células foram armazenadas em glicerol a 15% a -80°C e removidas alíquotas para as expressões. Foram realizados testes de expressão em meios LB e TB.

2.4.1 Teste de expressão e solubilidade em pequena escala com meio Luria-Bertani

Alíquotas dos dois clones pET28a_LiP1820 e do pET32a_LiP1820, foram crescidas separadamente em 5 mL de meio líquido LB por 16 horas, em seguida os meios foram centrifugados a 5000 rpm por 10 min a 4°C, o *pellet* gerado foi ressuspenso em 50 mL de meio LB acrescida com o respectivo antibiótico para cada pET onde foram incubadas a 37°C com agitação de 180 rpm até atingir a OD₆₀₀ entre 0,5-0,7 η m, medida em espectrofotômetro. Posteriormente foi adicionado IPTG (isopropil- β -D – tiogalactopiranosídeo) à cultura para indução da expressão. Foi realizado um teste de diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5 e 1,0 mM) e duas temperaturas diferentes (18 e 37°C) e tempos de indução (4, 16 h). Para cada grupo de amostragem possuía um controle sem adição do indutor o IPTG, apenas para o pET28a apresentava um segundo controle.

Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm, e preparadas para o gel de SDS-PAGE. Conforme sessão 2.4.5.

2.4.2 Expressão, *refold* e purificação em grande escala para meio LB.

O procedimento foi descrito em menor escala na seção anterior mantendo as proporções para cada etapa. Apenas a temperatura de indução foi de 37°C por 4 horas e a concentração do IPTG (0,8 mM). Após atingir o período, a cultura foi centrifugada a 3000 rpm por 30 min, o *pellet* gerado de 200 mL de cultura foi purificado e confirmado por SDS-Page a 12%.

Para purificação, o *pellet* da indução foi ressuspenso em 10 mL de tampão de lise (4M NaCl, 160 mM Tris – HCl, Imidazol 40 mM) com Lisozima a 100 µg/ml e mantidas por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram sonicadas com processador ultrassônico (Pgex 130) com sonda de 6 mm de diâmetro com 10 pulsos on, 30 off com amplitude de 70% por 30 minutos. Após a lise o produto gerado foi centrifugado por 40 min a 5.500 rpm a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado o *pellet* gerado foi então submetido a diversas lavagens com o tampão de lise com lisozima nas mesmas concentrações citadas anteriormente, e submetido ao ultrassônico após cada lavagem. Após três lavagens o *pellet* foi ressuspendido em tampão de lise com lisozima e ureia 6 M, contendo 5% de glicerol. Após a lise com o ultrassonicador, o material foi centrifugado por 40 min a 5.500 rpm a 4°C e o sobrenadante gerado foi submetido a purificação por cromatografia de afinidade utilizando a coluna de níquel His Trap HP (GeHealthcare) que foi previamente preparada como manda as especificações do fabricante. O sobrenadante foi passado pela coluna e a proteína recombinante que possui uma calda de histidina foi eluída de acordo com o aumento da concentração de imidazol (50 a 500 mM do eluente). Em seguida a proteína purificada foi submetida a uma diálise gradual para remoção da ureia e reenovelamento da proteína.

Em seguida as amostras foram avaliadas em um gel de SDS-PAGE. E preparadas com tampão de amostra. Conforme sessão 2.4.5.

2.4.3 Teste de expressão e solubilidade em pequena escala com meio Terrific both

Alíquota do clone pET32a_LiP1820, foram crescidas em 5 mL de meio líquido LB por 16 horas em seguida os meios foram centrifugados a 5000 rpm por 10 min a 4°C, o *pellet* gerado foi ressuspensionado em 50 mL de meio (T.B) Terrific Broth (Extrato de levedura 24mg/mL; Triptona 12mg/mL; Glicerol 8mg/mL; K₂H₂PO₄ 9,4mg/mL; KH₂PO₄ 2,2mg/mL) com Ampicilina a 50 mg/mL e Clorafenicol a 34 mg/mL onde foram incubadas a 37°C com agitação de 180 rpm até atingir OD₆₀₀ entre 0,5-0,7 η m medida em espectrofotômetro. Posteriormente foi adicionado IPTG (isopropil- β -D – tiogalactopiranosídeo) a cultura para indução da expressão. Foi realizada um teste de diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5; 1,0 mM), temperaturas (18, 25 e 37 °C) e tempos de indução (4, 16, 24 e 48 h). Para cada grupo de amostragem possuía um controle sem adição do indutor o IPTG.

Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm, e preparadas para o gel de SDS-PAGE como a de solubilidade e expressão do teste em LB. Conforme sessão 2.4.5.

2.4.4 Expressão *refold* e purificação em grande escala para meio TB.

O procedimento de expressão foi descrito em menor escala na seção anterior mantendo as proporções para cada etapa. Apenas a temperatura de indução foi de 37°C por 4 horas e a concentração do IPTG (1,0 mM). Após atingir o período, a cultura foi centrifugada a 3000 rpm por 30 min, o *pellet* gerado de 200 mL de cultura e uma alíquota de 2 ml foi utilizada para confirmação por SDS-Page a 14%.

Para purificação, o *pellet* foi ressuspensionado em 400 μ L de tampão de lise A (50 mM de Tris-HCL pH 7,5; 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 5 mM ditioneitol (DTT) e 1% v/v de Triton x-100 e 0,1 mg/mL de Lisozima. Posteriormente as amostras foram sonicadas com processador ultrassônico (Pgex 130) com (6 pulsos on, 20 off com amplitude de 70%) durante 10 minutos. A amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi armazenado para uso da fração solúvel e o *pellet* gerado foi utilizado para obtenção da fração insolúvel.

Para obter a fração insolúvel o *pellet* foi lavada mais 3x com o tampão de lise A. Em seguida foi incubada com o Tampão de lise A acrescida de ureia a 7 M por 1 hora em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante colocado para dialise para redução gradual da ureia até 1,5 M e adição do grupo heme. O tampão era composto de Tris-HCl 50 mM, 10 mM de CaCl_2 , 0,7 mM de Glutathione oxidada e 30 mM de Cloreto de Hemina (em NaOH 0,1 N). Foram realizadas 4 trocas com intervalo de 3 horas para cada troca.

Em seguida a proteína re enovelada foi submetida a purificação por cromatografia de afinidade utilizando a coluna de níquel His Trap HP (GEHealthcare) que foi previamente preparada como manda as especificações do fabricante. O sobrenadante foi passado pela coluna e a proteína recombinante que possui uma calda de histidina foi eluída de acordo com o aumento da concentração de imidazol (50 a 500 mM do eluente).

Para a fração solúvel a mesma foi purificada utilizando os mesmos parâmetros da fração insolúvel

Em seguida as amostras foram avaliadas em um gel de SDS-PAGE. preparadas com tampão de amostra. Conforme sessão 2.4.5.

2.4.5 SDS-PAGE

Para visualização em gel, as amostras de cada procedimento foram preparadas com Tampão de amostra 5x (250 mM de TRIS-HCl, 30% de Glicerol, 9,2% de SDS, 1% de Azul de Bromofenol e 20% de Betamercaptoetanol) correspondente a 20%do volume. Posteriormente foram desnaturadas junto com o marcador Low Molecular 27 Weight Marker de 14-97 kDa (GE Healthcare) a uma temperatura de 95 °C durante 8 min aproximadamente e depositadas nos poços do SDS-PAGE 12,5 %.

O gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato Sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) a 12,5% é composto por (3,8 mL de H_2O ultrapura; 2,5 mL de Tampão de baixo (0,454 g de Tris-HCl 1500 mM , pH 8,8; 0,01 g de SDS e 2,5 mL de H_2O ultrapura); 0,019 g de acrilamida; 0,0006 g de bis acrilamida), sobreposto com o gel de empilhamento (3,3 mL de H_2O ultrapura; 1 mL de Tampão de cima (0,060 g de Tris-HCl a 500 mM , pH 6,8; 0,004 de SDS).

Após a corrida, o gel foi colocado em tampão de fixação (40 % etanol, 10 % Ácido acético) durante 20 min e corado durante 1 dia em 0,08 % de *Coomassie coloidal G-250* (NEUHOFF et al., 1988). Em seguida fotografados manualmente.

2.5 Determinação da concentração da proteína por coeficiente de extinção

Para quantificação da proteína recombinante após *refold* (rLiP1820) foi utilizada a medida de absorbância de 280 nm. Com o coeficiente de extinção da proteína fusionada, preditas através do servidor online ProtParam, foi aplicada a formula da Lei de Lambert-Beer (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

2.6 Cultivo do fungo *T. villosa* e obtenção do extrato enzimático

Para realização de um controle positivo enzimático, foi realizado o cultivo do fungo *Trametes villosa* (CCMB561) em meio ABSAG (8 g de de agar-agar tipo1, 8 g de bagaço de cana moído, 1 g de sulfato de amônio, 1 g de glicose, 400 mL de água).

Após sete dias de crescimento a 27°C foi realizada a obtenção do extrato fúngico, onde se removeu o fungo da placa e colocou em 35 mL de água destilada estéril, deixando por 2 horas em banho de gelo e agitando manualmente a cada 20 minutos. Em seguida o meio foi filtrado em filtro de papel em seguida a amostra foi centrifugada. Para o controle negativo o extrato foi aquecido a 90°C por 30 min.

2.7 Dosagem de proteínas por Bradford

O teor de proteína total das amostras obtidas nos experimentos de da proteína recombinante (rLiP1820) quanto da extrato enzimático foram determinados pelo método de Bradford (1964). Este consiste na reação de 100 µL do extrato bruto enzimático ou rLiP1820 com 5 mL do reagente de Bradford por 5 minutos e posterior leitura a 595 nm em espectrofotômetro.

Os resultados foram comparados com uma curva padrão tendo como base a concentração previamente conhecida de albumina sérica bovina (BSA).

2.8 Teste de atividade enzimática da lignina peroxidase

Após o re-enovelamento da proteína foi realizada a atividade da rLiP1820 assim como do extrato fúngico, pela oxidação de álcool veratrílico na presença de peróxido de hidrogênio, conforme Tien & Kirk (1988). A reação foi composta de 180 µL da proteína (0,09 mg/mL), 60 µL (2 mM) de Tampão tartarato de sódio (0,4 M; pH 3,0) e 60 µL de peróxido de hidrogênio (2 mM). Foi realizado o acompanhamento da formação do aldeído veratrílico pela leitura de absorbância a 310 nm em espectrofotômetro por 5 minutos, com registros de leitura a cada 10 segundos.

Foi realizado um controle negativo da atividade em que a proteína foi aquecida a 90°C por 30 min. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

Os resultados da atividade das LiPs (rLiP1820 e LiP extrato fúngico proveniente do passo 2.5 e 2.6), expressos em U.g⁻¹ (unidades de atividade por grama), foram obtidos pela resolução da equação descrita abaixo:

$$\frac{\Delta (Abs) \times 10^6}{\epsilon \times R \times t}$$

Onde:

Abs - é a diferença entre a absorbância dos extratos fervido e não fervido (branco e teste) nos tempos 0 e 5 minutos;

ε - é o absorbtividade molar (Lmol⁻¹cm⁻¹): (L): rLiP1820 = 9300;

R - é volume em µL da alíquota de extrato bruto centrifugado;

t - é o tempo em minutos da reação.

A atividade específica foi determinada pelo quociente da atividade enzimática pelo teor de proteína total do extrato. O experimento foi realizado em triplicada.

2.9 Detecção de atividade da rLiP1820 em diferentes pH e temperaturas

Foi realizado um teste de atividade para avaliar o efeito do pH e da temperatura da enzima rLiP1820 utilizando um planejamento experimental

Doehlert para duas variáveis. O pH foi estudado em 5 níveis (3 a 7, ponto central 4), utilizando o tampão tartarato (pH 3 e 4), tampão citrato-fosfato (pH 5 e 6) e tampão fosfato (pH 7) conforme tabela 1. A temperatura foi estudada em 3 níveis (50 e 90°C ponto central 70°C) por 20 min. Os resultados obtidos das atividades da enzima foram comparados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste F, utilizando o software Statistic 7.0. Em seguida as análises das médias e desvios-padrão foram realizadas no Prism 5.0 e no Microsoft Office Excel.

Tabela 1: Matriz de Doehlert determinando as condições de pH e temperatura da rLiP1820 recombinante.

Amostra	pH	Temperatura
1	4	90
2	6	90
3	3	70
4C	5	70
4C	5	70
4C	5	70
5	7	70
6	4	50
7	6	50

3 Resultados e discussão

3.1 Seleção das colônias por meio da transformação em cepas de *E. coli*

O processo de clonagem e expressão são conhecidas como boa alternativa de produção de proteínas. O sistema bacteriano é amplamente utilizado por apresentar baixo custo de produção e eficiência no processo de transformação de proteínas recombinantes (Sandomenico; Sivaccumar; Ruvo, 2020; Incir; Kaplan, 2024). Na Figura 1 observamos os transformados por choque térmico em (A) cepa Rosetta TM (DE3) com o gene pET28a_LiP1820; (B1) cepa BL21(DE3) pLysS com o gene pET32a_LiP1820, (B2) cepa Rosetta TM (DE3) com o gene LiP1810-pET32a com incubação de 16 horas a 37°C.

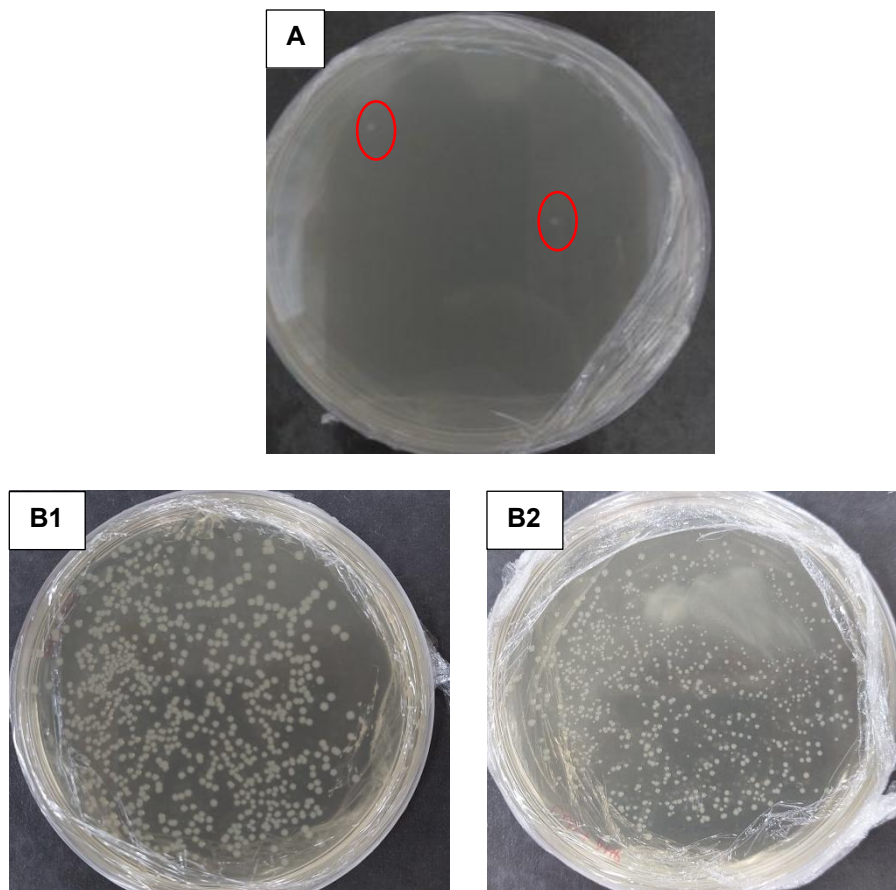


Figura 1: Transformação utilizando a técnica de choque térmico. (A) Transformação da cepa Rosetta TM (DE3) com o gene pET28a_LiP1820; (B1) Transformação da cepa BL21(DE3) pLysS com o gene pET32a_LiP1820, (B2) Transformação da cepa Rosetta TM (DE3) com o gene LiP1810-pET32a.

Segundo Chang et al. (2017) células transformadas com sucesso possuem um marcador de seleção de resistência a antibiótico, assim o crescimento celular é condicionado a presença do antibiótico. Os plasmídeos também possuem um marcador de resistência a antibiótico (Yang et al., 2022; Calvete; Caseiro; De Souza, 2015). Dessa forma, colônias crescidas na placa mostra sucesso na transformação, indicando que o gene plasmidial foi incorporado a célula, já que o meio possuía os antibióticos correspondente a cada plasmídeo e célula. Assim foi possível prosseguir com todas as condições testadas para as etapas de expressão.

3.2 Expressão e purificação da proteína recombinante a partir dos genes pET28a_LiP1820 e pET32a_LiP1820 em meio LB

Após expressão, os extratos proteicos da colônia *E. coli* Rosetta TM (DE3) transformada com pET28a_LiP1820, quando analisados em gel de

SDS-PAGE, revelaram uma banda de aproximadamente 36 kDa, compatível com o peso molecular predito para a proteína recombinante da construção pET28a_LiP1820 (Figura 2). A proteína se acumulou predominantemente na fração insolúvel na indução a 37°C por 4 horas com 1 mM de IPTG.

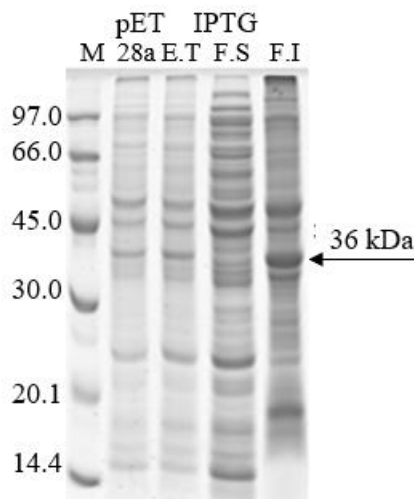


Figura 2: Análise em SDS PAGE 12,5% do teste de expressão heteróloga do pET28a_LiP1820 em cepa de *E. coli* Rosetta TM (DE3). Marcador (M); pET28a vazio, Extrato total com IPTG (E.T); fração solúvel (F.S) e fração insolúvel (F.I).

Para os extratos proteicos das colônias de BL21(DE3) pLysS e Rosetta TM (DE3) transformadas com pET32a_LiP1820, quando analisadas em gel de SDS-PAGE, a colônia pET32a_LiP1820 em BL21(DE3) pLysS, não expressou a proteína de 54 kDa esperada na condição testada (Figura 3 A), no entanto a colônia pET32a_LiP1820 em Rosetta TM (DE3) apresentou tamanho esperado de 54 kDa (Figura 3 B).

A cepa BL21 é muito utilizada para expressão de Lignina peroxidase fúngica (Ambert-Balay; Fuchs; Tien, 1998; Nie; Reading; Aust, 1998; Miki; Ichinose; Wariishi, 2011; Fernández-Fueyo et al., 2012; Romero et al., 2019). No entanto, em alguns casos pode não apresentar boa expressão. Tegel et al. (2010) observaram um aumento significativo de expressão de proteínas quando trocou a cepa BL21 (DE3) por Rosetta (DE3); mostrando que algumas peroxidases podem ser melhor expressas em cepas de Rosetta (DE3) (Duan et al., 2018) (Figura 3 B).

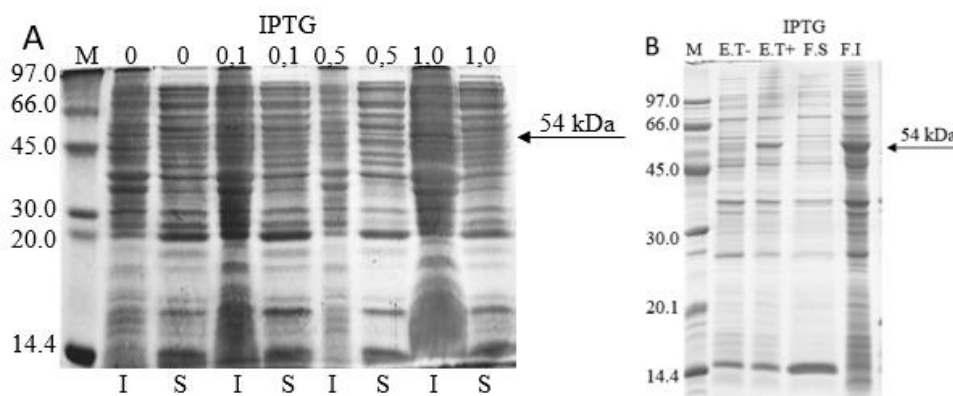


Figura 3: Análise em SDS-PAGE 12,5% do teste de expressão heteróloga do pET32a_LiP1820 em cepa de BL21(DE3) pLysS (A) crescida em meio LB. Letras I e S são referentes às frações Insolúvel e solúvel, respectivamente; (M) Marcador, as concentrações de IPTG estão destacadas acima (A). E o pET32a_LiP1820 em cepa de Rosetta TM (DE3) (B) cultivada em meio LB SDS PAGE a 12,5%. Marcador (M); Extrato total sem IPTG (E.T-), extrato total com IPTG (E.T+); fração solúvel (F.S) e fração insolúvel.

Apesar do pET28a_LiP1820 ter sido inserido em *E. coli* Rosetta TM (DE3) e expresso após a indução em meio LB, a mesma não foi visualizada na purificação da proteína. Como uma alternativa para solucionar esse problema e melhorar a produção da proteína, foi realizada uma nova construção em pET32a, esse vetor em sua construção possui uma tiorredoxina que pode auxiliar nas ligações dissulfeto (Rasooli; Hashemi, 2019) sendo projetado para aumentar o rendimento de proteínas ativas assim como melhorar a solubilidade (Stewart, 1998; Geum et al., 2015; Rasooli; Hashemi, 2019; Ma; Lee; Park, 2020). A expressão da proteína peroxidase versátil de *Pleurotus eryngii* no vetor pET28a resultou baixos níveis de produção, possivelmente devido a ausência de um tag de solubilidade, em contraste, a clonagem em vetor pET32a que possui uma fusão com tiorredoxina melhorou tanto a solubilidade quanto a estabilidade (Bao et al., 2012).

A proteína expressa a partir de pET32a_LiP1820 em Rosetta induzida no meio LB foi purificada em diferentes concentrações de imidazol, exibindo uma maior concentração na eluição em 250 mM de imidazol, apresentando o peso molecular predito de 54 kDa (Figura 4). Essa construção possui esse peso molecular devido a fusão pET32a com a proteína recombinante adicionado tiorredoxina, a calda de histidina, os sítios de trombina e a enteroquinase.

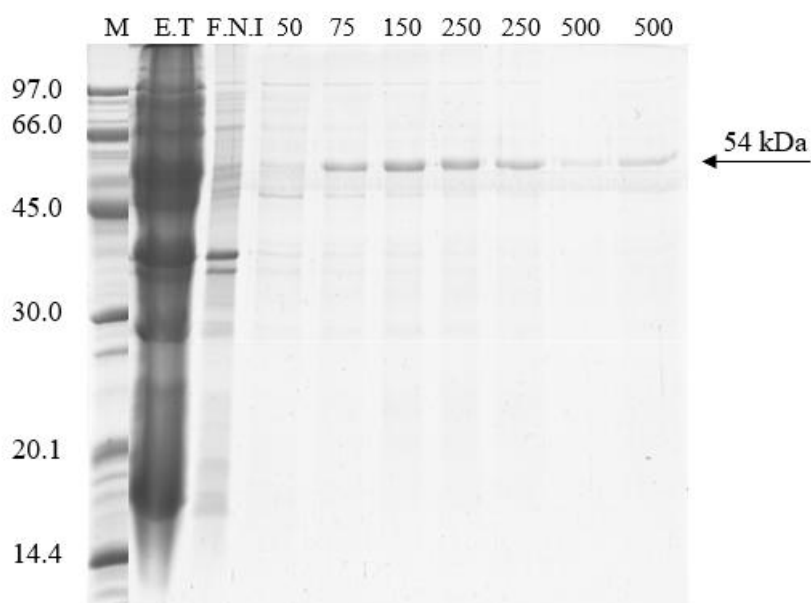


Figura 4: Análise em SDS PAGE 12,5% da purificação de rLiP1820 a partir da fração insolúvel após expressão de pET32a_LiP1820 em *E. coli* Rosetta (DE3) induzida em meio LB utilizando cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Fração Insolúvel (F.I), Fração não interagida (F.N.I), Amostra eluída com as concentrações de imidazol variando de 50 a 500 mM. Em aproximadamente 54 kDa, Lip1820.

Apesar da rLiP1820 ter sido expressa a partir de pET32a em meio LB, a mesma não exibiu atividade enzimática. O meio TB é comumente usado para expressão e atividade da enzima lignina peroxidase. Semba et al. (2015), expressou LiP de *Phanerochaete chrysosporium* UAMH 3641 em pET21a usando a cepa BL21 (DE3), em meio TB, o mesmo fez Romero et al. (2019) que transformou uma outra LiP de *P. chrysosporium* em pET23a usando a cepa BL21(DE3) pLysS. Dessa forma, foi realizado novos testes de expressão da rLiP1820 em meio TB.

3.3 Expressão e purificação da proteína recombinante do gene pET32a_LiP1820 em meio TB

Os extratos proteicos da colônia pET32a_LiP1820 em *E. coli* Rosetta TM (DE3) transformadas, quando analisadas em gel de SDS-PAGE, revelaram uma banda de aproximadamente 54 kDa, compatível com o peso molecular predito para a proteína denominada rLiP1820 (Figura 4). A proteína se acumulou predominantemente na fração insolúvel na indução a 37°C por 4 horas com em todas as concentrações de IPTG testadas com aumento maior intensidade em 1 mM.

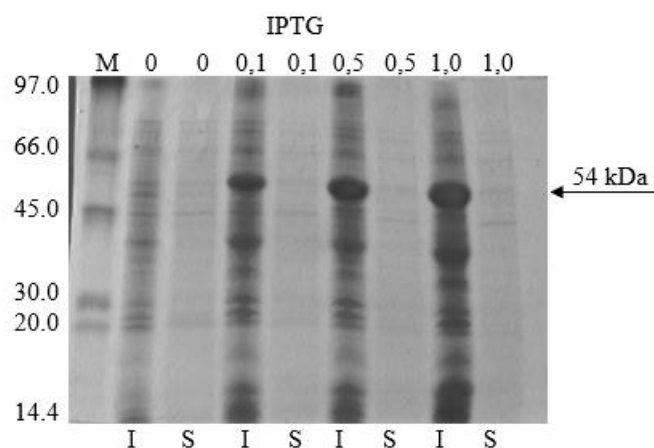


Figura 5: Teste de expressão heteróloga do pET32a_LiP1820 em cepa de Rosetta TM (DE3) em meio TB SDS PAGE 12,5%. Marcador (M); As concentrações de IPTG estão destacadas acima de cada par de canaletas. As letras I e S referentes às frações Insolúvel e solúvel, respectivamente, estão marcadas abaixo da figura.

A proteína expressa a partir de pET32a_LiP1820 em Rosetta induzida em meio TB foi purificada na fração solúvel, no entanto a purificação não foi visualizada com sucesso, comprovando que nenhuma LiP até então tenha sido produzida na forma solúvel (Biko; Viljoen-Bloom; Van Zyl, 2020). No entanto, a proteína da fração insolúvel submetida ao *refold* e purificada em diferentes concentrações de imidazol, apresentou uma maior concentração na eluição em 250 mM de imidazol (Figura 6).

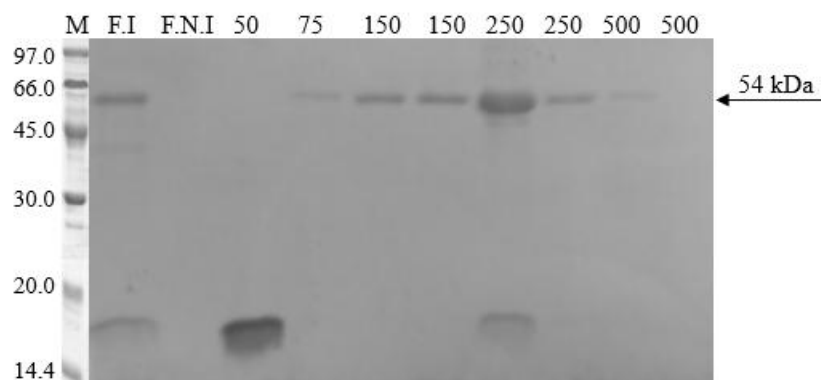


Figura 6: SDS PAGE 12,5% da purificação após *refolding* de rLiP1820 obtida a partir da fração insolúvel expressa na construção pET32a_LiP1820 em *E. coli* Rosetta (DE3) induzida em meio TB utilizando cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Fração Insolúvel (F.I), Fração não interagida (F.N.I), Amostra eluídas com as concentrações de imidazol variando de 50 a 500 mM. Em aproximadamente 54 kDa, rLiP1820.

A proteína induzida em meio TB e submetida aos processos de renaturação e purificação apresentou atividade específica de 3.6 U/L, indicando que as condições de cultivo, expressão, *refold* e purificação

influenciam na atividade da enzima Sollewijn Gelpke et al. (1999) obteve uma atividade específica de 25,4 U/mg de uma lignina peroxidase recombinante de *P. chrysosporium*. As enzimas contendo grupo heme como a lignina peroxidase frequentemente se acumulam em corpos de inclusão necessitando de protocolos específicos tanto para cultivo, quando para lise e renaturação. O meio TB é comumente usado em peroxidases. Romero et al. (2019) transformou uma LiP de *P. chrysosporium* em pET23a usando a cepa BL21(DE3) pLysS.

No re-novelamento foi importante levar em consideração as características da enzima, pois ela possui Ca^{+2} e heme que devem ser incorporados ao seu sítio ativo (Eggenreich et al., 2016). Assim foram adicionados a glutatona oxidada, que proporciona a formação das ligações dissulfeto na forma correta, o CaCl_2 , necessário para a proteína ser capaz de incorporar o grupo heme e trazer maior estabilidade a peroxidase, e a hemina, que junto ao CaCl_2 contribui para incorporação bem sucedida do grupo heme (Eggenreich et al., 2016).

Todos esses compostos permitiram que a proteína ficasse ativa e pudéssemos seguir para os testes de determinação da melhor condição de pH e temperatura para a rLiP1820.

3.4 Determinação da atividade ótima da enzima rLiP1820 em diferentes pH e temperatura

Os resultados para determinação da condição ótima da atividade enzimática observada para a enzima rLiP1820, obtida em diferentes condições de pH e temperatura testadas em arranjo fatorial completo 2^2 , usando o planejamento experimental de Doehlert (Tabela 3).

Tabela 3. Planejamento Doehlert aplicado na determinação das condições ótimas de pH e temperatura da atividade de rLiP1820.

Exp.	Temperatura	pH	Resposta (U/L)	Resposta Predita	Resíduo
1	90	4	0	0,017388	-0,017388
2	90	6	0	-0,017388	0,017388
3	70	3	0,178	0,160612	0,017388
4	70	5	0,1872	0,193357	-0,006157
4	70	5	0,19337	0,193357	0,000013
4	70	5	0,1995	0,193357	0,006143

5	70	7	0,08287	0,100258	-0,017388
6	50	4	0,2854	0,302788	-0,017388
7	50	6	0,2946	0,277212	0,017388

A rLiP1820 apresenta atividade ótima a 50 °C e pH 4,0 e 6,0 evidenciando que a enzima recombinante é uma forte candidata para uso na indústria.

Embora grande parte das pesquisas tenham se concentrado em lignina peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium* (Li et al., 2024) cuja LiP já é inclusive comercializada por empresas como Creative Enzymes (https://www.creative-enzymes.com/product/native-lignin-peroxidase-from-phanerochaete-chrysosporium_3781.html) e Parchem (<https://parchem.com/chemical-supplier-distributor/native-lignin-peroxidase-100602>), a espécie fúngica de *T. villosa* apresenta um potencial biotecnológico relevante para ampliar o entendimento dos parâmetros físico-químico que influenciam diretamente a estabilidade enzimática, aspecto crucial para o planejamento de futuros experimentos e estratégias de aplicação biotecnológica. Além disso, a LiP de *T. villosa* pode apresentar vantagens competitivas, como maior rendimento e maior estabilidade em condições específicas de processo ou menor sensibilidade a inibidores presentes na lignina industrial.

A partir da análise da Figura 7A, é possível afirmar que temperaturas abaixo de 50°C e pH entre 3,5 e 6,0 obtiveram maiores atividades enzimáticas, sendo consideradas condições experimentais ótimas. Gye et al. (2023) expressaram e purificaram uma isoforma recombinante de lignina peroxidase clonada em pET21b em cepa de BL21 (DE3), e assim, demonstrara atividade da enzima em pH e temperaturas ótimas de 5,5 e 37°C, muito próximo ao encontrado para a rLiP1820. A lignina peroxidase de uma cultura de *Penicillium decumbens* P6 também apresentou atividade ótima em 45°C e pH 4 (Yang et al., 2005).

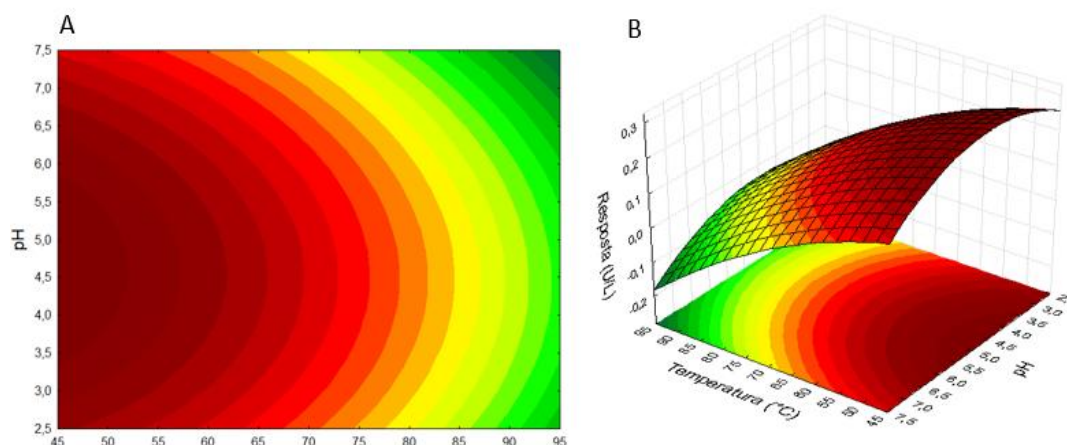


Figura: 7 Gráfico de Superfície de Resposta (A) e Gráfico de área (B) obtidos a partir da aplicação do planejamento experimental Doehlert, na otimização do pH e temperatura para a atividade de rLiP1820.

Equação 1:

$$\text{Resposta U/L} = -0,056884(\pm 0,085612) + 0,004744(\pm 0,001669)T - 0,000082(\pm 0,000011)T^2 + 0,150266(\pm 0,017776)\text{pH} - 0,015730(\pm 0,001404)\text{pH}^2 - 0,000115(\pm 0,00154).$$

Onde T é a temperatura.

As variáveis temperatura e pH tanto lineares quanto quadráticas são capazes de influenciar na resposta máxima, que é a atividade enzimática (Figura 8 A). Adicionalmente, é possível identificar que modelo quadrático é adequado para explicar o comportamento dos dados, pois, no gráfico os resíduos são apresentados de forma aleatória, não apresentando nenhum tipo de tendência, e assim, a resposta obtida em cada experimento é resultado da influência das variáveis (Figura 8 B). Como também, a amplitude dos resíduos é baixa, demonstrando uma boa reprodutibilidade do método.

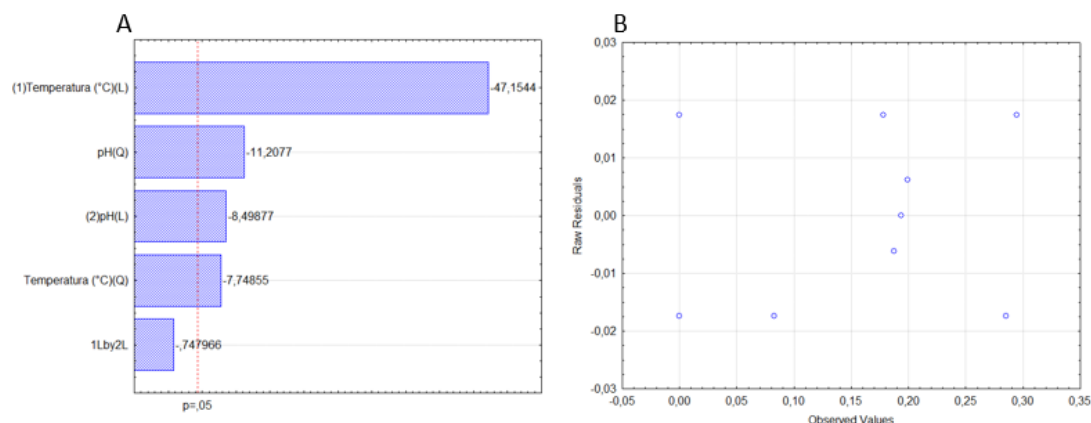


Figura 8: Gráfico de Pareto (A) Gráfico de resíduos (B) obtidos a partir da aplicação do modelo quadrático de planejamento experimental Doehlert, na otimização do pH e temperatura de rLiP1820.

A tabela 4 apresenta a Análise de Variância – ANOVA oriunda dos resultados obtidos a partir da aplicação do planejamento experimental Doenlert na otimização do pH e Temperatura da rLiP1820.

Tabela 4. Análise de Variância – ANOVA, obtida a partir dos resultados da aplicação do planejamento de Doehlert para otimização do pH e temperatura da rLiP1820.

Fonte de variação	SQ	GI	MQ	F calculado	F tabelado	R ²
Regressão	0,092799	5	0,01856	29,46	9,01	0,98
Resíduo	0,001890	3	0,00063			
Falta de ajuste	0,001814	1	0,001814	47,96	18,51	
Puro erro	0,000076	2	0,000038			
SQ total	0,094689	8				

A função quadrática utilizada na descrição do comportamento da resposta permitiu a otimização do pH e temperaturas da rLiP1820, apresentando regressão significativa, sendo $F_{\text{calculado}} (29,46) > F_{\text{tabelado}} (9,01)$ para regressão, mostrando que o modelo está bem ajustado. Portanto, os resultados experimentais encontrados não são de ordem aleatória, sendo aplicáveis dentro da região experimental estudada, com 95% de confiança. O R^2 obtido foi igual a 0,98, isso implica que 98% dos resultados encontrados podem ser explicados por este modelo experimental.

A partir da análise desses dados é possível indicar que a enzima mantém boa atividade em condições levemente ácidas, o que é vantajoso para experimentos laboratoriais e potencialmente facilita sua integração em

diferentes sistemas de processamento de biomassa, onde o controle de pH é crítico. Diferentemente da LiP comercial de *Phanerochaete chrysosporium*, que possui pH ótimo muito ácido (~3) (https://www.creative-enzymes.com/product/native-lignin-peroxidase-from-phanerochaete-chrysosporium_3781.html) que pode demandar ajustes adicionais em experimentos laboratoriais, a LiP de *T. villosa* apresenta condições mais flexíveis de pH em 4 e 6, tornando-a uma enzima particularmente adequada para pesquisa e desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas.

4 Conclusão

No presente estudo foi possível clonar e expressar uma lignina peroxidase de *T. villosa* inserida nos vetores pET28a e pET32a em *E. coli* Rosetta TM (DE3) e BL21(DE3) pLysS, apresentado os tamanhos esperados 36 kDa e 54 kDa respectivamente. A construção em pET28a não foi uma alternativa eficiente na purificação, mas a construção em pET32a em cepas de Rosetta TM em meio TB com adição de compostos na lise e *refolding* foi eficiente a partir da fração insolúvel, onde foi possível identificar atividade enzimática com o substrato álcool veratrílico. A proteína purificada apresentou uma atividade ótima em torno de 50°C e pH 4,0 e 6,0, indicando que a enzima mantém estabilidade e funcionalidade em condições moderadamente ácidas e termicamente favoráveis.

Esses achados permitem concluir que a rLiP1820 é uma candidata promissora para processos industriais que utilizem biomassa lignocelulósica, especialmente em etapas de pré-tratamento enzimático para liberação de açúcares fermentáveis ou degradação de lignina industrial, onde o controle de pH e temperatura se aproxima dessas condições.

Como perspectivas futuras, destacam-se testes com diferentes tipos de biomassa lignocelulósica industrial para avaliar a eficiência da enzima em contextos variados e mais próximos da realidade industrial, bem como a busca da proteína na forma solúvel, visando aumentar a atividade enzimática disponível, fornecendo subsídios para futuras aplicações biotecnológicas sustentáveis e economicamente viáveis.

Considerações finais

Os estudos realizados neste trabalho permitiram uma compreensão abrangente da LiP1820 de *Trametes villosa*, desde sua caracterização estrutural até sua expressão heteróloga e avaliação funcional *in vitro*. No Capítulo I, a modelagem e dinâmica molecular demonstraram que a proteína apresenta maior flexibilidade e compactação em pH 3, favorecendo a entrada do substrato, enquanto análises termodinâmicas apontaram maior estabilidade em pH neutro, evidenciando a importância do microambiente químico para a manutenção da conformação e funcionalidade da enzima.

No Capítulo II, a LiP1820 foi clonalmente inserida nos vetores pET28a e pET32a e expressa em *E. coli* Rosetta TM (DE3) e BL21(DE3) pLysS, apresentando os tamanhos esperados de 36 kDa e 54 kDa, respectivamente. A expressão em pET32a na cepa Rosetta TM, combinada com aditivos na lise e *refolding* a partir da fração insolúvel, permitiu a purificação da proteína ativa, com atividade ótima observada em 50 °C e pH 4,0–6,0, demonstrando estabilidade e funcionalidade em condições moderadamente ácidas e termicamente favoráveis.

Esses achados reforçam que a rLiP1820 é uma candidata promissora para aplicações *in vitro* e como biocatalisador em processos industriais envolvendo biomassa lignocelulósica, especialmente em etapas de pré-tratamento para liberação de açúcares fermentáveis ou degradação de lignina. Como perspectivas futuras, destacam-se a realização de testes com diferentes tipos de biomassa industrial para avaliar a eficiência da enzima em contextos variados, bem como a busca da proteína na forma solúvel para aumentar a atividade enzimática disponível.

Em síntese, a combinação de abordagens computacionais e experimentais forneceu subsídios importantes para o entendimento da estabilidade e funcionalidade da LiP1820, permitindo direcionar estratégias de engenharia de proteínas, otimização de condições experimentais e desenvolvimento de processos biotecnológicos mais eficientes, sustentáveis e economicamente viáveis.

Agradecimentos

Todos os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado.

Agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS/FIOCRUZ), à Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC, à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia — UESB e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

Referências

- ADEYINKA, Adekanmi Miracle *et al.* Advancements in hybrid energy storage systems for enhancing renewable energy-to-grid integration. **Sustainable Energy Research**, v. 11, n. 1, p. 26, 20 jul. 2024.
- AMBERT-BALAY, Katia; FUCHS, Stephen M.; TIEN, Ming. Identification of the Veratryl Alcohol Binding Site in Lignin Peroxidase by Site-Directed Mutagenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, n. 1, p. 283–286, out. 1998.
- BAO, Xue *et al.* Direct over-expression, characterization and H₂O₂ stability study of active *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 8, p. 1537–1543, ago. 2012.
- BARCIELA, Paula *et al.* Utility Aspects of Sugarcane Bagasse as a Feedstock for Bioethanol Production: Leading Role of Steam Explosion as a Pretreatment Technique. **Processes**, v. 11, n. 11, p. 3116, 31 out. 2023.
- BIKO, Odwa D. V.; VILJOEN-BLOOM, Marinda; VAN ZYL, Willem H. Microbial lignin peroxidases: Applications, production challenges and future perspectives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 141, p. 109669, nov. 2020.
- Brazilian Energy Balance. Balanço Energético Nacional.** . [S.l.]: Empresa de Pesquisa Energética – EPE, 2024.
- CALVETE, Crislaine Lambiase; CASEIRO, Marcos Montani; DE SOUZA, Cleide Barbieri. BIOTECNOLOGIA: TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR MÉTODO DE CHOQUE TÉRMICO. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 12, p. 41–53, 2015.
- CARNEIRO, Rita Terezinha De Oliveira *et al.* *Trametes villosa* Lignin Peroxidase (TvLiP): Genetic and Molecular Characterization. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 179–188, 28 jan. 2017.
- CHANG, Angela Y. *et al.* Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. v. 1JEMI Methods, p. 22–25, 2017.
- DOS SANTOS, Larissa Santana¹ VALENTE. REUTILIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO BIODEGRADÁVEL. 12 maio 2023.
- DUAN, Zihong *et al.* Comprehensive investigation of a dye-decolorizing peroxidase and a manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17, a lignin-degrading basidiomycete. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 119, dez. 2018.
- EGGENREICH, Britta *et al.* Production strategies for active heme-containing peroxidases from *E. coli* inclusion bodies – a review. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 75–83, jun. 2016.

ERDOCIA, Xabier *et al.* Lignin extraction and isolation methods. *In: Lignin-Based Materials for Biomedical Applications*. [S.l.]: Elsevier, 2021. p. 61–104.

FERNÁNDEZ-FUEYO, Elena *et al.* Lignin-degrading Peroxidases from Genome of Selective Ligninolytic Fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 20, p. 16903–16916, maio 2012.

FERREIRA, Dalila Souza Santos *et al.* Draft genome sequence of *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel CCMB561, a tropical white-rot Basidiomycota from the semiarid region of Brazil. **Data in Brief**, v. 18, p. 1581–1587, jun. 2018.

GEUM, L. *et al.* Construction of recombinant expression vectors to study the effect of thioredoxin on heterologous protein solubility. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 19, p. 1–5, 2015.

GIEDRAITYTE, Akvile *et al.* Hybrid Renewable Energy Systems—A Review of Optimization Approaches and Future Challenges. **Applied Sciences**, v. 15, n. 4, p. 1744, 8 fev. 2025.

GYE, Hyeryeong *et al.* Recombinant Lignin Peroxidase with Superior Thermal Stability and Melanin Decolorization Efficiency in a Typical Human Skin-Mimicking Environment. **Biomacromolecules**, v. 24, n. 6, p. 2633–2642, 12 jun. 2023.

HILLE, Erik. Europe's energy crisis: Are geopolitical risks in source countries of fossil fuels accelerating the transition to renewable energy? **Energy Economics**, v. 127, p. 107061, nov. 2023.

IGELAND, Philip *et al.* The energy transition: The behavior of renewable energy stock during the times of energy security uncertainty. **Renewable Energy**, v. 221, p. 119746, fev. 2024.

İNCİR, İbrahim; KAPLAN, Özlem. *Escherichia coli* as a versatile cell factory: Advances and challenges in recombinant protein production. **Protein Expression and Purification**, v. 219, p. 106463, jul. 2024.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LI, Shouzhi *et al.* Preparing the pure lignin peroxidase and exploring the effects of chemicals on the activity. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 660–667, 2 maio 2024.

MA, Yunqi; LEE, Chang-Joo; PARK, Jang-Su. Strategies for Optimizing the Production of Proteins and Peptides with Multiple Disulfide Bonds. **Antibiotics**, v. 9, n. 9, p. 541, 26 ago. 2020.

MIKI, Yuta; ICHINOSE, Hirofumi; WARIISHI, Hiroyuki. Determination of a catalytic tyrosine in *Trametes cervina* lignin peroxidase with chemical modification techniques. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 7, p. 1423–1427, jul. 2011.

NEUHOFF, Volker *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **ELECTROPHORESIS**, v. 9, n. 6, p. 255–262, jan. 1988.

NIE, Guojun; READING, N. Scott; AUST, Steven D. Expression of the Lignin Peroxidase H2 Gene from *Phanerochaete chrysosporium* in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, n. 1, p. 146–150, ago. 1998.

RASOOLI, Farideh; HASHEMI, Atieh. Efficient expression of EpEX in the cytoplasm of *Escherichia coli* using thioredoxin fusion protein. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 6, p. 554, 2019.

RIDELENSKY, Margareth Da Costa. A sustentabilidade ambiental de projetos de sucesso com diferentes alternativas de energia. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e194101118380, 28 ago. 2021.

ROMERO, Jefferson O. *et al.* Binding and Catalytic Mechanisms of Veratryl Alcohol Oxidation by Lignin Peroxidase: A Theoretical and Experimental Study. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 1066–1074, 2019.

SANDOMENICO, Annamaria; SIVACCUMAR, Jwala P.; RUVO, Menotti. Evolution of *Escherichia coli* Expression System in Producing Antibody Recombinant Fragments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6324, 31 ago. 2020.

SEMBA, Yasuyuki *et al.* Ancestral amino acid substitution improves the thermal stability of recombinant lignin-peroxidase from white-rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium* strain UAMH 3641. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 28, n. 7, p. 221–230, jul. 2015.

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

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. São Paulo: Bookman, 2009.

TEGEL, Hanna *et al.* Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3). **Protein Expression and Purification**, v. 69, n. 2, p. 159–167, fev. 2010.

TIEN, Ming; KIRK, T. Kent. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: **Methods in Enzymology**. [S.l.]: Elsevier, 1988. v. 161 p. 238–249.

TOMÉ, Luiz Marcelo Ribeiro *et al.* Hybrid Assembly Improves Genome Quality and Completeness of *Trametes villosa* CCMB561 and Reveals a Huge Potential for Lignocellulose Breakdown. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 142, 30 jan. 2022.

YANG, Yuqing *et al.* *Escherichia coli* BW25113 Competent Cells Prepared Using a Simple Chemical Method Have Unmatched Transformation and Cloning Efficiencies. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 838698, 24 mar. 2022.