



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



THAISE ROSA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL *IN SILICO* E PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE
UMA MANGANÊS PEROXIDASE DE *Ganoderma boninense***

Feira de Santana, BA

2025

THAISE ROSA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL *IN SILICO* E
PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE UMA MANGANÊS
PEROXIDASE DE *Ganoderma boninense***

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

Orientador: Prof. Dr^a Raquel Guimarães Benevides

Co-orientador: Prof Dr. Hélio Mitoshi Kamida

Feira de Santana, BA

2025

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Silva, Thaise Rosa da
S584c Caracterização estrutural *in silico* e produção heterológica de uma
mangânese peroxidase de *Ganoderma boninense* / Thaise Rosa da Silva. -
2025.

80f.: il.

Orientadora: Raquel Guimarães Benevides
Coorientador: Hélio Mitoshi Kamida

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

1. Basidiomiceto. 2. Lignase. 3. Expressão heteróloga. 4. Resíduo
agroindustrial. I. Benevides, Raquel Guimarães, orient. II. Kamida, Hélio
Mitoshi, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.


CDU: 582.28

Thaise Rosa da Silva

**“CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL *IN SILICO* E PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE
UMA MANGANÊS PEROXIDASE DE *Ganoderma boninense*”**


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, 26 de setembro de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **RAQUEL GUIMARÃES BENEVIDES**
Data: 25/09/2025 09:46:14-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Orientadora e presidente da Banca: Prof.^a Dra. **Raquel Guimarães Benevides**

UFC – Universidade Federal do Ceará

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO SILVA ANDRADE**
Data: 25/09/2025 09:57:22-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>


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

UEFS – Universidade do Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **ROMULO FARIAS CARNEIRO**
Data: 01/10/2025 16:05:12-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Rômulo Farias Carneiro**

UFC – Universidade Federal do Ceará

Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL DA CONCEIÇÃO SIMÕES**
Data: 02/10/2025 15:38:17-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Rafael da Conceição Simões**

UFOB – Universidade Federal do Oeste da Bahia

Documento assinado digitalmente
 **ROGERIO MERCES FERREIRA SANTOS**
Data: 06/10/2025 15:07:50-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

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

UEFS – Universidade Estadual de Feira de Santana

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a toda minha família em especial a minha mãe (Maria Rosa) por todo amor e carinho incondicional a todo momento, que mesmo longe se faz presente em cada segundo.

Agradeço a Professora Raquel Guimarães pela oportunidade da orientação, confiança e por toda disponibilidade ao longo da realização deste trabalho. Além disso, aos professores Hélio, Humberto, Sandra por colaborarem de alguma forma para a finalização desse trabalho.

As minhas” co-orientadoras” Jane e Cleide, com toda certeza sem o apoio, ensinamentos e compartilhamento de conhecimentos não seria possível a realização desse trabalho.

À equipe do LAPEM, em especial a Goh, Priscila, Alice e Akcel por toda a ajuda e suporte quando necessário.

Agradeço as amigas que realizei durante essa jornada, em especial a Paloma, Cleide e Goh, obrigada por todas as conversas, desabafos e risadas, guardarei para sempre comigo!

Aos meus amigos Bruna, Tailane, Raphael, Rafael e Lucas, que estão comigo a todo momento, torcendo, apoiando, ajudando! Obrigada por tudo.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para esta conquista.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), agradeço pela oportunidade concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

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

RESUMO GERAL

As enzimas lignolíticas representam um grupo de biocatalisadores capazes de degradar a lignina, um dos principais componentes da parede celular vegetal. Entre elas, destacam-se as manganês peroxidases (MnPs), hemoproteínas que atuam na ruptura da complexa estrutura lignínica, desempenhando papel central na conversão da biomassa lignocelulósica. Essas enzimas são produzidas principalmente por fungos filamentosos, entre os quais *Ganoderma boninense*, um basidiomiceto fitopatogênico amplamente reconhecido por sua elevada eficiência enzimática e secreção extracelular, mas ainda pouco explorado para aplicações biotecnológicas. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar estruturalmente uma MnP de *G. boninense* e produzi-la de forma heteróloga em *Escherichia coli*, visando sua produção, purificação, caracterização e avaliação do potencial biotecnológico. Sequências de MnPs de *Ganoderma* spp. foram obtidas no NCBI, sendo selecionada a sequência QOW95911.1. Após análises de massa molecular, ponto isoelétrico e validação do sítio ativo, procedeu-se ao alinhamento das sequências e à construção de uma árvore filogenética. A estrutura tridimensional foi modelada a partir da peroxidase A0A5C2RQX4.1 de *Lentinus tigrinus*, apresentando valores de GMQE (0,93) e QMEAN (-0,58), indicadores de alta qualidade estrutural. A sequência, sem o peptídeo sinal e com códons otimizados, foi clonada no vetor pET32a(+) e expressa em *E. coli* Rosetta (DE3), sob indução por IPTG (1 mM, 37 °C, 4 h). A expressão resultou em uma proteína recombinante de aproximadamente 56 kDa, detectada na fração insolúvel por SDS-PAGE. A purificação e o *refolding* permitiram recuperar uma forma ativa da enzima, embora com baixo desempenho nos testes de atividade enzimática. Conclui-se que a avaliação estrutural e a produção recombinante da MnP de *G. boninense* oferecem subsídios importantes para futuras otimizações no processo de expressão e atividade, além de reforçar o potencial biotecnológico dessa enzima em aplicações voltadas à degradação de biomassa lignocelulósica.

Palavras-chave: basidiomiceto, expressão heteróloga, Lignase, resíduo agroindustrial

ABSTRACT

Ligninolytic enzymes are a group of biocatalysts capable of degrading lignin, one of the main components of the plant cell wall. Among them, manganese peroxidases (MnPs) stand out as heme proteins involved in the oxidation of aromatic compounds and the cleavage of the complex lignin structure, playing a key role in the conversion of lignocellulosic biomass. These enzymes are mainly produced by filamentous fungi, among which *Ganoderma boninense* is noteworthy, a basidiomycete pathogen widely recognized for its high enzymatic efficiency and extracellular secretion, but still little explored for biotechnological applications. The present study aimed to structurally characterize a MnP from *G. boninense* and to produce it heterologously in *Escherichia coli*, with a focus on its production, purification, characterization, and evaluation of its biotechnological potential. MnP sequences from *Ganoderma* spp. were retrieved from NCBI, and sequence QOW95911.1 was selected. After molecular weight, isoelectric point, and active site analyses, sequence alignment and phylogenetic tree construction were performed. The three-dimensional structure was modeled based on peroxidase A0A5C2RQX4.1 from *Lentinus tigrinus*, showing GMQE (0.93) and QMEAN (-0.58) values, which indicate high structural reliability. The sequence, without the signal peptide and with codon optimization, was cloned into the pET32a(+) vector and expressed in *E. coli* Rosetta (DE3), under IPTG induction (1 mM, 37 °C, 4 h). Expression resulted in a recombinant protein of approximately 56 kDa, detected in the insoluble fraction by SDS-PAGE. After purification and refolding, an active form of the enzyme was recovered, although with low performance in enzymatic activity assays. In conclusion, the structural evaluation and recombinant production of the *G. boninense* MnP provide valuable insights for future optimizations in expression and activity, and reinforce the biotechnological potential of this enzyme in applications related to lignocellulosic biomass degradation and second-generation biofuel production.

Keywords: basidiomycete, heterologous expression, Ligninase, agro-industrial residue

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 BIOMASSA LIGNOCELULOSICA	17
3.2 BAGAÇO DE CANA DE AÇUCAR.....	18
3.3 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	19
3.4 ORGANIZAÇÕES DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS (CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA)	20
3.4.1 Celulose	21
3.4.2 Hemicelulose	21
3.4.3 Lignina.....	22
3.5 HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS.....	23
3.5.1 Pré-tratamento	24
3.6 ENZIMAS LIGNOLÍTICAS.....	26
3.6.1 Lignina peroxidase	27
3.6.2 Lacases.....	27
3.6.3 Manganês peroxidases.....	28
3.7 <i>GANODERMA</i> sp.	29
3.8 APLICAÇÕES DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS.....	32
3.9 APLICAÇÃO DA BIOINFORMÁTICA NO ESTUDO DE PROTEÍNAS	33
3.10 CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	34
4.REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO I	42
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTRUTURAL DE UMA MANGANÊS PEROXIDASE DE <i>GANODERMA BONINENSE</i>	42
1.INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Busca e análises <i>in silico</i> de sequências de MnPs.....	44

2.2 Construção e análise da estrutura tridimensional por modelagem comparativa da sequência de uma MnP em estudo.....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 Busca e análise das sequências de Mangânes peroxidase de <i>Ganoderma sp.</i>	45
3.2 Construção e análise da estrutura tridimensional	50
4. DISCUSSÃO	52
5. CONCLUSÃO.....	55
6. REFERÊNCIAS	56
CAPÍTULO II.....	58
CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA MANGÂNES PEROXIDASE DE GANODERMA BONINENSE	58
1.INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 Obtenção do gene sintético.....	60
2.2 Transformação do gene sintético em vetor de expressão em cepas <i>E. coli</i>	61
2.3 Expressão da MnP em células de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) em pequena escala.	62
2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	63
2.5 Expressão da proteína recombinante em maior escala	64
2.6 <i>Refolding</i> e Purificação da fração insolúvel	64
2.7 Detecção da atividade enzimática na proteína recombinante	65
2.8 Determinação do Teor de Proteína Total.....	66
3.RESULTADOS	66
3.1 Sequência de MnP selecionada para obtenção do vetor pET32a	66
3.1 Seleção das colônias por meio da transformação de células em <i>E. coli</i>	67
3.2 Expressão das colônias obtendo proteína heteróloga	68
3.3 Purificação da proteína rTrx-(His)6 MnP por cromatografia de afinidade	71
3.4 Determinação da concentração da proteína total e teste de atividade	72
4. DISCUSSÃO	73
5.CONCLUSÃO.....	77
6. .REFERENCIAS	78
CONCLUSÃO GERAL	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

GMQE - *Global Model Quality Estimation*

LB - Luria Bertani

M - Molaridade

M - Mililitros

mM - milimolar

μ M - micromolar

N - Normalidade

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

Pb - Pares de Bases nitrogenadas

PDB - Protein data bank

pI - Ponto isoelétrico

PM - Peso molecular

QMEAN - *Qualitative Model Energy Analysis*

RPM - Rotação por minutos

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida-Dodecil-sulfato de sódio

Tris - Tri (hidroximetil) aminometano

x g - Força G

μ g - Microgramas

μ L - Microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos constituintes da biomassa lignocelulósica. Fonte: PASSOS (2024).	21
Figura 2: Efeito do pré-tratamento na liberação de açúcares para fermentação. Fonte: SANTOS et al. (2012).	25
Figura 3: Estrutura tridimensional de uma Lignina peroxidase (EC 1.11.1.14 (A) de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>), Mangânes peroxidase (EC 1.11.1.13) (B) de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e uma Lacase (EC 1.10.3.2) de <i>Trametes versicolor</i>	27
Figura 4: Ciclo catalítico da Manganês Peroxidase. Fonte: CARVALHO (2005).	29
Figura 5: Fungo <i>Ganoderma</i> sp, basidiomiceto amplamente estudado por suas propriedades terapêuticas e bioativas. Fonte: Benzie (2018).	30
Figura 6: Árvore filogenética baseada em sequências de manganês peroxidase (MnP) de diferentes espécies de <i>Ganoderma</i> obtidas do banco de dados NCBI.	49
Figura 7: Estimativa da qualidade dos modelos por QMEAN e Z score, gerado pelo SWISS – MODEL.	50
Figura 8: Estruturas 3D gerada a partir da sequência (QOW95911.1), destacando (rosa) para o sitio ativo	51
Figura 9: A- Estrutura tridimensional da MnP-QOW95911.1 B- Estrutura tridimensional da sequência molde fornecido pelo swiss model, uma peroxidase A0A5C2RQX4.1 de <i>Lentinus tigrinus</i> . C- Alinhamento das estruturas tridimensionais A e B. Fonte: PyMol	52
Figura 10: Representação esquemática do vetor pET32a contendo a sequência de interesse.	61
Figura 11: A- Sequência de nucleotídeos de manganês peroxidase de <i>Ganoderma boninense</i> ; B- Sequência de aminoácidos de manganês peroxidase de <i>Ganoderma boninense</i> com destaque em amarelo ao peptídeo sinal.	67
Figura 12: Transformação de pET-32a-MnP em estirpe Rosetta (DE3) de <i>E. coli</i> . Placa positiva contendo meio LB-ágar, ampicilina e cloranfenicol, células competentes e vetor resultando no crescimento de colônias selecionadas.	68

Figura 13: Teste de expressão heteróloga em estirpe de <i>E. coli</i> ROSETTA (DE3) a 37° C por 4 horas, em SDS PAGE 12,5%. Marcador (M); fração solúvel (FS) e fração insolúvel (FI), sem (-) IPTG e com (+) IPTG variando entre 0,1 a 1,0 mM.....	69
Figura 14: Teste de expressão heteróloga em estirpe de <i>E. coli</i> ROSETTA (DE3) a 25° C por 16 horas, em SDS PAGE 12,5%. Marcador (M); fração solúvel (FS) e fração insolúvel (FI), sem (-) IPTG e com (+) IPTG variando entre 0,1, 0,5 e 1,0 mM;	69
Figura 15: Teste de expressão heteróloga em estirpe de <i>E. coli</i> ROSETTA (DE3) a 18° C por 24 horas, em SDS PAGE 12,5%. Marcador (M); fração solúvel (FS) e fração insolúvel (FI), sem (-) IPTG e com (+) IPTG variando entre 0,1, 0,5 e 1,0 mM.	70
Figura 16: SDS-PAGE 12,5% da purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. Marcador (M); Fração não interagida (FNI); fração solúvel (FS); amostras eluídas com as concentrações de imidazol variando de 50 a 500 mmol L ⁻¹).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências codificadoras de manganês peroxidase (MnP) de diferentes espécies de <i>Ganoderma</i> sp., selecionadas a partir do banco de dados NCBI (similaridade >85%), com respectivos parâmetros físico-químicos.....	45
Tabela 2: Concentrações de IPTG, tempo de indução e temperaturas utilizadas para o teste de expressão de MnP em células de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3).....	62
Tabela 3: Atividade enzimática bruta de um manganês peroxidase de <i>Ganoderma boninense</i>	72

1. INTRODUÇÃO GERAL

A crise energética global exige soluções urgentes que conciliem a crescente demanda por energia com a sustentabilidade ambiental. A redução progressiva das reservas de combustíveis fósseis tem impulsionado a busca por alternativas renováveis, entre as quais a biomassa lignocelulósica se destaca como fonte estratégica para a produção de biocombustíveis (MANOJKUMAR et al., 2020).

A biomassa apresenta grande flexibilidade de uso, ampla disponibilidade e composição rica em celulose e hemicelulose, polímeros passíveis de degradação em açúcares fermentescíveis (BINOD et al., 2019). Além disso, trata-se de um recurso de baixo custo e elevado potencial energético, sobretudo quando oriundo de resíduos agrícolas e agroindustriais, como palhas, cascas, bagaços, farelos, madeira, algodão e rejeitos da indústria de polpa e papel (YANG et al., 2021).

A fração lignocelulósica é composta essencialmente por celulose, hemicelulose e lignina. Entre as estratégias empregadas para sua conversão, a sacarificação enzimática é considerada uma das mais vantajosas, embora limitada pela baixa acessibilidade da celulose devido à sua íntima associação com a lignina. Nesse sentido, o pré-tratamento da biomassa é etapa crucial para expor os carboidratos estruturais à hidrólise enzimática, sendo as enzimas lignolíticas uma alternativa promissora para esse processo (SINGHANIA et al., 2022).

A degradação da lignina ocorre por meio da ação sinérgica de enzimas como lignina peroxidases (LiPs), manganês peroxidases (MnPs) e lacases. Essas enzimas extracelulares apresentam elevada especificidade, atuam sob condições brandas e geram poucos impactos ambientais, características que ampliam suas possibilidades de aplicação biotecnológica (ASEMOLOYE et al., 2021). Dentre os organismos produtores, destacam-se os fungos de decomposição branca, reconhecidos pela capacidade de secretar complexos enzimáticos oxidativos que modificam a lignina e tornam os demais constituintes da parede celular vegetal mais acessíveis (KUMAR; CHANDRA, 2020).

Microrganismos em geral constituem valiosas fontes de enzimas devido à diversidade de espécies e linhagens, possibilitando a obtenção de biocatalisadores com propriedades variadas e adaptáveis a diferentes condições físico-químicas (LI et al., 2020). Nas últimas décadas, avanços técnico-científicos têm revelado novas enzimas lignocelulolíticas de grande interesse industrial, sobretudo para a produção de bioetanol (CURRAN et al., 2022). Entretanto, os custos de produção em larga escala permanecem como desafio, tornando o uso de sistemas de expressão heteróloga uma estratégia essencial para aumentar o rendimento, a estabilidade e a viabilidade de aplicação dessas enzimas.

Entre os fungos produtores de enzimas lignolíticas, o gênero *Ganoderma* tem despertado atenção por seu potencial biotecnológico. Em particular, *Ganoderma boninense*, um basidiomiceto de degradação branca que apresenta capacidade de secreção enzimática relevante; contudo, a produção natural dessas enzimas é limitada, além de sujeita à instabilidade catalítica em decorrência da formação de co-produtos (XUAN-WEI et al., 2013). Tais limitações evidenciam a importância da identificação e caracterização estrutural dessas enzimas, visando compreender regiões determinantes para estabilidade e atividade catalítica. Essas limitações ressaltam a relevância da identificação e da caracterização estrutural dessas enzimas, uma vez que permitem compreender as regiões responsáveis por sua estabilidade e atividade catalítica.

Nessa perspectiva, a expressão heteróloga configura-se como uma estratégia promissora para superar barreiras de produção, viabilizando processos mais eficientes de obtenção, purificação e aplicação biotecnológica tanto das manganês peroxidases quanto de outras enzimas lignolíticas. Assim, este trabalho tem como objetivo caracterizar e produzir, de forma heteróloga em *Escherichia coli*, a manganês peroxidase de *Ganoderma boninense*, avaliando seu potencial de aplicação na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e produzir uma manganês peroxidase de *Ganoderma boninense* de forma heteróloga em células de *E. coli* aplicável no processo de deslignificação do bagaço de cana de açúcar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Selecionar e caracterizar estruturalmente sequências codificantes de manganês peroxidase de *Ganoderma* sp.

Sintetizar gene sintético em vetor de expressão para a enzima manganês peroxidase de *Ganoderma boninense*;

Expressar este gene sintético de forma heteróloga em células de *E. coli* em diferentes condições;

Purificar a enzima em sua forma ativa a partir de sistema heterólogo;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BIOMASSA LIGNOCELULOSICA

As biomassas lignocelulósicas compreendem os vários resíduos agrícolas como, por exemplo, as palhas, cascas, pendúnculos, folhas, resíduos de indústrias de polpa e papel, e também colheitas de biomassa vegetal. Estes são acumulados na natureza, o que pode representar um problema ambiental, porém esses materiais são ricos em fonte de carbono e outros componentes para síntese de produtos e biomoléculas de interesse biotecnológico (MALIK et al., 2022).

Diversos resíduos que tradicionalmente são queimados ou descartados, podem ser matérias-primas para obtenção de bioetanol. Os esquemas de produção a partir da biomassa lignocelulósica são referidos como etanol de segunda geração (E2G), cujo processamento é uma das mais promissoras, devido ser uma matéria prima que não compete com outros seguimentos do mercado, desempenhando um papel importante na sustentabilidade ambiental, industrial e energética (ABO BO et al., 2019). Contudo seu desenvolvimento depende do domínio de tecnologias que possam tornar eficiente o processo produtivo.

Os resíduos lignocelulósicos possuem considerável complexidade, são compostos majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, que estão entremeados por uma macromolécula de lignina através de ligações de hidrogênio, além de ligações covalentes (PERIYASAMY et al., 2023). Constituídos por 40-60% de celulose (polímero de glicose), 20-40% de hemicelulose (heteropolímero formado por pentoses, que são açúcares de cinco carbonos) e 10-25% de lignina, os resíduos vegetais formam uma estrutura complexa e compacta.

A estrutura rígida e complexa da biomassa lignocelulosica foi desenvolvida para proteger seus constituintes da degradação dos microrganismos e animais (ZHAO; ZHOU; LIU, 2012). Devido a essa rigidez e aos fatores físico-químicos estruturais e composicionais, existem vários exemplos de resistência natural à ruptura das ligações químicas existentes na fibra da biomassa, como pode-se citar: o grupo acetil presente na hemicelulose, que interfere na ação catalítica das enzimas, causando a diminuição do rendimento da hidrólise; a cristalinidade característica da celulose que ocasiona a diminuição da área superficial, o que diminui a ação

das enzimas; a presença da lignina que age como uma barreira física protetora, bloqueando que bactérias e fungos devastem as células da fibra, consequentemente dificulta o acesso dos agentes de conversão, entre vários outros exemplos (KUMAR et al., 2009; SANTIAGO; RODRIGUES, 2017; ZHANG et al., 2010).

A produção desse combustível necessita inicialmente da hidrólise da celulose e da hemicelulose em seus monômeros antes da conversão dos mesmos em etanol. No entanto, esses polissacarídeos encontram-se intimamente associados à lignina, que confere rigidez à parede das células e dificulta a ação hidrolítica. Assim sendo, a biomassa lignocelulósica necessita passar por um processo de pré-tratamento físico e/ou químico ou biológico, a deslignificação, a fim de permitir que a celulose e hemicelulose fiquem expostas à despolimerização e susceptíveis à hidrólise (RASTEGARI et al., 2019).

Diversas formas de aproveitamento de biomassas para geração de energia têm sido extensivamente estudadas. Isso se deve principalmente ao fato de que há uma necessidade emergente da utilização de fontes alternativas de energia, em detrimento ao uso do petróleo, que é de origem fóssil, poluente e de preços instáveis. Outra razão é que esses tipos de resíduos muitas vezes são desperdiçados ou até mesmo subutilizados em atividades que não agregam valor como é o caso da geração de energia limpa.

3.2 BAGAÇO DE CANA DE AÇUCAR

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas sua produção no Brasil está ligada ao etanol no mercado interno e externo (MANOCHIO et al., 2017). Contudo, o aumento significativo da produção e o crescimento das plantações de cana-de-açúcar causam uma enorme geração de resíduos, sendo o bagaço um dos principais. Estes resíduos podem ser denominados como subprodutos, desde que sejam aproveitados de maneira eficiente (AMOAHA et al., 2019).

O bagaço é um tipo de matéria fibrosa, gerada na saída da moenda, na etapa de extração do caldo da cana-de-açúcar, para produção de etanol. Este é usado atualmente como a principal fonte de energia necessária em usinas de açúcar e destilarias de álcool e também para a geração de energia elétrica, etc. (BAËTA, 2016). Ele é um material lignocelulósico constituído de 50% de celulose, 25 % de hemicelulose e 25% de lignina, sendo uma das mais estudadas para a produção de etanol de segunda geração sem necessidade de incrementos na área de plantio

(MACRELI et al., 2012). Substâncias lignocelulósicos, tais como palhas, bagaços e etc. estão disponíveis em grandes quantidades e podem ser facilmente fermentadas para produzir o etanol (ROJAS et al., 2016).

O processamento de uma tonelada de cana gera em torno de 250 kg de bagaço, sendo esse substrato de baixo custo para a produção de bioetanol (LIU et al., 2021). Representando uma grande oportunidade para agroindústria nacional, cuja seu desenvolvimento pode ser associado a indústria sucroalcooleiras já instaladas assim, para menor investimento, infraestrutura e logística. No entanto, apesar dos grandes esforços para promover esse resíduo como um material de bioenergia, para o aproveitamento integral da cana-de açúcar ainda é necessário avanços para melhorar as etapas em todos os processos, para atingir o produto final; dessa forma, cepas microbianas, formulações químicas e recuperação de produtos permitem uma conversão mais eficiente com valor agregado de interesse comercial.

3.3 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O etanol é líquido é volátil, inflamável, incolor e totalmente solúvel em água, apresenta fórmula molecular C_2H_6O , podendo ser obtida por via química e por via fermentativa (LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M, 2015). Por via química, obtém-se o etanol a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o eteno e o etino, e de gases de petróleo e da hulha (LEHNINGER, 2003). Porém, a via fermentativa é a maneira mais importante e econômica para obtenção do etanol no Brasil devido, principalmente, ao grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país.

O termo biocombustível refere-se a combustíveis líquidos, sólidos ou gasosos oriundos de vários tipos de biomassa (FERREIRA, 2015). De acordo com a origem desta biomassa, os biocombustíveis podem ser classificados como de primeira e de segunda geração. Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos por tecnologias estabelecidas e comprovadas, e pelo uso de matérias-primas de culturas agrícolas. Enquanto os de segunda geração, são produzidos a partir de biomassas lignocelulósicos presentes em resíduos de origem vegetal. Porém para a produção do segundo, as tecnologias existentes, encontram-se ainda em processo de desenvolvimento e aperfeiçoamento (SARKAR, SAHA, 2018).

O Brasil se encontra em um patamar diferenciado em relação a outros países no que diz respeito à obtenção do etanol de segunda geração por possuir à sua disposição de forma fácil e de baixo custo uma quantidade considerável de matéria-prima, apresentando assim um grande potencial para a expansão sem que haja a necessidade de aumento da área cultivada, através do desenvolvimento das pesquisas e tecnologias para a produção do etanol lignocelulósico (VIDAL, 2020).

A produção de bioetanol de segunda geração ou etanol celulósico apresenta uma vantagem em relação às questões ambientais, pois é obtido a partir de açúcares fermentescíveis provenientes da quebra das cadeias de celulose e hemicelulose da biomassa de resíduos industriais, agrícolas e florestais, não competindo, assim, com as áreas cultiváveis utilizadas para a produção de alimentos, uma vez que o produto de interesse já foi extraído (MERVATE et al., 2013). Além disso, podem ser usadas outras culturas que não são utilizadas na alimentação humana. Porém, alguns fatores ainda representam desafios a serem vencidos, para que a produção de etanol de segunda geração seja implementada de forma comercial e ganhe espaço no mercado. Para isto, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas visando a aumentar a produção deste combustível, aliando sustentabilidade e viabilidade econômica na sua obtenção (BINOD et al., 2019).

3.4 ORGANIZAÇÕES DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS (CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA)

Os resíduos lignocelulósicos são formados por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1).

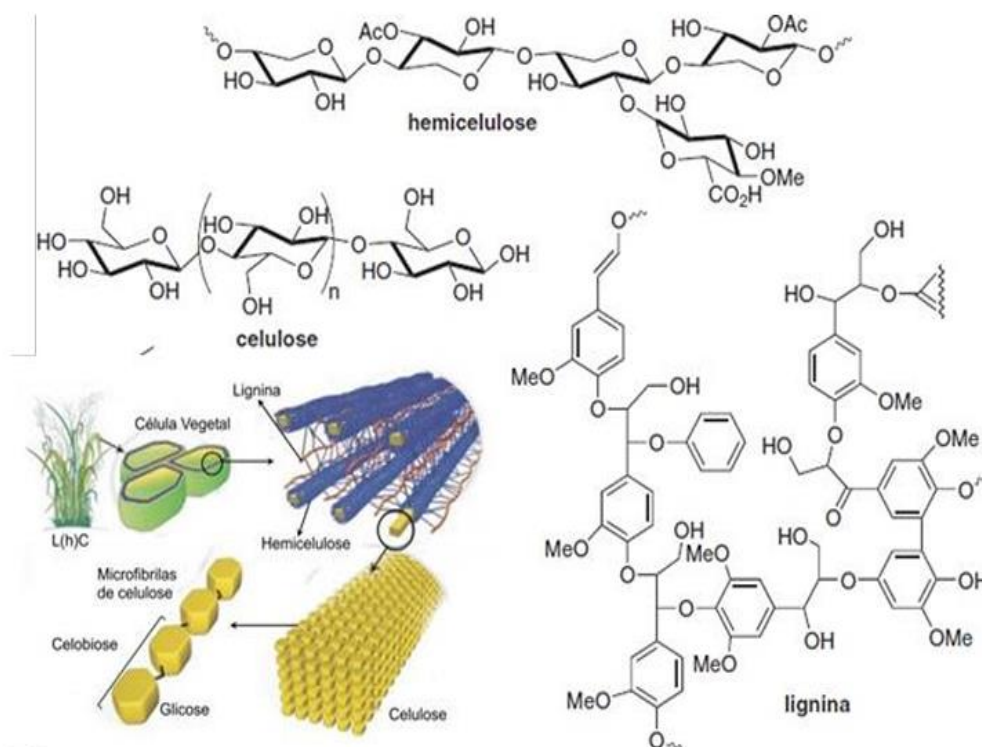


Figura 1. Representação dos constituintes da biomassa lignocelulósica Fonte: PASSOS (2024).

3.4.1 Celulose

A celulose é o principal componente estrutural das células vegetais e está presente na parede celular, sendo considerada a molécula mais abundante da natureza (SAMAIN, 2010). Localiza-se na região central da parede, recoberta pela hemicelulose e, externamente, pela lignina. Trata-se de um homopolissacarídeo linear constituído por 8.000 a 14.000 unidades de glicose, na conformação de D-glucopirano, unidas por ligações glicosídicas β -(1-4). A condensação de duas moléculas de glicose libera uma molécula de água, originando a celobiose (ALBANO, 2012), considerada a unidade básica da celulose (4-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopirano) (RAMOS, 2016).

As cadeias de celulose se associam formando microfibrilas, estabilizadas por extensas redes de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Essas interações conferem elevada rigidez à estrutura, resultando em uma macromolécula de natureza cristalina e difícil degradação. As regiões cristalinas, altamente organizadas, são responsáveis pela insolubilidade e baixa reatividade da celulose, enquanto as regiões amorfas, menos organizadas e em menor

proporção, alternam-se com as cristalinas e apresentam maior suscetibilidade à hidrólise (BINOD et al., 2019).

A recalcitrância da celulose à hidrólise decorre principalmente da sua alta cristalinidade, das barreiras físicas e das fortes interações com a hemicelulose e a lignina, características típicas da biomassa lignocelulósica. Essa resistência constitui um dos principais obstáculos para sua conversão biotecnológica em açúcares fermentescíveis. Ainda assim, as regiões amorfas são degradadas com maior facilidade e, como a estrutura das microfibrilas não contém água, a celulose cristalina é a última a ser atacada. Sob condições brandas de hidrólise, o principal produto formado é a celobiose (MALIK et al., 2022).

A degradação completa da celulose até glicose é mediada pelas celulasas, enzimas produzidas por diferentes microrganismos. Essas enzimas atuam sobre a celobiose e sobre oligossacarídeos solúveis de baixo grau de polimerização (menores que sete unidades), liberando glicose como principal produto (SILVA, 2019).

3.4.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose. É formada por cadeias de 100 a 200 unidades de açúcares, compostas tanto por pentoses (xilose, ramnose e arabinose) quanto por hexoses (glicose, manose e galactose). Diferentemente da celulose, trata-se de um heteropolissacarídeo, frequentemente ramificado, com baixo grau de polimerização, o que a torna mais suscetível à hidrólise. Nas madeiras macias, as principais hemiceluloses são as O-acetil-galactoglucomananos e as arabino-4-O-metilglucurono-D-xilanas; já em feixes de madeira dura, predominam as O-acetil-4-O-metilglucurono-D-xilanas (FENGEL; WEGENER, 1989).

Nas plantas, a hemicelulose desempenha papel estrutural essencial, conectando as fibras de lignina às fibras de celulose, o que confere maior rigidez ao complexo celulose-hemicelulose-lignina (MALIK et al., 2022). Possui peso molecular inferior ao da celulose e apresenta cadeias laterais curtas formadas por diferentes açúcares, resultando em polímeros mais facilmente degradáveis. Por essa razão, é considerada o componente mais termossensível da biomassa lignocelulósica (PERIYASAMY et al., 2023).

A hemicelulose não apresenta regiões cristalinas devido ao seu elevado grau de ramificações, sendo constituída majoritariamente por uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, como xilanas, arabinanas e mananas. Além disso, sua estrutura pode incluir polissacarídeos mais complexos, como arabinoxilanas, glucoarabinoxilanas, arabinogalactanas, arabinoglucuronoxilanas, glucomananas, galactoglucomananas e galactomananas (MENSAH et al., 2023).

Entre esses compostos, a xilana é o polissacarídeo predominante da hemicelulose, sendo também o segundo mais abundante nos vegetais e uma das três principais fontes de carbono orgânico renovável. Estruturalmente, a xilana apresenta uma cadeia linear composta por unidades de xilose unidas por ligações glicosídicas β -(1,4), contendo ainda ramificações de pentoses e hexoses (CUNHA et al., 2020).

3.4.3 Lignina

A lignina é um polímero aromático natural, constituído por unidades de fenilpropano, e está entre os componentes mais abundantes da natureza. É responsável por conferir rigidez à parede celular das plantas, estando covalentemente ligada à xilana da hemicelulose por meio de ligações do tipo éster, formando uma rede complexa que envolve tanto a hemicelulose quanto as microfibrilas de celulose (SINGHANIA et al., 2022).

Nas madeiras macias, a lignina é composta predominantemente por unidades de guaiacil, enquanto em plantas anuais podem estar presentes, além dessas, unidades de p-hidroxifenilo. As unidades fenilpropanóides conectam-se por meio de uma rede heterogênea de ligações éter e carbono-carbono, resultando em uma estrutura altamente recalcitrante (JONSSON; MARTÍN, 2016).

A principal função da lignina é conferir rigidez e resistência mecânica aos tecidos vegetais, além de evitar o colapso dos elementos de condução de água. Adicionalmente, atua como barreira protetora contra o ataque de microrganismos celulolíticos, preservando a integridade da parede celular. Assim, ao interligar os componentes da parede celular, a lignina é determinante para a estabilidade estrutural da biomassa lignocelulósica (JONSSON; MARTÍN, 2016).

A lignina presente na biomassa vegetal, representa uma barreira estrutural e química significativa à bioconversão de biomassa lignocelulósica em bioetanol, devido à sua função na parede celular vegetal. Este polímero aromático complexo envolve e interliga as microfibrilas de celulose e a hemicelulose, conferindo rigidez, impermeabilidade e resistência mecânica à planta. Essa matriz tridimensional densa dificulta a penetração de enzimas hidrolíticas, limitando a eficiência da degradação dos polissacarídeos em açúcares fermentáveis. Além disso, a lignina estabelece ligações covalentes com a hemicelulose, tornando a separação dos componentes mais difícil, e pode gerar compostos fenólicos durante o pré-tratamento que inibem microrganismos fermentadores. Como consequência, a presença de lignina exige pré-tratamentos severos e onerosos, aumenta a formação de inibidores e reduz a eficiência enzimática, tornando a conversão de biomassa em bioetanol um processo desafiador tanto do ponto de vista técnico quanto econômico.

3.5 HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

3.5.1 Pré-tratamento

Os resíduos lignocelulósicos são constituídos por celulose, hemicelulose e lignina, formando uma estrutura complexa e rígida que dificulta o aproveitamento da celulose como fonte de carbono para a produção de bioetanol. Para viabilizar esse processo, torna-se necessário o emprego de um pré-tratamento, cujo objetivo é reduzir o grau de cristalinidade da celulose e desestabilizar a matriz lignocelulósica (Figura 2). Dessa forma, o pré-tratamento favorece a hidrólise da celulose, aumentando a acessibilidade a reagentes, catalisadores e enzimas, e, conseqüentemente, a liberação de carboidratos fermentescíveis (MALIK et al., 2022; MENSAH et al., 2023).

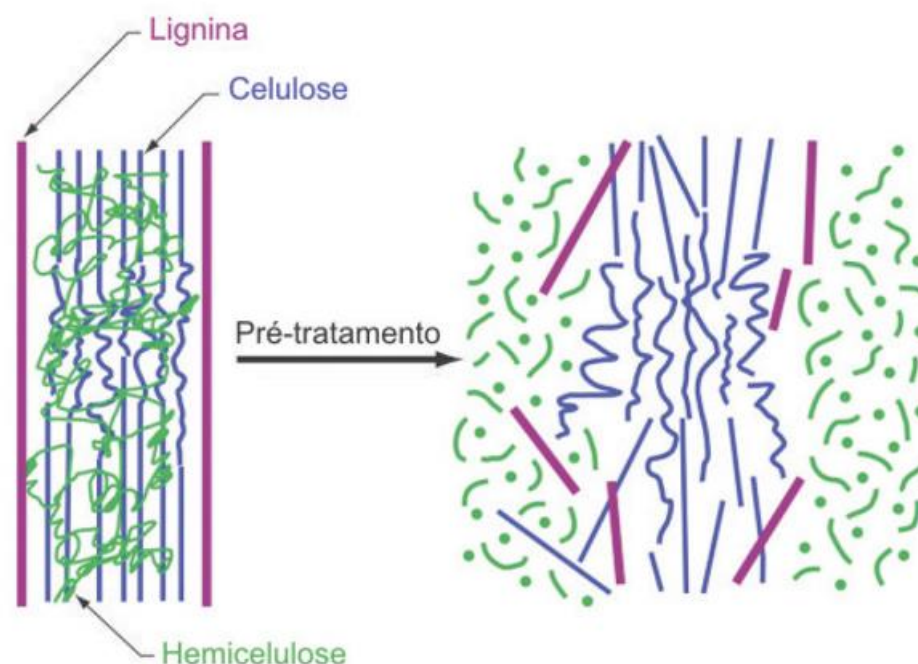


Figura 2: Efeito do pré-tratamento na liberação de açúcares para fermentação. Fonte: SANTOS et al.2012.

Existem vários métodos de pré-tratamento e têm sido propostos para se utilizar na degradação do complexo lignocelulósico, constituído por uma matriz de celulose e lignina ligada por cadeias de hemicelulose (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Os métodos propostos podem ser químicos, físicos, físico-químicos e biológicos, ou uma combinação destes, visando à liberação dos açúcares fermentescíveis presentes nos resíduos lignocelulósicos.

Os métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica apresentam diferentes vantagens e limitações, dependendo da abordagem adotada. Os pré-tratamentos químicos, como os que utilizam ácidos e bases, são eficientes na solubilização da hemicelulose e na quebra da

lignina, promovendo alta liberação de açúcares fermentescíveis; no entanto, podem gerar inibidores de fermentação e demandar tratamento de efluentes, aumentando custos ambientais e operacionais (VYAS et al., 2018). Os pré-tratamentos físicos, como moagem, radiação ou ultrassom, apresentam menor impacto químico e evitam a formação de inibidores, mas frequentemente exigem alto consumo energético e equipamentos especializados (CHEIN et al., 2015). Métodos físico-químicos, como a explosão a vapor ou o tratamento com CO₂ supercrítico, combinam eficiência na desestruturação da lignina com menor produção de subprodutos tóxicos, representando atualmente uma das abordagens mais promissoras para escala industrial (KUMAR, 2020; KARISHMA et al., 2022). Por fim, os pré-tratamentos biológicos, baseados na ação de microrganismos ou enzimas lignolíticas, apresentam baixo consumo de energia e maior seletividade, sendo ambientalmente sustentáveis (DENG et al., 2023). Entre essas estratégias, os métodos que combinam técnicas físico-químicas com a utilização de enzimas lignolíticas estão em maior perspectiva de desenvolvimento, pois permitem otimizar a eficiência da sacarificação, reduzir a formação de inibidores e viabilizar processos mais sustentáveis para produção de biocombustíveis e bioprodutos (AGUIAR e FERRAZ, 2011).

3.6 ENZIMAS LIGNOLÍTICAS

As enzimas ligninolíticas, ou ligninases, são responsáveis pela degradação da lignina por meio de reações de oxirredução, desempenhando papel fundamental no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Entre as principais classes destacam-se as lacases (Lac) e as peroxidases (Per), com ênfase para a manganês peroxidase (MnP) e a lignina peroxidase (LiP), conforme ilustrado na Figura 3.

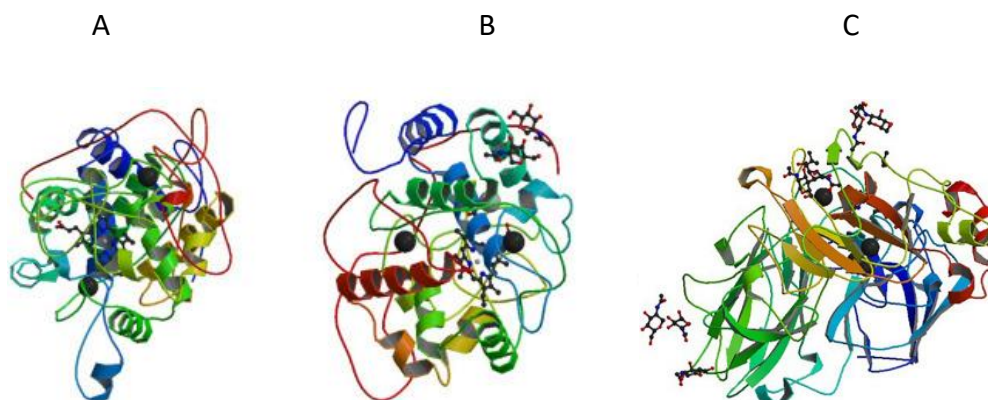


Figura 3: Estrutura tridimensional de uma Lignina peroxidase (EC 1.11.1.14 (A) de *Phanerochaete chrysosporium*), Mangânes peroxidase (EC 1.11.1.13) (B) de *Phanerochaete chrysosporium* e uma Lacase (EC 1.10.3.2) (C) de *Trametes versicolor*. Fonte: KUMAR et al., 2020.

3.6.1 Lignina peroxidase

A lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14) foi identificada pela primeira vez em 1984, em culturas do fungo *Phanerochaete chrysosporium* (TIEN; KIRK, 1984). Trata-se de uma glicoproteína que contém de 20 a 30% de açúcares, apresenta ferro como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para sua atividade catalítica. Sua massa molecular varia entre 38 e 43 kDa, com ponto isoelétrico entre 3,2 e 4,0, e pH ótimo de atividade em torno de 3,0. A produção de LiP ocorre durante o metabolismo secundário do fungo, em condições de limitação nutricional (MOREIRA, 2006; HOLZAPFEL, 2020).

A LiP atua na oxidação de grupos não fenólicos da lignina e de compostos aromáticos estruturalmente relacionados. Seu papel na lignólise consiste em transformar fragmentos de lignina previamente liberados pela ação da manganês peroxidase (MnP) (DE SOUZA et al., 2024). A enzima contém um grupo prostético heme, cuja atividade depende da presença de H_2O_2 : inicialmente, o peróxido oxida a enzima, e o intermediário resultante extrai um elétron de núcleos aromáticos, formando radicais arila que se decompõem espontaneamente por vias iônicas e radicalares (KIRK; FARREL, 1987).

Esse mecanismo possibilita a oxidação de compostos aromáticos não fenólicos de alto potencial redox, gerando radicais catiônicos como intermediários. A LiP promove a quebra das

ligações C α –C β da cadeia propílica de modelos de lignina, promovendo a despolimerização *in vivo*. Além disso, é capaz de catalisar a oxidação do álcool veratrílico a aldeído, reação frequentemente utilizada como marcador da sua atividade (SILVA et al., 2018).

3.6.2 Lacases

As lacases (EC 1.10.3.2) são oxidorredutases pertencentes ao grupo das proteínas multicobre, descritas em plantas, fungos, insetos, bactérias e arqueas (MAYER; MORENO, 2015). Essas enzimas possuem quatro átomos de cobre em seu sítio ativo, os quais participam da redução do oxigênio molecular à água. Embora apresentem menor potencial redox em comparação com outras enzimas ligninolíticas, as lacases fúngicas possuem maior potencial redox do que as lacases bacterianas (AGRAWAL et al., 2018).

Majoritariamente extracelulares, as lacases oxidam diversos compostos aromáticos e não aromáticos, incluindo fenóis, anilinas, alguns íons inorgânicos e uma variedade de compostos não fenólicos. O mecanismo catalítico envolve a abstração de um elétron de fenóis, concomitante à redução de Cu²⁺ a Cu¹⁺, que por sua vez reduz o oxigênio a água, permitindo o ciclo catalítico da enzima. Por depender apenas do oxigênio molecular para oxidar uma ampla gama de substratos, as lacases são consideradas “catalisadores verdes” na biotecnologia.

A oxidação de compostos aromáticos não fenólicos ocorre por meio da ação de mediadores, que podem ser sintéticos, como 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT) e 2,6-dimetoxifenol (DMP), ou naturais, como metil-siringato (MeS), siringaldeído, ácido p-cumárico e vanilina. Nesses casos, o mediador oxidado transfere elétrons ao substrato alvo, sendo novamente reduzido, completando o ciclo catalítico (AGRAWAL et al., 2018).

3.6.3 Manganês peroxidases

As manganês peroxidases (MnPs; EC 1.11.1.13) (Figura 4) são enzimas dependentes de Mn²⁺, contendo ferro como grupo prostético, e atuam especificamente na oxidação de estruturas fenólicas. A atividade da enzima requer a presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), catalisando a oxidação de Mn²⁺ a Mn³⁺. O Mn³⁺ formado atua como um mediador que oxida

diversos compostos fenólicos do substrato, incluindo fenóis livres liberados durante a despolimerização da lignina (AGUIAR FERRAZ, 2017).

A principal função do Mn^{3+} é promover a oxidação e degradação direta da lignina, catalisando a clivagem de ligações alquil-arilo e a oxidação de α -carbono de fenóis. Nos fungos, a MnP é secretada para o meio extracelular, de modo que a degradação da lignina ocorre fora da célula. Além disso, a enzima purificada é capaz de despolimerizar ligninas sintéticas e degradar cloroligninas, demonstrando sua ampla aplicabilidade na biocatálise de biomassa lignocelulósica.

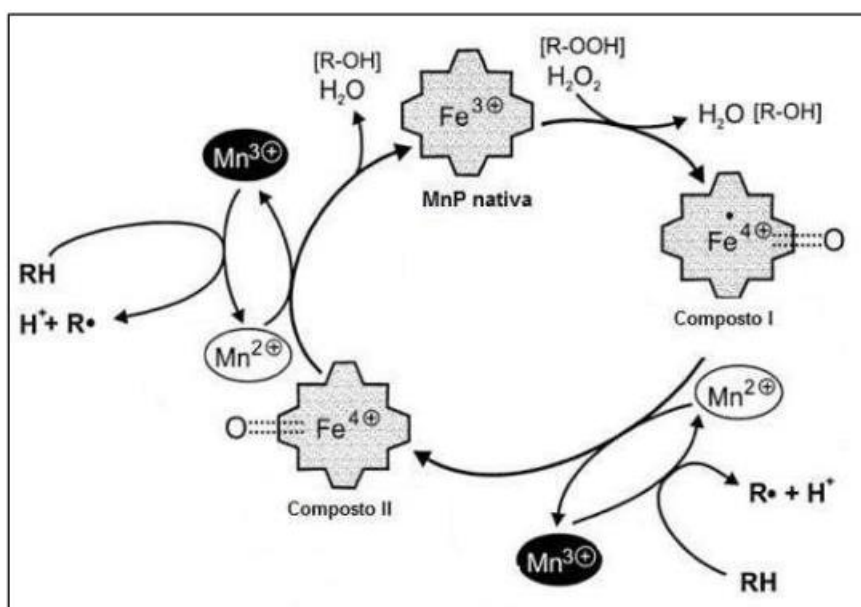


Figura 4: Ciclo catalítico da Manganês Peroxidase. Fonte: CARVALHO (2005).

3.7 GANODERMA sp.

Ganoderma sp. (Figura 5) é um gênero de cogumelo que pertence à Classe Basidiomycetes, Família Ganodermataceae, sendo popularmente conhecida como Lingzhi na China; Reishi, Mannentake ou Sachitake no Japão e Youngzi na Coreia (MILES, 2014). Denominado também de Cogumelo Rei no Brasil, tem sido objeto de estudo em diversas partes do mundo devido às suas propriedades medicinais (ROSADO, 2019). Além de suas

propriedades medicinais, *Ganoderma* spp. também é um agente biorremediador de diversos poluentes emergentes.

Este gênero tem ampla distribuição mundial, está incluído no grupo dos fungos de decomposição branca, e na natureza ocorre crescendo como parasita ou sapróbio em uma variedade de espécies vegetais (NURUL-ALIYAA et al., 2023; DE SOUZA et al., 1999). Além disso, é capaz de sintetizar três importantes enzimas extracelulares, lacase (EC 1.10.3.2), lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) e manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) para degradação da lignina (STAJIĆ et al., 2010). No entanto, nem todas as cepas de *Ganoderma* podem produzir essas enzimas ao mesmo tempo, no qual podem secretar apenas uma ou duas delas. Dessa forma, os tipos de enzimas produzidas são influenciados pelo tipo de espécie, composição do meio e condições de cultura.



Figura 5: Fungo *Ganoderma* sp, basidiomiceto amplamente estudado por suas propriedades terapêuticas e bioativas. Fonte: BENZIE (2018).

O gênero apresenta uma alta diversidade, em que várias espécies já foram descritas, *G. australe*, *G. boninense*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, e etc (AGUDELO-VALENCIA et al., 2019), o que aumenta as diversas possibilidades investigativas para a produção de enzimas, quantidades e a especificidade do meio. Segundo Adaskaveg et al., ao cultivar seis espécies distintas de *Ganoderma*, de diferentes hospedeiros, chegou à conclusão de que diferentes cepas

de *Ganoderma* têm habilidades variadas para gerar enzimas ligninolíticas. No meio especificado sem quaisquer outros componentes suplementares, *Ganoderma* spp. só pode produzir Lac, enquanto baixos níveis de MnP foram detectados nos produtos de fermentação de uma *cepa de Ganoderma* cultivada com serragem de madeiras, porém nenhuma LiP foi detectada.

Lee et al. (2020) mencionaram que a produção de *Ganoderma* é feita tradicionalmente em culturas sólidas, utilizando-se comumente grãos, serragem ou madeira como substratos. Entretanto, existe uma variedade de substratos alternativos que pode ser empregada no cultivo da espécie, como por exemplo, bagaço de cana, soro de queijo, resíduos da folha de abacaxi, de soja, de chá e do processamento de frutos do mar (SHI et al., 2013). Assim, os trabalhos realizados com *Ganoderma* sp tem como foco explorar os componentes que são produzidos por esses fungos, como as enzimas lignocelulósicas e compostos bioativos que apresentam relevantes papéis nas atividades biotecnológicas.

Além disso, o gênero *Ganoderma*, destaca-se na biotecnologia ambiental e na conversão de biomassa devido à sua capacidade de produzir enzimas ligninolíticas extracelulares, como a manganês peroxidase (MnP), a lignina peroxidase (LiP) e a lacase (Lac) (HO et al., 2020). Essas enzimas desempenham um papel crucial na degradação da lignina, um dos principais obstáculos à conversão eficiente de biomassa lignocelulósica em bioetanol, devido à sua estrutura complexa e resistência à hidrólise enzimática (KUMAR et al., 2020). A MnP, em particular, utiliza íons Mn (II) e peróxido de hidrogênio para oxidar compostos fenólicos presentes na lignina, facilitando sua quebra e tornando os açúcares subjacentes mais acessíveis para fermentação (ZHAO et al., 2020). Estudos demonstram que *Ganoderma lucidum* pode ser cultivado em substratos lignocelulósicos, como folhas de abacaxi, por meio de fermentação em estado sólido, resultando em uma produção significativa dessas enzimas (HARIHARAN, 2013). Além disso, a otimização de parâmetros de cultivo, como período de incubação e adição de surfactantes, tem sido explorada para aumentar a produção enzimática e a eficiência na degradação da lignina (PADMAN, 2012). Portanto, *Ganoderma* representa uma fonte promissora para o desenvolvimento de processos biotecnológicos sustentáveis voltados para a produção de bioetanol e a valorização de resíduos lignocelulósicos.

3.8 APLICAÇÕES DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS

As enzimas ligninolíticas extracelulares têm enorme potencial para aplicações industriais em diversas áreas, incluindo processamento de alimentos, degradação e desintoxicação de celulose, na indústria têxteis, efluentes de destilaria e biossíntese de vários produtos químicos e produção de biocombustíveis (FALADE et al., 2017; MACIEL ET AL., 2010). O sistema mediador de lacase foi relatado para despolimerização de lignina; deslignificar polpas de madeira, branqueamento de polpas kraft como aplicações potenciais na indústria de celulose e papel (JASPERS et al., 1994). Além disso, LiP e MnP participam da degradação de efluentes de fábricas de papel. Na indústria alimentícia, a lacase pode ser utilizada em determinados processos que melhoram a aparência, cor de alimentos, bebidas e eliminam os compostos fenólicos indesejáveis. Além disso, MnPs e LiPs têm papel potencial na produção de sabores aromáticos (BARBOSA et al., 2008). Na indústria têxtil, a lacase, o LiP e o MnP são utilizados para degradação de corantes e branqueamento de resíduos gerados nas indústrias.

O papel principal da lacase, LiP e MnP está na biodegradação de vários hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e compostos xenobióticos (SINGH et al., 2023). Seu papel também tem sido visto na fabricação de utensílios médicos e farmacêuticos, bem como na produção de polímeros, acoplamento de fenóis e esteróides, síntese de produtos naturais complexos, produtos de higiene pessoal, biossensores e áreas de biorepórteres (maciel et al., 2010).

O mais importante foi relatado na conversão de resíduos de biomassa lignocelulósica em produtos de valor agregado, como rações animais, celulose, papel, biocombustíveis, e diversas enzimas (BINOD et al., 2019). Além disso, como biorremediadores de componentes tóxicos que muitas vezes fazem parte de efluentes industriais, tornando-os um problema ambiental de difícil tratamento. Neste sentido, microrganismos produtores de ligninases podem ser aplicados na descontaminação, por possuírem capacidade de quebrar moléculas xenobioticas em estruturas que podem ser menos toxicas, por ligar em nanoparticulas magnéticas amino-funcionalizadas, corantes têxteis, fármacos aromáticos e outros (BONUGLI-SANTOS et al., 2015).

3.9 APLICAÇÃO DA BIOINFORMÁTICA NO ESTUDO DE PROTEÍNAS

As técnicas de bioinformática possibilitam compreender, organizar e explorar, em larga escala, informações estruturais associadas a biomoléculas (LUSCOMBE et al., 2001). Essa área envolve o desenvolvimento de programas computacionais voltados ao tratamento de dados biológicos já existentes, permitindo a identificação de sequências gênicas, a predição da configuração tridimensional de proteínas, a detecção de inibidores enzimáticos, entre outras aplicações (DE ARAÚJO et al., 2008). Entre os diversos ramos da bioinformática, destaca-se o estudo da relação entre a estrutura primária e a estrutura tridimensional das proteínas, visto que a função de uma proteína depende diretamente de sua conformação (GOLDING, 2003).

As proteínas apresentam organização estrutural bastante complexa, sendo classificadas em quatro níveis: primário, secundário, terciário e quaternário. Essas estruturas estão intimamente relacionadas à função desempenhada, uma vez que sua atividade biológica depende da capacidade de reconhecer e interagir com diferentes moléculas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2003). Como essa funcionalidade é determinada pela estrutura primária, qualquer alteração em sua sequência pode resultar em uma proteína incapaz de exercer sua função adequadamente (KHAN, 2017).

Embora essenciais, tais análises experimentais costumam ser dispendiosas e de difícil execução. Como alternativa, a modelagem comparativa surge como uma estratégia *in silico* para determinar a estrutura proteica (MATAYOSHICALIXTO, 2014). Esse método baseia-se no conceito de evolução molecular, considerando que a conformação de uma proteína é geralmente mais conservada que sua sequência de aminoácidos ao longo do processo evolutivo. Assim, pequenas alterações na sequência tendem a produzir apenas modificações sutis na estrutura tridimensional (SILVA, 2007).

A modelagem comparativa constitui, portanto, uma ferramenta de predição estrutural fundamentada em princípios evolutivos observados em nível molecular. Suas premissas incluem: a equivalência entre sequências de aminoácidos implica semelhança estrutural e funcional; proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas, compostas principalmente por elementos de estrutura secundária, como α -hélices e fitas- β ; e as principais variações estruturais entre proteínas homólogas concentram-se nas regiões externas, formadas principalmente por alças, responsáveis por conectar os elementos de estrutura secundária (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

3.10 CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante na década de 70, novos procedimentos foram desenvolvidos permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos num processo chamado clonagem gênica, o que permite a expressão de proteínas a partir de células que não as produzem naturalmente (GARDNER, 2021).

Esta tecnologia tem uma ampla aplicação que vem permitindo o isolamento e o estudo da regulação da expressão gênica de centenas de organismos eucariontes, recombinação gênica entre espécies distintas, estudos de genes humanos cujos alelos mutantes conferem algum distúrbio, genes associados ao desenvolvimento embrionário, genes relacionados a apoptose, inferências de estrutura e funcionalidade de proteínas entre outras. A tecnologia do DNA recombinante também é uma potente alternativa que permite o melhoramento genético de espécies de valor biotecnológico (ASTOLFI- FILHO et al., 2019; LOZANO TEROL et al., 2021).

Escherichia coli é um dos principais sistemas escolhidos para expressão de proteínas recombinantes. Sua manipulação está bem estabelecida e por isso tornou-se a plataforma de expressão mais utilizada. Diante disso, muitos protocolos e ferramentas tornaram-se disponíveis para produção de proteínas heterólogas, como por exemplo, um vasto catálogo de plasmídeos de expressão, um grande número de cepas manipuladas para produzir proteínas com diferentes características moleculares e muitas estratégias de cultivo (ZELENA et al. 2014). As vantagens de usar *E. coli* como sistema hospedeiro são bem conhecidas. Em condições ambientais ótimas, em cerca de 20 minutos a população celular duplica. Além disso, culturas de alta densidade celular são facilmente alcançadas, meios complexos podem ser preparados facilmente com componentes disponíveis e baratos e a transformação com DNA exógeno é rápida e fácil (LEE et al., 1996; POPE e KENT, 1996; SEZONOV et al., 2007).

Os fungos são reconhecidos na literatura por produzirem diversas enzimas extracelulares, em comparação com outros microrganismos, no entanto seus níveis de expressão em escala industrial, não são satisfatórios. Além disso, apresentam dificuldade no processo de cultivo com períodos longos de fermentação, purificação enzimática complexa, devido isoenzimas presentes, logo a expressão heteróloga pode ser a técnica mais adequada para produção em larga de diversas proteínas, devido à impossibilidade de obter rendimentos satisfatórios de fontes naturais (KAUR, 2018; GARDNER, 2021). O gene pode ser expresso

em hospedeiros procariotos e eucariotos, cada um apresentando suas vantagens e desvantagens que podem impactar na enzima produzida.

A bactéria *E. coli* tem sido utilizada para o sistema heterólogo por ser facilmente modificada geneticamente e produzir grandes quantidades de proteínas recombinantes em sistemas de cultivo economicamente viável, e com produção em alta escala, favorecendo o mercado industrial (ZELENA et al., 2014). Para viabilizar a produção de proteínas recombinantes alguns critérios são essenciais, tais como: a facilidade na manipulação do hospedeiro; a estabilidade e solubilidade da proteína; velocidade e rendimento da purificação.

Diante disso, muitos protocolos e ferramentas tornaram-se disponíveis para produção de proteínas heterólogas, como por exemplo, um vasto catálogo de plasmídeos de expressão, um grande número de cepas manipuladas para produzir proteínas com diferentes características moleculares e muitas estratégias de cultivo.

As células BL21(DE3) e suas variantes competentes são estirpes de uso geral para expressão proteica de alto nível e fácil indução. Essas estirpes apresentam uma fonte de T7 RNA polimerase na célula hospedeira, que direcionam para altos níveis de expressão, como por exemplo, os vetores pET. Derivadas de *E. coli* B, estas cepas de expressão são naturalmente carentes da protease Lon que podem degradar proteínas recombinantes e são modificadas para serem deficientes para uma segunda protease, a OmpT (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015).

Os vetores são veículos de clonagem utilizados pela engenharia genética para introduzir DNA exógeno para dentro de um hospedeiro (WAEGEMAN & SOETAERT, 2011; OVERTO, 2014). Com exceção dos vetores que se integram no genoma da bactéria, a grande maioria são moléculas com replicação independente e que apresentam marca de seleção, sítios únicos para enzimas de restrição que facilitam a sua ligação ao DNA exógeno (ASTOLFI-FILHO, 1985). Os elementos essenciais presentes nos plasmídeos são: uma região com origem de replicação, marcadores a antibióticos que garantem resistência, um promotor da transcrição, com ou sem região iniciadora e uma região terminadora da transcrição.

Dentre os vetores, destaca-se o sistema pET, é o sistema mais utilizado para o desenvolvimento da clonagem, os genes alvo são clonados em plasmídeos pET sobre forte controle de transcrição. A expressão é induzida fornecendo uma fonte de T7 RNA polimerase, oriunda do profago (DE3) apresentando alta capacidade de expressão na célula hospedeira. A

T7 RNA polimerase é tão seletiva e ativa que quando induzida totalmente quase todos os recursos celulares são convertidos em expressão do gene alvo, controlada pelo indutor IPTG, (Isopropil- β -D-thiogalactopiranosideo).

Após a seleção da estirpe e do plasmídeo para a produção da proteína de interesse, não há como garantir que a proteína será expressa em condições favoráveis. Portanto podem ser feitas otimizações no processo de produção para que o mesmo seja melhorado, através de protocolos que possam garantir no resultado final, uma proteína ativa quanto a sua atividade biológica.

A expressão heteróloga de MnP apresenta diversas limitações, discutida na literatura, alguns trabalhos abordam diferentes estratégias para a expressão recombinante de manganês peroxidases (MnPs) em *Escherichia coli*, com o objetivo de superar as limitações impostas pela baixa produção e dificuldade de obtenção dessas enzimas em sua forma ativa. Wang et al. (2016) demonstraram que tanto a proteína solúvel quanto a insolúvel podem ser funcionais, mas que a forma solúvel preserva melhor a conformação e influenciando de forma direta na atividade catalítica. Pech-canul et al. (2020) avançaram nesse conceito ao utilizar *E. coli* T7 associada à otimização de códons, garantindo a correta formação de pontes dissulfeto e obtendo uma enzima ativa e purificada em uma única etapa. Alfi et al. (2018), por sua vez, alcançaram uma produção até 20 vezes superior à descrita anteriormente, combinando estratégias de otimização de códons, e coexpressão de chaperonas.

Por outro lado, Ho et al. (2020) não buscaram expressão heteróloga, mas sim a caracterização de genes de MnP em *Ganoderma boninense*, analisando sua regulação por diferentes condições ambientais e diferentes fitohormônios. Embora não tenham produzido a enzima em *E. coli*, esse trabalho forneceu sequências e informações regulatórias valiosas que podem servir de base para futuros estudos de clonagem e expressão em sistemas bacterianos. Em conjunto, esses trabalhos mostram a evolução metodológica da produção de MnP recombinante, desde comparações entre formas solúveis e renaturadas até a implementação de estratégias que aumentam rendimento, solubilidade e funcionalidade, abrindo caminho para aplicações industriais e para exploração de novas fontes genéticas, como a de *G. boninense*.

O estudo da expressão recombinante de manganês peroxidases (MnPs) de *Ganoderma boninense* em *Escherichia coli* apresenta grande relevância científica e biotecnológica,

sobretudo porque, até o momento, não há relatos na literatura. A produção recombinante dessas enzimas em *E. coli* permitiria não apenas investigar seus mecanismos de ação e regulação, mas também viabilizar sua obtenção em larga escala, superando as dificuldades de cultivo do hospedeiro nativo. Além disso, considerando o sucesso de estratégias já aplicadas em MnPs de outras espécies como otimização de códons, coexpressão de chaperonas e suplementação de heme, a aplicação dessas metodologias em genes de *G. boninense* representa uma oportunidade inédita para ampliar MnPs recombinantes disponíveis.

4.REFERÊNCIAS

ABO BO, GAO M, WANG Y, WU C, MA H, WANG Q. Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. **Rev Environ Health**. 2019.

AGRAWAL KOMAL, NISHA BHARDWAJ, BIKASH KUMAR, VENKATESH CHATURVEDI, PRADEEP VERMA, Process optimization, purification and characterization of alkaline stable white laccase from *Myrothecium verrucaria* ITCC-8447 and its application in delignification of agroresidues, **International Journal of Biological Macromolecules**, V. 125, 2019.

AGUDELO-VALENCIA, Rafael Nikolay et al. Remoción de sulfuros presentes en el agua residual del proceso de curtido mediante cavitación hidrodinámica. **Rev. Ion**. 2019, vol.32.

AGUIAR, A. AND FERRAZ, A. (2011) Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, 34, 1729-1738.

ALFI A, ZHU B, DAMNJANOVIĆ J, KOJIMA T, IWASAKI Y, NAKANO H. Production of active manganese peroxidase in *Escherichia coli* by co-expression of chaperones and in vitro maturation by ATP-dependent chaperone release. **J Biosci Bioeng**. 2019.

ASEMOLOYE, M.D., MARCHISIO, M.A., GUPTA, V.K. et al. Genome-based engineering of ligninolytic enzymes in fungi. **Microb Cell Fact**, 2021.

BAYAT, Ardesbir. Bioinformatics.(Science, Medicine, and the Future). **British Medical Journal**, v. 324, n. 7344, p. 1018-1023, 2002.

BINOD PARAMESWARAN, EDGARD GNANSOUNOU, RAVEENDRAN SINDHU, ASHOK PANDEY, Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives, **Bioresource Technology Reports**, V 5, 2019.

BONUGLI-SANTOS RC, DOS SANTOS VASCONCELOS MR, PASSARINI MR, VIEIRA GA, LOPES VC, MAINARDI PH, DOS SANTOS JA, DE AZEVEDO DUARTE L, OTERO IV, DA SILVA YOSHIDA AM, FEITOSA VA, PESSOA A JR, SETTE LD. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Front Microbiol**. 2015

CHEN HZ, LIU ZH. Steam explosion and its combinatorial pretreatment refining technology of plant biomass to bio-based products. **Biotechnol J**. 2015.

Cunha JT, Romaní A, Inokuma K, Johansson B, Hasunuma T, Kondo A, Domingues L. Consolidated bioprocessing of corn cob-derived hemicellulose: engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* as efficient whole cell biocatalysts. **Biotechnol Biofuels**. 2020.

CURRAN, LAURE M.C. LEYNAUD KIEFFER, LE THANH MAI PHAM, KENNETH L. SALE, BLAKE A. SIMMONS, Review of advances in the development of laccases for the valorization of lignin to enable the production of lignocellulosic biofuels and bioproducts, **Biotechnology Advances**, v. 54, 2022.

- DE SOUSA IAL, BOARI AJ, SANTOS AS. Ligninolytic enzyme potential of *Trametes* spp. associated with leaf litter in riparian forest of the Amazônia region. **Braz J Biol.** 2024.
- DENG WEIPING, YUNCHAO FENG, JIE FU, HAIWEI GUO, YONG GUO, BUXING HAN, ZHICHENG JIANG, LINGZHAO KONG, CHANGZHI LI, HAICHAO LIU, PHUC T.T. NGUYEN, PUNING REN, FENG WANG, SHUAI WANG, YANQIN WANG, YE WANG, SIE SHING WONG, KAI YAN, NING YAN, XIAOFEI YANG, YUANBAO ZHANG, ZHANRONG ZHANG, XIANHAI ZENG, HUI ZHOU, Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into chemicals and fuels, **Green Energy & Environment**, V. 8, 2023.
- D'SOUZA TM, MERRITT CS, REDDY CA. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl Environ Microbiol.* 1999.
- FALADE AO, NWODO UU, IWERIEBOR BC, GREEN E, MABINYA LV, OKOH AI. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **Microbiologyopen.** 2017.
- GARDNER BHANDARI, B. K, P. P. TISIGNER . improving recombinant protein production. v. 49, n. **March**, p. 654–661, 2021.
- GOLDING, G. B.. DNA and the revolutions of molecular evolution, computational biology, and bioinformatics. **Genome**, v. 46, n. 6, p. 930-935, 2003.
- HO PY, NAMASIVAYAM P, SUNDRAM S, HO CL. Expression of Genes Encoding Manganese Peroxidase and Laccase of *Ganoderma boninense* in Response to Nitrogen Sources, Hydrogen Peroxide and Phytohormones. **Genes** (Basel). 2020.
- ISERHARDT, S V e AZEVEDO, João Lúcio de e ASTOLFI FILHO, S. **Manipulacao genetica visando a expressao em e. Coli de cdna de 2-anilase pancreatico do camundongo.** 1985, Anais.. Ouro Preto: Instituto de Ciencias Exatas e Biologicas, 1985.
- JASPERS, C. , JIMENEZ, G. , & PENNINKX, M. Evidence for a role of Mn peroxidase in the decolorization of kraft pulp bleach plant effluent by *P. chrysosporium*: effects of initial culture conditions on enzyme production. **Journal of Biotechnology**, 1994.
- KARISHMA S, SARAVANAN A, SENTHIL KUMAR P, RANGASAMY G. Sustainable production of biohydrogen from algae biomass: Critical review on pretreatment methods, mechanism and challenges. **Bioresour Technol.** 2022.
- KHAN, Rizwan Hasan; SIDDIQI, Mohammad Khursheed; SALAHUDDIN, Parveen. Protein structure and function. **Basic Biochemistry**, p. 1-39, 2017.
- KIRK TK, FARRELL RL. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol.* 1987.
- KUMAR A, CHANDRA R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon.** 2020.
- LEE, JEEWON. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56,p.1-24, jul. 1997.
- LEIF J. JÖNSSON, CARLOS MARTÍN, Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects, **Bioresource Technology**, V. 199, 2016.

LI C, ZHANG R, WANG J, WILSON LM, YAN Y. Protein engineering for improving and diversifying natural product biosynthesis. **Trends Biotechnol.** 2020.

LIN MI, NAGATA T, KATAHIRA M. High yield production of fungal manganese peroxidases by *E. coli* through soluble expression, and examination of the activities. **Protein Expr Purif.** 2018.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, DOV; GERSTEIN, MARK. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. **Methods of information in medicine**, v. 40, n. 04, p. 346-358, 2001.

MALIK KAMRAN, PRIYANKA SHARMA, YULU YANG, PENG ZHANG, LIHONG ZHANG, XIAOHONG XING, JIANWEI YUE, ZHONGZHONG SONG, LAN NAN, SU YUJUN, MARWA M. EL-DALATONY, EL-SAYED SALAMA, XIANGKAI LI, Lignocellulosic biomass for bioethanol: Insight into the advanced pretreatment and fermentation approaches, **Industrial Crops and Products**, v. 188, 2022.

MANOJKUMAR NARASIMHAN, CHANDRASEKARAN MUTHUKUMARAN, GOVINDASAMY SHARMILA, A comprehensive review on the application of response surface methodology for optimization of biodiesel production using different oil sources, **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, V. 34, 2022.

MENSAH RICHARD Q., NAIYASIT YINGKAMHAENG, PONNUSAMI VENKATACHALAM, PAU-LOKE SHOW, SOLANGE I. MUSSATTO, MALINEE SRIARIYANUN, PRAKIT SUKYAI, PRAMUK PARAKULSUKSATID, KITTIPONG RATTANAPORN, Application of green produced xylooligosaccharides from sugarcane residues and their properties – Recent progress towards sustainability, **Bioresource Technology Reports**, V 23, 2023.

NURUL-ALIYAA YA, AWANG NA, MOHD MH. Characterization of white rot fungi from wood decayed for lignin degradation. **Lett Appl Microbiol.** 2023.

PASSOS, J. M. S. **ISOMERIZAÇÃO DA GLICOSE EM FRUTOSE UTILIZANDO ÓXIDO DE MOLIBDÊNIO COMERCIAL COMO CATALISADOR.** RECIFE, UFPE, 2024.

PECH-CANUL AC, CARRILLO-CAMPOS J, BALLINAS-CASARRUBIAS ML, SOLIS-OVIEDO RL, HERNÁNDEZ-RASCÓN SK, HERNÁNDEZ-OCHOA LR, GUTIÉRREZ-MÉNDEZ N, GARCÍA-TRIANA A. Functional Expression and One-Step Protein Purification of Manganese Peroxidase 1 (rMnP1) from *Phanerochaete chrysosporium* Using the *E. coli*-Expression System. **Int J Mol Sci.** 2020.

PERIYASAMY, SELVAKUMAR J. BEULA ISABEL, S. KAVITHA, V. KARTHIK, BADR A. MOHAMED, DESTA GETACHEW GIZAW, P. SIVASHANMUGAM, TEJRAJ M. AMINABHAVI, Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol – A review, **Chemical Engineering Journal**, V. 453, P. 139783, 2023.

RAVINDRAN R, JAISWAL AK. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. **Trends Biotechnol.** 2016.

SINGH A. K., IQBAL H. M. N., CARDULLO N., MUCCILLI V., FERNÁNDEZ-LUCAS J., SCHMIDT J. Structural insights, biocatalytic characteristics, and application prospects of

lignin-modifying enzymes for sustainable biotechnology—A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023.

SINGHANIA REETA RANI, ANIL KUMAR PATEL, TIRATH RAJ, CHIU-WEN CHEN, VINOTH KUMAR PONNUSAMY, NADEEM TAHIR, SANG-HYOUN KIM, CHENG-DI DONG, Lignin valorisation via enzymes: A sustainable approach, **Fuel**, V. 311, 2022.

TIEN M, KIRK TK. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proc Natl Acad Sci** .1984.

VYAS P, KUMAR A, SINGH S. Biomass breakdown: A review on pretreatment, instrumentations and methods. **Front Biosci**. 2018.

WAEGEMAN H, SOETAERT W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 2011.

WANG N, REN K, JIA R, CHEN W, SUN R. Expression of a fungal manganese peroxidase in *Escherichia coli*: a comparison between the soluble and refolded enzymes. **BMC Biotechnol**. 2016.

YANG CHENXIAN, XIN LÜ, Chapter 5 - Composition of plant biomass and its impact on pretreatment, In Woodhead Publishing Series in Energy, Advances in 2nd Generation of Bioethanol Production, **Woodhead Publishing**, 2021.

ZELENA KATERINA, NADINE EISELE, RALF G. BERGER, *Escherichia coli* as a production host for novel enzymes from basidiomycota, **Biotechnology Advances**, V. 32, 2014.

ZHOU Xuan-Wei et al. Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp: current status and potential applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39. 2013.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTRUTURAL DE UMA MANGANÊS PEROXIDASE DE *GANODERMA BONINENSE*

RESUMO

As manganês peroxidases (MnPs) são enzimas essenciais na degradação de compostos aromáticos complexos, como a lignina, o que lhes confere grande relevância biotecnológica em áreas como biorremediação, produção de biocombustíveis e processamento de biomassa. No caso de *Ganoderma boninense*, fungo fitopatogênico de elevado impacto econômico, a compreensão da estrutura e da função de suas MnPs pode contribuir tanto para o entendimento de mecanismos moleculares associados à sua patogenicidade quanto para o aproveitamento dessas enzimas em aplicações industriais. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar estruturalmente uma sequência de manganês peroxidase produzida por *G. boninense*. Para isso, sequências de aminoácidos de MnPs de diferentes espécies de *Ganoderma* sp. foram obtidas na plataforma NCBI e submetidas a alinhamentos múltiplos, a partir dos quais foi construída uma árvore filogenética. Uma das sequências foi selecionada para análises detalhadas, incluindo a validação de sua massa molecular, ponto isoelétrico e sítio ativo. Posteriormente, sua estrutura tridimensional foi modelada com base em uma estrutura molde e avaliada por meio dos parâmetros GMQE (Global Model Quality Estimation) e QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis), que apresentaram valores de 0,93 e -0,58, respectivamente. A estrutura modelada foi ainda comparada com estruturas experimentais da mesma classe de enzimas, evidenciando alta similaridade com a sequência molde. Com base nesses resultados, a MnP analisada foi considerada uma candidata promissora para expressão heteróloga em sua forma ativa.

1.INTRODUÇÃO

O potencial biotecnológico de enzimas tem sido amplamente explorado em diferentes setores industriais (OTHMAN et al., 2023; UNUOFIN et al., 2019). Entre elas, destacam-se as enzimas ligninolíticas, como manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e lacases (Lac), que desempenham papel fundamental na degradação da lignina, um dos principais constituintes recalcitrantes da biomassa vegetal (BINOD et al., 2019). Essas enzimas apresentam amplo potencial de aplicação em processos de biobranqueamento de polpa, e descoloração de efluentes têxteis e industriais, tratamento de poluentes orgânicos persistentes e produção de biocombustíveis de segunda geração, uma vez que aumentam a acessibilidade da celulose à hidrólise enzimática subsequente (BAJPAI et al., 2006; ROTH & KAPICH, 2017).

O uso enzimático na produção de bioetanol tem se mostrado uma alternativa vantajosa e sustentável, pois essas biomoléculas operam em condições de reação brandas, apresentam alta eficiência e especificidade, além de possibilitarem rotas de produção mais simples. Esses fatores contribuem para a redução da geração de resíduos tóxicos e poluentes, além de diminuir o tempo necessário para a realização dos processos (BIKO et al., 2020; CHOI et al., 2015).

Apesar das vantagens, a digestão enzimática ainda enfrenta desafios econômicos para aplicação em larga escala, sendo o alto custo de produção das enzimas um dos principais entraves. Esse fator está associado, em parte, à dependência de importação e à necessidade de aprimoramento constante das formulações comerciais, visando aumentar sua estabilidade e eficiência em condições adversas (LIU et al., 2023; BRANCO et al., 2019). Essas limitações têm impulsionado a busca por novas fontes enzimáticas e o avanço da engenharia de proteínas, com o objetivo de desenvolver biocatalisadores mais robustos, estáveis, eficientes e de menor custo.

Nesse cenário, a biologia estrutural desempenha papel central ao investigar a organização molecular e a dinâmica de macromoléculas biológicas, permitindo compreender como alterações estruturais impactam suas funções. As estruturas proteicas podem ser determinadas por abordagens computacionais, por meio de predição estrutural, fornecendo informações fundamentais para o estudo de interações moleculares e relações estrutura-função. Esses dados são amplamente utilizados pela biotecnologia e pela engenharia de proteínas para

aprimorar propriedades específicas de enzimas de interesse, como termoestabilidade e atividade catalítica (BARYNIN et al., 2001; FERNÁNDEZ-FUEYO et al., 2014).

Assim, o estudo dos mecanismos moleculares de enzimas envolvidas na desconstrução da biomassa lignocelulósica é de grande importância para os setores de biocombustíveis e bioprocessos, pois favorece a inovação tecnológica e viabiliza a produção de catalisadores mais eficientes e de menor custo. Diante da relevância das MnPs, o presente trabalho teve como objetivo identificar, analisar e caracterizar estruturalmente sequências dessa enzima em espécies de *Ganoderma* sp., visando sua futura indicação para expressão heteróloga e aplicação na deslignificação de resíduos lignocelulósicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Busca e análises *in silico* de sequências de MnPs

As sequências de resíduos de aminoácidos das manganês peroxidases (MnPs) de espécies do gênero *Ganoderma* foram obtidas na plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequências gênicas e as proteínas preditas foram analisadas utilizando as ferramentas BLASTx, BLASTn e BLASTp, com o objetivo de identificar similaridades, realizar comparações e fornecer subsídios para análises subsequentes em bioinformática. Foram selecionadas apenas as sequências que apresentaram similaridade superior a 85% em relação às sequências registradas na base de dados.

As características físico-químicas das sequências de MnP de *Ganoderma* sp. foram avaliadas bem como a massa molecular, ponto isoelétrico e sítio ativo, determinado pela a plataforma ExPASy, onde a massa molecular e pI foram estimados na ferramenta “Protparam” e para a identificação e análise da posição do sítio ativo das proteínas em estudo foi utilizado o Software PROSITE (<https://web.expasy.org/protparam/>).

As sequências selecionadas foram submetidas a alinhamentos múltiplos utilizando a plataforma Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), que emprega algoritmos eficientes para a identificação de regiões conservadas e divergentes entre proteínas homólogas. A partir dos alinhamentos obtidos, foi construída uma árvore filogenética no programa MEGA 7, ferramenta amplamente utilizada em estudos sobre a comparação de sequências de interesse.

Essa análise permitiu inferir as similaridades entre as sequências selecionadas, fornecendo informações para avaliar seu grau de homologia, divergência funcional e possíveis relações estruturais, o que é essencial para a compreensão do potencial biotecnológico das enzimas investigadas.

2.2 Construção e análise da estrutura tridimensional por modelagem comparativa da sequência de uma MnP em estudo

A fim de analisar as características estruturais e funcionais da sequência codificante selecionada (MnP-QOW95911.1), foi utilizada a ferramenta Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>), para modelar estruturas proteicas homólogas e a identificação de regiões importantes. O modelo estrutural da proteína foi obtido a partir de uma estrutura molde disponibilizada pela própria ferramenta de modelagem, sendo posteriormente avaliado por meio dos parâmetros GMQE (Global Model Quality Estimation) e QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis). Valores próximos de 1,0 para o GMQE e superiores a -4,0 para o QMEAN indicam a confiabilidade do modelo, refletindo a adequada representação dos principais aspectos estruturais da proteína. Em seguida, a estrutura tridimensional (3D) da enzima manganês peroxidase (MnP-QOW95911.1) foi construída no software PyMOL (<https://pymol.org/2/>) e comparada à estrutura da peroxidase A0A5C2RQX4.1 de *Lentinus tigrinus*, disponibilizada pelo Swiss-Model. Essa comparação permitiu avaliar as similaridades estruturais entre as proteínas, bem como identificar possíveis diferenças funcionais de relevância.

3. RESULTADOS

3.1 Busca e análise das sequências de Mangânes peroxidase de *Ganoderma* sp.

As sequências codificadoras da enzima manganês peroxidase foram obtidas a partir do banco de dados NCBI, considerando apenas aquelas que apresentaram índices de similaridade superiores a 85% e que pertenciam a diferentes espécies de *Ganoderma* sp. Posteriormente, essas sequências foram analisadas quanto às suas propriedades físico-químicas (Tabela 1).

A análise das sequências de manganês peroxidase (MnP) provenientes de diferentes espécies de *Ganoderma* sp. evidenciou um elevado grau de conservação estrutural entre as sequências selecionadas (Tabela 1). Observou-se que a posição do sítio ativo foi preservada, em sua maioria, no resíduo 73 (histidina), indicando forte conservação dessa região catalítica

essencial. Contudo, a sequência KAI1791272.1 de *G. leucocontextum* apresentou uma posição divergente, localizada no resíduo 129, o que pode sugerir alterações conformacionais ou variações nos resíduos de aminoácidos na região do sítio ativo, potencialmente implicando em diferenças funcionais dessa proteína.

Tabela 1: Sequências codificadoras de manganês peroxidase (MnP) de diferentes espécies de *Ganoderma* sp., selecionadas a partir do banco de dados NCBI (similaridade >85%), com respectivos parâmetros físico-químicos.

ACESSO	ESPÉCIE	ENZIMA	SÍTIO ATIVO (posição)	MM* (Da)	pI**
KAI1791340.1	<i>G. leucocontextum</i>	MnP	75	38427,03	4,32
KAI1791272.1	<i>G. leucocontextum</i>	MnP	129	38202,09	4,32
KAI1788396.1	<i>G. leucocontextum</i>	MnP	74	38509,13	4,15
QOW95912.1	<i>G. boninense</i>	MnP	73	38440,70	4,21
QOW95911.1	<i>G. boninense</i>	MnP	73	38316,68	4,23
ABB77244.1	<i>G. australe</i>	MnP	73	38267,78	4,19
ACA48488.1	<i>G. lucidum</i>	MnP	73	38110,55	4,42
CEG62473.1	<i>G. applanatum</i>	MnP	73	38366,87	4,25
CEG62472.1	<i>G. applanatum</i>	MnP	73	38297,76	4,27
ACD44889.1	<i>G. lucidum</i>	MnP	73	38110,55	4,42
BAA88392.1	<i>G. applanatum</i>	MnP	73	38245,73	4,19
ABB77243.1	<i>G. formosanum</i>	MnP	73	38244,69	4,26

*MM: massa molecular; **pI: ponto isoelétrico

A massa molecular (MM) das enzimas não apresentou variações, com valores próximos a 38.110 Da, o que reforça a conservação dessa proteína entre as espécies distintas do gênero *Ganoderma* sp. De modo semelhante, os valores de ponto isoelétrico (pI) situaram-se em uma faixa entre 4,15 e 4,42, indicando caráter predominantemente ácido das sequências analisadas, característica comum às peroxidases fúngicas. Dessa forma, esses resultados sugerem que as MnPs de *Ganoderma* sp. apresentam propriedades físico-químicas altamente conservadas, o que possivelmente reflete a importância funcional dessa enzima na degradação da lignina e em processos fisiológicos associados ao metabolismo secundário desses fungos.

O alinhamento múltiplo (Quadro 1) revelou elevada conservação entre as sequências de MnP analisadas, principalmente nos resíduos localizados na região do sítio ativo. Essa conservação indica que essas sequências podem apresentar o mesmo potencial para a atividade catalítica, uma vez que esses resíduos participam diretamente da coordenação do íon heme e do manganês, essenciais para o mecanismo de oxidação característico dessa enzima.

A presença de regiões conservadas em peroxidases fúngicas reforça a homologia funcional entre as sequências, confirmando que as MnPs de *Ganoderma* compartilham mecanismos catalíticos similares quanto ao nível de espécies.

Quadro 1: Alinhamento múltiplo das sequências de resíduos de aminoácidos de manganês peroxidase (MnP) de espécies de *Ganoderma* sp., obtidas do banco de dados NCBI, com destaque para a região correspondente ao sítio ativo.

KAI1791340.1ganodermaleucocontextum	MFSKFFLSLVVLAASVDAAPVSPASKRTTVACSNKTTA-NDACCVWFVLDLDDIQESLFHG	59
QOW95912.1ganodermaaboninense	MFSKACIAFVVLAAASVAAVPSVRKRT--TCSNGKTTT-NDACCVWFVLDLDDIQENLFHG	57
ACA48488.1ganodermalucidum	MFSKVFLSLVLAASVTAAPVSVSRRA--TCSNGKTTA-NEACCVWFVLDLDDIQENLFHG	57
ACD44889.1ganodermalucidum	MFSKVFLSLVLAASVTAAPVSVSRRA--TCSNGKTTA-NEACCVWFVLDLDDIQENLFHG	57
ABB77243.1ganodermaformosanum	MFSKVFLSLVLAASVAAVPSVRRA--TCSNGKTTA-NDACCVWFVLDLDDIQENLFHG	57
QOW95911.1ganodermaaboninense	MFSKVFFSVVLAASVAAVPPVSRRA--TCANGKTTA-NDACCVWFVLDLDDIQENLFHG	57
ABB77244.1ganodermaaustrale	MFSKVFLSLVLAASVAAVPSVRRA--TCANGKTTA-NDACCVWFVLDLDDIQENLFHG	57
BAA88392.1ganodermaapplanatum	MFSKVFLSLVLAASVAAVPTVGRRA--TCANGKTTA-NDACCVWFVLDLDDIQENLFHG	57
CEG62472.1ganodermaapplanatum	MFSKVFLSLVLAASVAAVPTVSRRA--TCTNGKTTA-NDACCVWFVLDLDDIQENLFHG	57
CEG6247.1ganodermaapplanatum	MFSKVFLSLVLAASVAAVPTVSRRA--TCTNGKTTA-NDACCVWFVLDLDDIQENLFHG	57
KAI1791272.1ganodermaleucocontextum	MAFKALASLVSLAALQATKALIRR--VTCPDGINMANNAACCSLFAIRDDIQQLFDDG	58
KAI1788396.1ganodermaleucocontextum	MAFKALLSIVTLAALQVDAALTRR--VTCPDGKNTATNAACQQLFAIQDDLQQLFDN	58
	* * : * : : . : : * : * : * . : * * * * * : * : * : * : * . . .	
KAI1791340.1ganodermaleucocontextum	GECEGDAHESLRLTFHDAIGFSPALTAAGQFGGGGADGSIAMHSDVETAYPANAGLDEIV	119
QOW95912.1ganodermaaboninense	GQCGEDAHESLRLTFHDAIAYSPALTAEGKFGGGGADGSIAMHSDVELTYPVNDGLDEIV	117
ACA48488.1ganodermalucidum	GECEGDAHESLRLTFHDAIGFSPALTAAGKFGGGGADGSIAMHSDVELTYPGNGLDEII	117
ACD44889.1ganodermalucidum	GECEGDAHESLRLTFHDAIGFSPALTAAGKFGGGGADGSIAMHSDVELTYPGNGLDEII	117
ABB77243.1ganodermaformosanum	GQCGEDAHESLRLTFHDAIGFSPALTAAGQFGGGGADGSIAMHSDVEMTYPANDGLDEII	117
QOW95911.1ganodermaaboninense	GECEGDAHESLRLTFHDAIAFSPALTASGQFGGGGADGSIAMHSDVELSYPPVNDGLDEIV	117
ABB77244.1ganodermaaustrale	GQCGEDAHESLRLTFHDAIAFSPALTAAGQFGGGGADGSIAMHSDVELTYPVNDGLDEIV	117
BAA88392.1ganodermaapplanatum	GQCGEDAHESLRLTFHDAIAFSPALTAAGQFGGGGADGSIAMHSDVELTYPVNDGLDEIV	117
CEG62472.1ganodermaapplanatum	GQCGEDAHESLRLTFHDAIAFSPALTAAGQFGGGGADGSIAMHSDVELTYPVNDGLDEIV	117
CEG6247.1ganodermaapplanatum	GQCGEDAHESLRLTFHDAIAFSPALTASGQFGGGGADGSIAMHSDVELTYPVNDGLDEII	117
KAI1791272.1ganodermaleucocontextum	GECEGDVHESLRLTFHDAIGISPAIMAGQIFGGGGADGSIAMHSDVELTYPVNDGLDEIV	118
KAI1788396.1ganodermaleucocontextum	GQCGEDVHESLRLTFHDAIAFSPALNAGENGGGGADGSIAMHSDVELTYPVNDGLDEIV	118
	* : * * * * * . * : : . * * * * * * . . . : * : . * : * : *	
KAI1791340.1ganodermaleucocontextum	EVORPFAIKYNVSGDFIQFAGAVGAVNCNGGPQLSFFAGRSNDSPQAPPTLGLLPDSV	179
QOW95912.1ganodermaaboninense	EASRPFAIKHNVSGDFIQFAGAVGAANCNGGPQVSFYAGRSNDSPQAPDNLPLPSDSA	177
ACA48488.1ganodermalucidum	EASRPFAIKHNVSGDYIQFAGAVGAANCNGGPQLSFFAGRSNDSPQPPNLISTPADSA	177
ACD44889.1ganodermalucidum	EASRPFAIKHNVSGDYIQFAGAVGAANCNGGPQLSFFAGRSNDSPQPPNLISTPADSA	177
ABB77243.1ganodermaformosanum	EASRPFAIKHNVSGDFIQFAGAVGAVNCNGGPQLSFFAGRSNDSPQPPNLVPLPSDSA	177
QOW95911.1ganodermaaboninense	EASRPFAIKHNVSGDFIQFAGAVGAVNCNGGPQLSFFAGRSNDSPQPPNLVPLPSDSA	177
ABB77244.1ganodermaaustrale	EASRPFAIKHNVSGDFIQFAGAVGAVNCNGGPQLSFFAGRSNDSPQPPNLVPLPSDTA	177
BAA88392.1ganodermaapplanatum	EASRPFAIKHNVSGDFIQFAGAVGAVNCNGGPQLSFFAGRSNDSPQPPNLVPLPSDTA	177
CEG62472.1ganodermaapplanatum	EASRPFAIKHNVSGDFIQFAGAVGAVNCNGGPQLSFFAGRSNDSPQPPNLVPLPSDSA	177
CEG6247.1ganodermaapplanatum	EASRPFAIKHNVSGDFIQFAGAVGAVNCNGGPQLSFFAGRSNDSPQPPNLVPLPSDSA	177
KAI1791272.1ganodermaleucocontextum	NEQAPFIAIHNIITPGDFIQFAGAVGLSNCPGAPQLEFLGRPAATQAPDKTVPEPFDV	178
KAI1788396.1ganodermaleucocontextum	NAQRPFIAIHNIITADFIIMFAAAGVAVNCNGGPQLSFFAGRSNDSPQPPNLVPLPSDSA	178
	: . * * : * : : . * : * * * * * : * * * * * . * * : * : * * : *	
KAI1791340.1ganodermaleucocontextum	DHILARFSDAG-FSAEEVVQLLSHTVGAQDKVDPSIPGAPFDSTPSDFDQFFVETMLN	238
QOW95912.1ganodermaaboninense	DSILSRFSDAG-FDAVEVWLLVSHTVGSQNTVDPSIPGAPFDSTPSDFDQFFVETMLN	236
ACA48488.1ganodermalucidum	DAILSRFSDAG-FAAVEVWLLVSHTVGAQHADVPSIPGSPFDSTPSDFDQFFVETMLN	236
ACD44889.1ganodermalucidum	DAILSRFSDAG-FAAVEVWLLVSHTVGAQHADVPSIPGSPFDSTPSDFDQFFVETMLN	236
ABB77243.1ganodermaformosanum	DSILSRFSDAG-FASVEVWLLVSHTVGSQNTVDPSIPGAPFDSTPSDFDQFFVETMLN	236
QOW95911.1ganodermaaboninense	DSILSRFSDAG-FDAVEVWLLVSHTVGSQNTVDPSIPGAPFDSTPSDFDQFFVETMLN	236
ABB77244.1ganodermaaustrale	DTILSRFSDAG-FDSVEVWLLVPHTVGSQNTVDPSIPGAPFDSTPSDFDQFFVETMLN	236
BAA88392.1ganodermaapplanatum	DTILSRFSDAG-FDAVEVWLLVSHTVGSQNTVDPSIPGAPFDSTPSDFDQFFVETMLN	236
CEG62472.1ganodermaapplanatum	DTILSRFSDAG-FDAVEVWLLVSHTVGSQNTVDPSIPGAPFDSTPSDFDQFFVETMLN	236
CEG6247.1ganodermaapplanatum	DTILSRFSDAG-FDAVEVWLLVSHTVGSQNTVDPSIPGAPFDSTPSDFDQFFVETMLN	236
KAI1791272.1ganodermaleucocontextum	DTILTRFADAGNFTSEEVALLSSHTVAAADLVDPITPGTDFDSTPEVFDQFFIETQLR	238
KAI1788396.1ganodermaleucocontextum	DKILARMADAG-FDPIETVWLLSSHTIAAADLVDPITPGTDFDSTPELFDQFFIETQLL	237
	* * : * : : * * * * * * * : * * : * * : * * * * * . * : * : * : *	

- *Identidade de todos os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.
- : Similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.
- . Baixa similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.
- Não há similaridade entre os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

A árvore filogenética obtida pelo *Clustal* (Figura 6) evidencia a formação de agrupamentos entre as sequências de *Ganoderma* sp., na qual as sequências de *G.*

leucocontextum formaram um grupo próximo, indicando forte homologia nas sequências de MnP dessa espécie. De modo semelhante, *G. applanatum* apresentou três sequências altamente relacionadas, que se agruparam, sugerindo conservação funcional dessa enzima dentro da espécie.

As sequências de *G. lucidum* se agruparam entre si e próximo a espécie *G. formosanum*, sugerindo proximidade genética entre essas espécies. Já *G. boninense* distribuiu-se de forma distinta, indicando maior variabilidade dentro dessa espécie. Por outro lado, *G. australe* e *G. applanatum* aparecem mais próximos entre si, demonstrando similaridade.

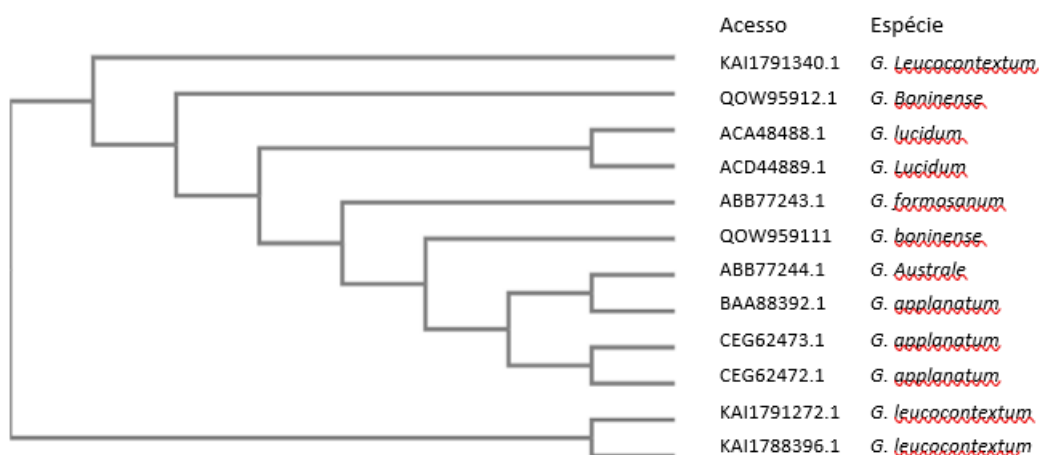


Figura 6: Árvore filogenética baseada em sequências de manganês peroxidase (MnP) de diferentes espécies de *Ganoderma* obtidas do banco de dados NCBI.

Assim sendo, embora exista alta conservação estrutural da MnP no gênero *Ganoderma*, há diferenças específicas entre espécies que podem refletir em adaptações e atividade catalítica distinta.

Contudo, todas as sequências avaliadas apresentaram padrões compatíveis com aqueles previamente descritos na literatura, sendo consideradas favoráveis para análises subsequentes. Dentre elas, a sequência de MnP de *Ganoderma boninense* (QOW95911.1) destacou-se por ter registros de ser expressa de forma comprovadamente eficaz, conforme relatado por Ho et al. (2018). Essa característica foi determinante para a escolha dessa sequência como modelo para os estudos posteriores.

3.2 Construção e análise da estrutura tridimensional

Das sequências analisadas de manganês peroxidase (MnP) do gênero *Ganoderma*, apenas uma foi selecionada com base nas análises de suas características físico-químicas. A sequência de *Ganoderma boninense* (QOW95911.1) foi submetida ao servidor Swiss-Model, e os resultados indicaram uma maior identidade (76,92%) com a peroxidase A0A5C2RQX4.1 de *Lentinus tigrinus*.

A ferramenta *Swiss Model* apresentou a estrutura tridimensional hipotética da (MnP-QOW95911.1), além de fornecer alguns dados de qualidade global estimada. Os valores de GMQE e QMEAN foi de 0,93 e -0,58, respectivamente (Figura 7), indicando boa confiabilidade do modelo.

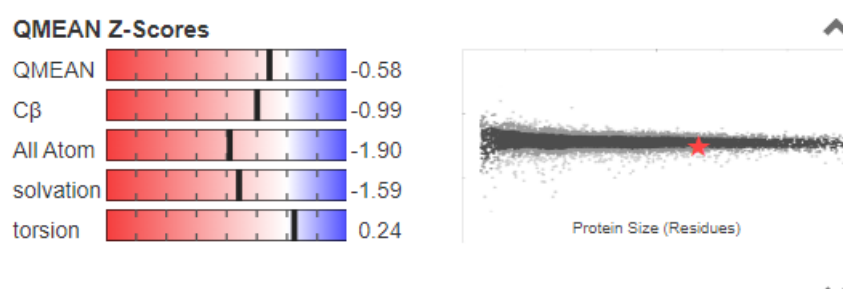


Figura 7: Estimativa da qualidade dos modelos por QMEAN e Z escore, gerado pelo SWISS – MODEL.

Os escores do QMEAN próximos a zero indicam que a estrutura do modelo apresenta confiabilidade comparável à de estruturas experimentais de tamanho similar, sugerindo que o modelo é de alta qualidade. No caso da estrutura analisada, os valores de QMEAN variaram entre 0 e -0,58, evidenciando sua consistência estrutural. O parâmetro GMQE atingiu 0,93, e quanto mais próximo de 1, maior a precisão do modelo. Esses resultados indicam que a sequência modelada possui uma estrutura tridimensional confiável e precisa, apresentando similaridade em relação à peroxidase A0A5C2RQX4.1 de *Lentinus tigrinus*.

Quanto a representação da estrutura 3D destacando o sítio ativo preservado, foi feita a partir do PyMol (Figura 8).

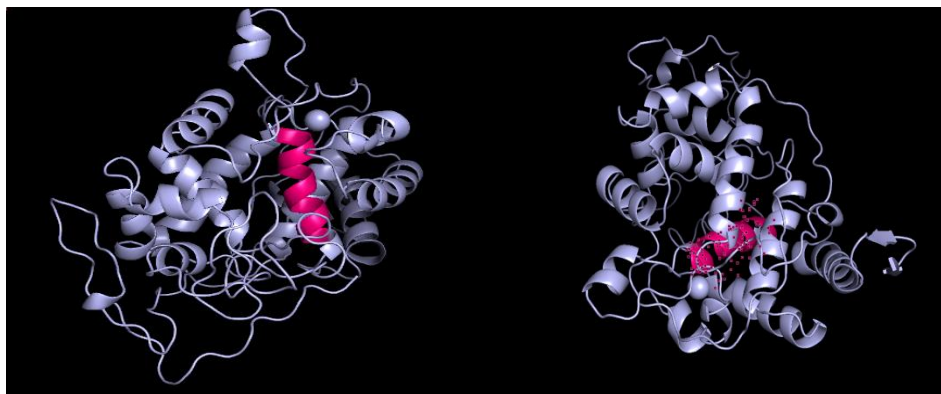
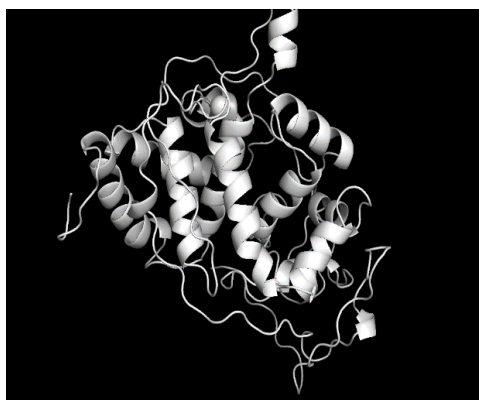


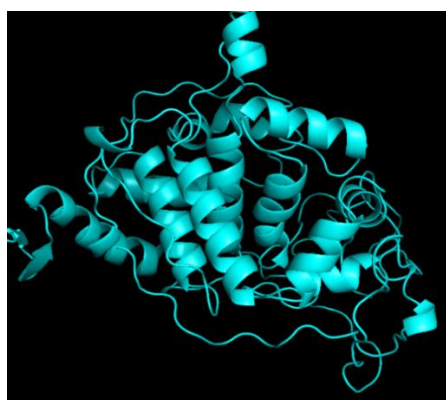
Figura 8: Estruturas 3D gerada a partir da sequência MnP-QOW95911.1, destacando (rosa) para o sítio ativo.

Na Figura 9, é apresentada a correlação entre a MnP-QOW95911.1 e seu molde correspondente, revelando um padrão de enovelamento altamente semelhante. Não foram observadas diferenças significativas entre as estruturas, o que evidencia uma identidade funcional próxima entre as sequências analisadas.

A-



B-



C-

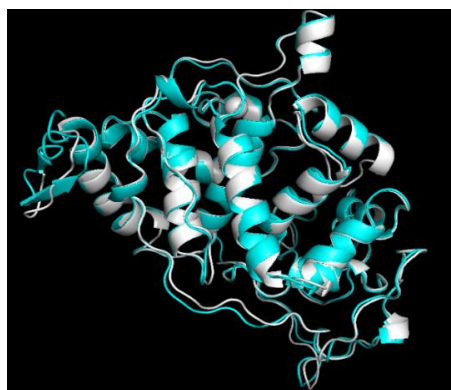


Figura 9: A- Estrutura tridimensional da MnP-QOW95911.1 B- Estrutura tridimensional da sequência molde fornecido pelo swiss model, uma peroxidase A0A5C2RQX4.1 de *Lentinus tigrinus*. C- Alinhamento das estruturas tridimensionais A e B. Fonte: PyMol

A análise estrutural realizada por meio do PyMOL e do SWISS-MODEL confirmou a identidade e a similaridade da sequência MnP-QOW95911.1 em relação a outras peroxidases, enzimas de interesse neste estudo (Figura 9). Esses resultados indicam que a sequência MnP-QOW95911.1 constitui uma candidata promissora para etapas subsequentes de produção e caracterização enzimática.

4. DISCUSSÃO

Muitos estudos sobre espécies do gênero *Ganoderma* estão relacionados à capacidade desses fungos em degradar resíduos lignocelulósicos por meio de enzimas lignolíticas. Jain et al. (2020), ao realizarem análises com *G. lucidum*, identificaram enzimas degradadoras da parede celular vegetal, como lacases, xilanases e celulases, que auxiliam o fungo na sobrevivência e colonização do substrato em diferentes condições ambientais. Asgher, Sharif e Bhatti (2010) cultivaram *G. australe* em diversos resíduos agroindustriais (palha de trigo, palha de arroz, casca de banana, bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e espigas de milho) para avaliar qual substrato induzia maior produção enzimática. Constatou-se que os cogumelos cultivados em palha de arroz apresentaram a maior síntese de ligninases. Dessa forma, diferentes espécies de *Ganoderma*, como *G. colossum*, *G. subamboinense*, *G. weberianum*, *G. lucidum*, *G. boninense*, *G. applanatum* e *G. formosanum*, apresentam ampla distribuição e capacidade de expressar enzimas lignolíticas. No presente trabalho, foram analisadas sequências de diferentes espécies de *Ganoderma*, observando-se que o agrupamento e a similaridade dessas sequências seguiram padrões consistentes com a espécie e com os resíduos de aminoácidos de MnP.

Algumas propriedades das enzimas são parâmetros fundamentais, uma vez que sua funcionalidade está intimamente relacionada às características físico-químicas. Por isso, propôs-se a caracterização das proteínas de MnP como forma de compreender melhor suas funções e propriedades.

Cada proteína possui um ponto isoelétrico (pI), sendo que ela apresenta carga líquida positiva em pH inferior ao seu pI e carga líquida negativa em pH superior ao pI (HUNGER, 2002). Essas informações sobre a propriedade ácido-básica dos aminoácidos são essenciais para entender a função das proteínas como tampões intracelulares, bem como para os métodos de identificação e separação de proteínas, que se baseiam na capacidade das moléculas de alterar sua carga elétrica conforme o pH do meio.

Foi possível analisar algumas propriedades físico-químicas das sequências de MnP, cujos valores se mostraram relevantes para caracterizar essas proteínas e identificar padrões consistentes e qualitativos. Os valores de ponto isoelétrico (pI) das peroxidases geralmente variam entre 3,2 e 6,89. Na Tabela 1, observa-se que os pIs das sequências analisadas apresentaram valores muito próximos entre si (4,15 a 4,42). Urzua et al. (1995), ao estudarem algumas isoenzimas de manganês peroxidase, observaram pIs na faixa de 3,20 a 4,58, resultado compatível com o evidenciado neste trabalho.

Além disso, a análise *in silico* estimou que a massa molecular das proteínas é aproximadamente 38 kDa, valor consistente com os reportados por Po et al. (2017) e Shin (2005) para MnPs de *Trametes versicolor* e *Irpex lacteus*, respectivamente. Essas espécies de basidiomicetos, causadoras de degradação branca, demonstram elevada capacidade de produção de enzimas lignolíticas, incluindo a manganês peroxidase (MnP), reforçando seu potencial biotecnológico (BORRAS et al 2011; XU et al 2009).

Na Figura 6, é possível observar o sítio ativo na estrutura tridimensional das MnPs. Esse sítio ativo é composto por um grupo heme, um íon Mn^{2+} e dois íons Ca^{2+} , que estabilizam a estrutura formada por dez longos filamentos β e uma cadeia curta adicional. Dessa forma, o sistema MnP atua como uma potente ferramenta bioquímica, que degrada o polímero de lignina recalcitrante (ZHOU et al., 2013).

Outro fator avaliado foi a capacidade da sequência selecionada de apresentar similaridade estrutural com outras proteínas funcionais de interesse. Para isso, foi construído o modelo tridimensional (3D) da MnP-QOW95911.1, proveniente de *G. boninense*, com o objetivo de compará-lo à estrutura molde fornecida pelo SWISS-MODEL, correspondente à peroxidase A0A5C2RQX4.1 de *Lentinus tigrinus*. A análise revelou uma identidade de 76,92%,

indicando elevada similaridade estrutural entre as duas proteínas e reforçando a confiabilidade do modelo para estudos funcionais subsequentes.

A modelagem por homologia (ULLAH, 2019) fornece informações valiosas sobre a base molecular da função da proteína, permitindo análise de conservação estrutural entre proteínas homólogas e avaliação do grau de identidade significativo. Dessa forma, é possível construir modelos de boa qualidade de maneira rápida e eficiente (JOHNSON et al., 1994). No entanto, é fundamental avaliar possíveis erros relacionados à escolha das estruturas de referência e ao alinhamento entre sequência-alvo e molde, por meio da validação do modelo (VERLI, 2014; RUIZ-DUEÑAS et al., 2011).

O SWISS-MODEL se mostrou especialmente útil, pois oferece interfaces web intuitivas e gera modelos confiáveis sem a necessidade de softwares complexos ou de grandes bancos de dados locais (BIASINI et al., 2014).

A avaliação da qualidade estrutural é uma etapa essencial da validação de modelos, dado que estruturas previstas podem conter erros significativos (BENKERT et al., 2010). Segundo Biasini (2014), o GMQE (Global Model Quality Estimation) varia de 0 a 1, sendo que valores mais altos indicam maior confiabilidade. O modelo obtido apresentou GMQE acima de 0,8, evidenciando boa qualidade.

Além disso, os escores Z do QMEAN fornecem uma estimativa da similaridade estrutural entre o modelo e proteínas experimentais de tamanho semelhante. Valores próximos de zero indicam bom acordo, enquanto valores abaixo de -4,0 sugerem baixa qualidade. No caso da MnP-QOW95911.1, os escores Z do QMEAN variaram entre 0 e -4, indicando que o modelo possui qualidade comparável a estruturas experimentais (SWISS HELP, 2021; BENKERT et al., 2011).

5. CONCLUSÃO

Os resultados preliminares deste trabalho, juntamente com análises de similaridade de outras manganês peroxidases descritas na literatura, indicam que a sequência MnP-QOW95911.1 uma candidata funcional promissora para produção heteróloga e caracterização da forma recombinante, com base na análise estrutural da sequência de manganês peroxidase de *Ganoderma boninense* realizada neste estudo.

Sugere-se otimização das análises *in silico*, com mais informações sobre a estrutura 3D, modelagem e dinâmica molecular que possam reforçar a qualidade e análises dessas sequências.

6. REFERÊNCIAS

- ASGHER M, SHARIF Y, BHATTI HN. Enhanced production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum* IBL-06 using lignocellulosic agricultural wastes. In 2010.
- BAJPAI P, ANAND A, BAJPAI PK. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. **Biotechnol Annu Rev.** P. 12:349-78.2006.
- BARYNIN VV, WHITTAKER MM, ANTONYUK SV, LAMZIN VS, HARRISON PM, ARTYMIUK PJ, WHITTAKER JW. Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. **Structure.** 2001.
- BIASINI M et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Res.** 2014.
- BIKO ODV, VILJOEN-BLOOM M, VAN ZYL WH. Microbial lignin peroxidases: Applications, production challenges and future perspectives. *Enzyme Microb Technol.* 2020.
- BINOD PARAMESWARAN, EDGARD GNANSOUNOU, RAVEENDRAN SINDHU, ASHOK PANDEY, Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives, **Bioresource Technology Reports**, V 5, 2019.
- CALIXTO, Paulo Henrique Matayoshi. Aspectos Gerais sobre a Modelagem Comparativa de Proteínas. **Ciência Equatorial.** v.3,p.9-16, 2013.
- FERNÁNDEZ-FUEYO E, ACEBES S, RUIZ-DUEÑAS FJ, MARTÍNEZ MJ, ROMERO A, MEDRANO FJ, GUALLAR V, MARTÍNEZ AT. Structural implications of the C-terminal tail in the catalytic and stability properties of manganese peroxidases from ligninolytic fungi. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** 2014.
- HUNGER, K., Industrial dyes: chemistry, properties, applications, Weinheim, **Wiley-Verlag**, 2002.
- JOHNSON F, LOEW GH, DU P. Homology models of two isozymes of manganese peroxidase: prediction of a Mn(II) binding site. **Proteins.** 1994.
- LIU X, DING S, GAO F, WANG Y, TAHERZADEH MJ, WANG Y, QIN X, WANG X, LUO H, YAO B, HUANG H, TU T. Exploring the cellulolytic and hemicellulolytic activities of manganese peroxidase for lignocellulose deconstruction. *Biotechnol Biofuels Bioprod.* 2023.
- OTHMAN AM, MECHICHI T, CHOWDHARY P, SULEIMAN WB. Editorial: Ligninolytic enzymes and their potential applications. **Front Microbiol.** 2023.
- RUIZ-DUEÑAS FJ, FERNÁNDEZ E, MARTÍNEZ MJ, MARTÍNEZ AT. Pleurotus ostreatus heme peroxidases: an in silico analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure. **C R Biol.** 2011.
- SCHWEDE, T. J., Kopp., "SWISS-MODEL: An automated protein homology modeling server. **Nucleic. Acids.** Res. 31, 3381-3385. 2003.
- SELVAGGINI C, SALMONA M, DE GIOIA L. Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. A homology-based molecular model. **Eur J Biochem.** 1995.

SHIN KS, Kim YH, Lim JS. Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*. **J Microbiol.** 2005.

SWISS-MODEL HELP. Disponível em: < <https://swissmodel.expasy.org/docs/help>> Acesso em 13 março 2021.

ULLAH, A.; ULLAH, K.; ALI, H.; BETZEL, C.; UR REHMAN, S. The Sequence and a Three-Dimensional Structural Analysis Reveal Substrate Specificity among Snake Venom Phosphodiesterases. **Toxins** 2019.

URZÚA U, FERNANDO LARRONDO L, LOBOS S, LARRAÍN J, VICUÑA R. Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispora*. **FEBS Lett.** 1995.

ZHOU Xuan-Wei et al. Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp: current status and potential applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39(4), p.416-426. nov. 2013.

CAPÍTULO II

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA MANGÃNES PEROXIDASE DE *GANODERMA BONINENSE*

RESUMO

Enzimas lignolíticas produzidas por fungos podem apresentar algumas limitações, como baixa taxa de crescimento e dificuldade de cultivo, tornando a produção recombinante uma alternativa estratégica para obtenção de quantidades adequadas da proteína, além de possibilitar futuras modificações para otimizar sua estabilidade e atividade. O objetivo deste trabalho foi produzir uma MnP da espécie *Ganoderma boninense* de forma heteróloga e avaliar sua atividade. Após a seleção em bancos de dados de uma sequência codificante funcionalmente expressa de MnP da cepa de *G. boninense*, a mesma foi clonada e expressa, excluindo a região do peptídeo sinal e com códons otimizados para expressão em *E. coli*, inserida nos sítios *BamHI* e *HindIII* do vetor pET32a(+), utilizando para transformação a cepa de *E. coli* Rosetta (DE3). A proteína de fusão com as “tags” de Trx e His foi expressa em diferentes condições, purificada e dialisada na presença de hemina e cloreto cálcio. A MnP foi expressa de forma satisfatória, porém, somente na forma insolúvel, mesmo em diferentes condições nas concentrações de IPTG, temperatura e tempo de indução. A atividade enzimática da MnP recombinante foi avaliada, contudo detectada em pequena quantidade. Dessa forma, serão necessários novos testes de otimização para obter uma maior proporção da MnP recombinante na forma solúvel ou redobrada adequadamente, para uma melhor caracterização proteica e indicação para aplicações na degradação de biomassa.

1.INTRODUÇÃO

O complexo de enzimas lignolíticas consiste em três enzimas que atuam de forma sinérgica na degradação da lignina, encontrada na biomassa vegetal, são elas: lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases que podem ser definidas como fenoloxidasas. As enzimas lignina (LiP) e manganês (MnP) peroxidases pertencem a classe das peroxidases e oxidam seus substratos pela redução de um elétron com a formação de um radical catiônico. A manganês peroxidase (MnP) pertence a classe das peroxidases e oxidam seus substratos pela redução de um elétron com a formação de um radical catiônico. A MnP atua exclusivamente como fenoloxidase em substratos fenólicos utilizando Mn^{2+}/Mn^{3+} como par redox intermediário (SCHEEL et al., 2000; RICE et al., 2017).

Essas enzimas têm sido objeto de diversos estudos, demonstrando sua alta eficiência na hidrólise parcial da biomassa vegetal, pela sua alta eficiência e alta especificidade de substrato, tornando-se fatores importantes no desenvolvimento de diferentes bioprocessos industriais. Apesar dos grandes avanços técnico-científicos na área, a descoberta de novas enzimas lignocelulolíticas é de grande interesse para as biorrefinarias que estão se desenvolvendo, inclusive para a indústria de bioetanol. Para reduzir o custo e alcançar altas produções destas enzimas, um sistema de expressão heterólogo é altamente favorecido (BAÊTA, 2016).

Assim, técnicas da engenharia genética representam uma ferramenta alternativa para a produção de inúmeras enzimas de interesse industrial a larga escala. Uma dessas técnicas é a expressão de proteínas heterólogas, que constitui uma abordagem bem estabelecida que tem permitido clonar e expressar genes de organismos difíceis de manter em condições laboratoriais em organismos altamente eficientes como *E. coli*, *P. pastoris*, entre outros. Muitas enzimas e outros produtos proteicos comercializados com sucesso têm sido produzidos através deste tipo de processo biotecnológico, alguns exemplos são: insulina, interferões, vacina da hepatite B, α -amilase, proteases, lipases, peroxidases, xilanase, fitase, catalase, entre outras (KAUR et al., 2018; SANCHEZGARCIA et al., 2016).

Aplicações bem-sucedidas de manganês peroxidases as evidenciam como uma ótima alternativa para processos biotecnológicos. A enzima pode ser aplicada de forma sustentável e ecologicamente amigável nestes processos (LETO et al., 2014; RAI, 2014). Embora existam

inúmeras perspectivas em distintos campos de atuação e promissoras aplicações industriais, ainda há poucas aplicações dessas peroxidases no mercado. Isso é devido, principalmente, ao alto custo da produção somada à baixa produtividade enzimática pelos organismos naturais (POLIZELI; RAI, 2014).

A fim de reverter essa situação, estratégias e ensaios para o melhoramento da obtenção de manganês peroxidase vêm sendo empregados, incluindo a procura por novos produtores, mutagênese e recombinação gênica. Nesse cenário, espécies do gênero *Ganoderma* se destacam como importantes produtoras de manganês peroxidase, uma vez que desempenham papel fundamental na degradação da lignina durante o processo de decomposição da madeira. Além disso, a eficiência na secreção dessa enzima por *Ganoderma* reforça o potencial biotecnológico desses fungos como fontes alternativas para a produção em maior escala, ampliando as perspectivas de aplicação em processos industriais e ambientais.

Assim o objetivo deste trabalho é produzir de forma heteróloga uma manganês peroxidase do fungo *Ganoderma boninense* a partir de células de *Escherichia coli*, a fim de caracterizá-la quanto à atividade enzimática e sua aplicação no processo de deslignificação do bagaço de cana de açúcar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do gene sintético

O gene sintético da manganês peroxidase foi adquirido da empresa Fastbio e clonado no vetor de expressão pET32a (Figura 10), a partir da sequência de *Ganoderma boninense* (acesso QOW95911.1), utilizando os sítios de restrição *Bam*HI e *Hind*III. A construção inclui uma cauda de histidina (6xHis) na região N-terminal para facilitar a purificação por afinidade, além de um domínio de tioredoxina (TRX) que auxilia na solubilidade da proteína. Foram ainda incorporados sítios de clivagem para enteroquinase e trombina, permitindo a remoção controlada da fusão após a expressão recombinante.

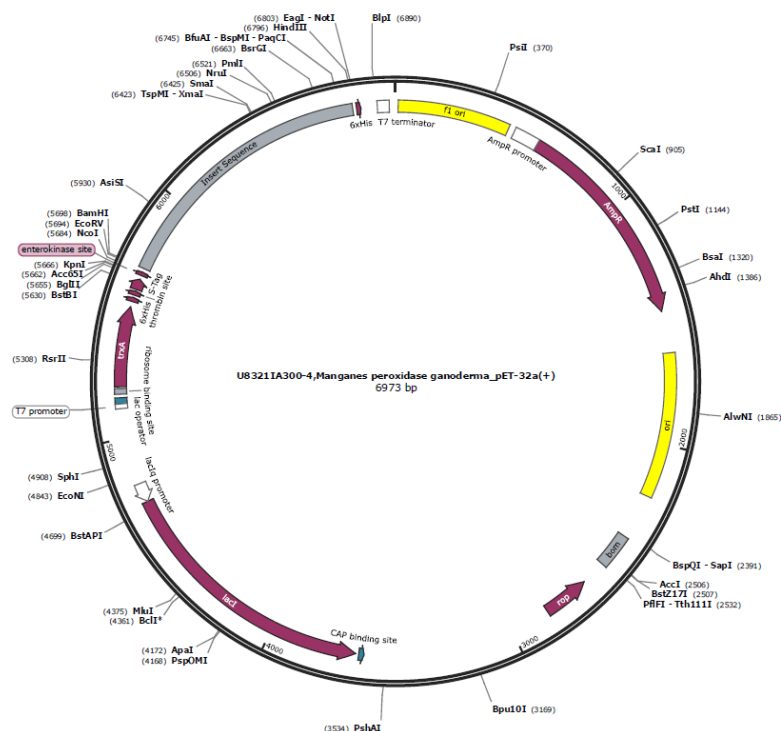


Figura 10: Representação esquemática do vetor pET32a contendo a sequência de interesse.

2.2 Transformação do gene sintético em vetor de expressão em cepas *E. coli*

O plasmídeo recombinante sintetizado (pET-32a-MnP) foi centrifugado a 6.000 x g por 1 minuto a 4 °C, em seguida foi adicionado 20 µL de água ultra pura para dissolver o DNA, logo depois o tubo foi agitado em vórtex por 1 minuto e mantido a 4 °C para as etapas posteriores.

A transformação bacteriana foi realizada pelo método de choque térmico, obtida a partir da cepa de *Escherichia coli* Rosetta (DE3) quimiocompetente para incorporação do plasmídeo recombinante.

As bactérias foram retiradas do freezer a -80°C e deixadas em repouso no gelo por 15 minutos para descongelar. Um volume de 1 µL (aproximadamente 30 ng) do DNA plasmidial pET-32a-MnP foi diluído em 200 µL de células competentes Rosetta (DE3). A mistura foi incubada no gelo por 20 minutos, seguida do choque térmico a 42°C por 2 minutos. Após este tempo, foi adicionado 1 mL de caldo Luria-Bertani (LB) às amostras e incubadas por 1h a 37 °C em estufa bacteriológica. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação por 1

minuto a 12.000 rpm, o pellet foi ressuspensionado em 200 µL de caldo LB, em seguida, inoculado em placa de petri, com auxílio de uma alça de Drigalski, contendo ágar LB, suplementado com os antibióticos adequados (Ampicilina, 50 µg/mL e Cloranfenicol, 34 µg/mL). Após a semeadura, as placas foram incubadas por 16 horas a 37°C.

2.3 Expressão da MnP em células de *E. coli* Rosetta (DE3) em pequena escala.

Os testes de expressão foram realizados otimizando as melhores condições de concentração do agente indutor IPTG (isopropil-β-D-thiogalactopiranosídeo), temperatura e tempo de expressão, de forma a maximizar o rendimento e a solubilidade da proteína recombinante. As variações estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações de IPTG, tempo de indução e temperaturas utilizadas para o teste de expressão de MnP em células de *E. coli* Rosetta (DE3).

Concentração de IPTG	Temperatura / Tempo de Indução		
Branco - 0,0	37 °C / 4 horas	25°C/12-16 horas	18°C/24 horas
0,1 mM	4 horas	12-16 horas	24 horas
0,5 mM	4 horas	12-16 horas	24 horas
1,0 mM	4 horas	12-16 horas	24 horas

Para os testes, inicialmente foram realizados pré-inóculos contendo uma unidade formadora de colônia bacteriana transformada em 2 mL de caldo LB suplementado com os antibióticos adequados (50 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol). Os tubos foram incubados sob agitação constante, a 180 rpm, a 37 °C por 12-16 horas. Após esse período, as células foram centrifugadas 3500 rpm por 3 minutos a 4 °C, o pellet formado foi ressuspensionado e a cultura foi inoculada em 20 mL de caldo LB suplementado com os antibióticos e mantidos sob agitação de 180 rpm a 37 °C, até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,6 a 0,8. Logo em seguida, a cultura foi dividida em volumes de 2 mL, para cada temperatura em diferentes concentrações de IPTG, e tempo de indução, sendo o branco (sem adição de IPTG) como controle negativo.

A cultura foi incubada sob agitação de 160 rpm. As amostras foram centrifugadas a 15.700 x g por 15 minutos a 4°C, o precipitado com as bactérias foi guardado no freezer (-20°C) e o sobrenadante descartado.

Em seguida, os pellets foram ressuspensos em 400 µL de tampão de lise (*Binding Buffer* 1x composto de 0,4 mM de NaCl, 160 mmol L⁻¹ de Tris-HCl e 40 mmol L⁻¹ de imidazol + lisozima 50 µg mL⁻¹), e a mistura incubada por 20 min a 30 °C. Posteriormente, as amostras foram mantidas em gelo e submetidas a lise mecânica em sonicador (Pgex 30), com pulsos de 10 segundos e intervalos de 30 segundos, com amplitude 70% utilizando sonda de 2 mm. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos para separação das frações solúvel e insolúvel, sendo adicionado o tampão de amostra 5x na fração solúvel (β-Mercaptoetanol 5 %, Tris-HCl 0,02 mol L⁻¹ pH 6,8, SDS 4 %, glicerol 27%, azul de bromofenol 1 %), 1x na fração insolúvel para visualização em SDS-PAGE (12,5%) a fim de verificar expressão e solubilidade da proteína recombinante.

2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Para preparação das amostras visando a visualização em gel SDS-PAGE, cada 20 µL de amostra específica foi acrescida de tampão de amostra 5x (β-Mercaptoetanol 5 %, Tris-HCl 0,02 mol L⁻¹ pH 6,8, SDS 4 %, glicerol 27 %, azul de bromofenol 1 %) correspondente a 20% do volume de amostra. Posteriormente foram desnaturadas a uma temperatura de 95 °C durante 10 min. Em seguida, foram submetidas a corrida em gel SDS 12% junto com o marcador Low Molecular Weight Marker de 14-97 kDa (GE Healthcare), nas seguintes condições: 30 mA por 80 minutos a 150 V, em um sistema de eletroforese Mighty Small II Mini Vertical Electrophoresis Unit SE250 (Hoefer),

Após a conclusão da corrida, para visualização das bandas, o gel passou por um processo de lavagem com água quente, logo após, foi submetido a um processo de coloração utilizando uma solução de Azul de Coomassie a 0,05% por 10 min.

2.5 Expressão da proteína recombinante em maior escala

A expressão da proteína em larga escala foi feita a partir da célula estocada em glicerol 50%, para isso, foi coletado 3 μ L do estoque inoculado em 3 mL de meio de cultura caldo LB suplementado com os antibióticos Ampicilina 50 μ g/mL e cloranfenicol 34 μ g/mL, sendo esse o pré-inóculo.

O pré-inóculo foi então incubado a 37 °C, sob agitação de 180 rpm por 16 horas. No dia seguinte, a cultura celular foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o pellet foi inoculado em 100 mL de caldo LB suplementados com os antibióticos já citados e mantidos sob agitação constante de 180 rpm a 37 °C, até atingir a DO_{600} entre 0,6 a 0,8. Foi adicionado IPTG na concentração de 0,1 mM, sendo incubada a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 4 horas para indução.

Decorrido esse período, a cultura celular foi centrifugada a 3.000 rpm, o pellet foi coletado para *refolding* e purificação da proteína recombinante.

2.6 Refolding e Purificação da fração insolúvel

O pellet foi ressuspenso em 10 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 0,4 mM EDTA, 2 mM DTT e 50 μ g/mL de lisozima) e a amostra foi então submetida à lise mecânica usando um sonicador (Pgex 30). As amostras lisadas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O pellet foi ressuspenso em tampão contendo 2 mM EDTA, 1 mM de DTT e 6 M de ureia em 50 mM Tris-HCl a pH 8,0. A solução foi incubada a 4°C por 3 horas para solubilizar o pellet. Após a solubilização dos pellets, o *refolding* foi realizado reduzindo a molaridade da ureia por diálise, removendo a solução e adicionando tampão Tris-HCl 50 mM contendo 150 mM de $CaCl_2$, 25 μ M de hemina (1 mM em NaOH 0,1 N), glicerol 10%, 0,5 μ M de glutatona oxidada em pH 8,0, com trocas a cada duas horas e meia, totalizando aproximadamente 5 trocas. Após esse tempo, a amostra foi removida da membrana e armazenada em um tubo Falcon a 4 °C para utilização nas etapas subsequentes.

Para purificação da fração insolúvel, a proteína redobrada foi aplicada em uma coluna de níquel HisTrap HP e eluída com tampão contendo concentrações variáveis (50 a 500 mM) de imidazol. As amostras foram confirmadas em SDS-PAGE 14% coradas com azul de Coomassie coloidal. As frações coletadas foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, para reduzir o imidazol.

2.7 Detecção da atividade enzimática na proteína recombinante

A atividade da peroxidase de manganês descrita por Bonugli-Santos et al., 2010 e foi determinada pela oxidação de 0,5 mL de vermelho de fenol a 0,1% (o vermelho de fenol foi dissolvido em água ajustando-se continuamente o pH para 7,4) em 1,5 mL de tampão succinato de sódio 20 mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,25 mL de albumina a 1%, 0,5 mL de MnSO₄ 1 mM, 0,5 mL de extrato e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM. Em intervalos de tempo definidos de 0 e 10 minutos, 1 mL da mistura contida no tubo de ensaio foi removido e a esse volume foram adicionados 65 µL de hidróxido de sódio 6,5 M para interromper a reação e realizar uma leitura espectrofotométrica a 610 nm. Para a realização dos testes, foram preparados os seguintes controles: branco (contendo o tampão da última diálise), enzima fervida, enzima ativa, extrato fúngico fervido e extrato ativo. Para a obtenção do extrato fúngico, cepas de *Trametes villosa* foram incubadas por sete dias de crescimento a uma temperatura de 28 °C. Após o período de cultivo, o micélio foi macerado em 50 mL de água destilada autoclavada e permaneceu em banho de gelo por 3 horas, com agitação ocasional (LUNDELL et al., 1990).

Para a determinação das atividades de ligninases foi utilizada a equação derivada da Lei de Beer-Lambert:

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

Atividade de ligninases

Onde:

$\Delta(Ab)$ é a diferença entre a absorbância dos extrato fervidos (branco) e não fervidos (teste) nos tempos estabelecidos;

ϵ é o absorbtividade molar (Lmol⁻¹cm⁻¹): sendo, LiP = 9300; MnP = 4460; Lacase = 65000;

R é a alíquota de sobrenadante (µL);

t é o tempo de reação (minutos).

Além disso, foi determinada a atividade específica através da divisão do valor da atividade enzimática, pela concentração da proteína.

2.8 Determinação do Teor de Proteína Total

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976). A curva de calibração padrão foi determinada utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA). A reação de determinação da concentração foi realizada utilizando 100 µL de proteína em 5 mL de reagente de Bradford, incubados por 5 minutos à temperatura ambiente, e então o teor de proteína foi determinado pela leitura da absorbância em um comprimento de onda de 595 nm. Para o branco, foram utilizados 100 µL de água destilada em 5 mL de reagente de Bradford.

3.RESULTADOS

3.1 Sequência de MnP selecionada para obtenção do vetor pET32a

A sequência nucleotídica de *Ganoderma boninense*, descrita por Ho et al. (2018) e depositada no GenBank sob o número de acesso QOW95911.1, possui 1.095 pares de bases e codifica a enzima manganês peroxidase (MnP), composta por 361 aminoácidos (Figuras 9A e 9B). Para a expressão heteróloga, o gene foi clonado no vetor pET32a entre os sítios de restrição *BamHI* e *HindIII*, em uma construção desenvolvida pela empresa FASTBIO (Figura 11).

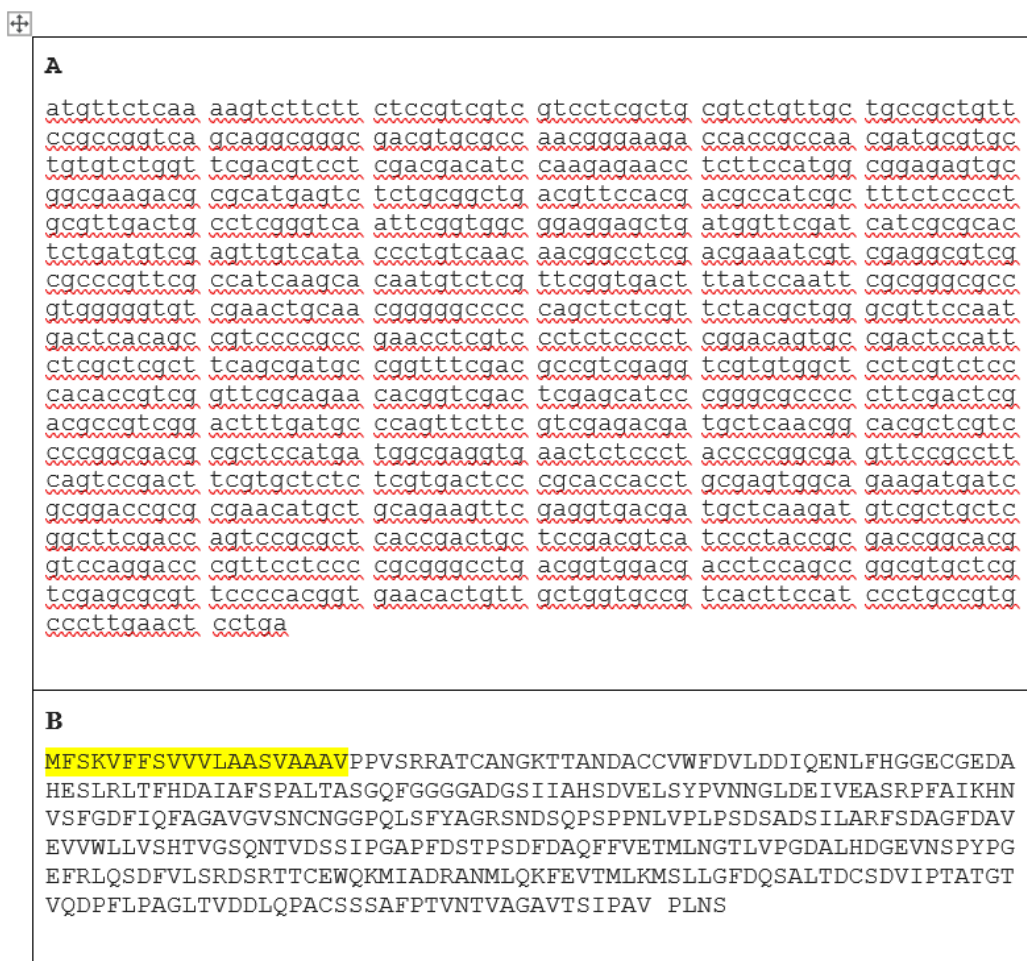


Figura 11: A- Sequência de nucleotídeos de manganês peroxidase de *Ganoderma boninense* (QOW95911.1); B- Sequência de aminoácidos de manganês peroxidase de *Ganoderma boninense* com destaque em amarelo ao peptídeo sinal.

Para a estratégia de clonagem, foi feita a retirada do peptídeo sinal (os primeiros 20 aminoácidos) identificados através do programa signal P (TEUFEL, et al., 2022).

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

A transformação ocorreu de forma satisfatória, conforme evidenciado pela presença de colônias na placa (Figura 12). Para isso, utilizou-se o plasmídeo recombinante na transformação por choque térmico da estirpe *Rosetta* (DE3) em meio seletivo.

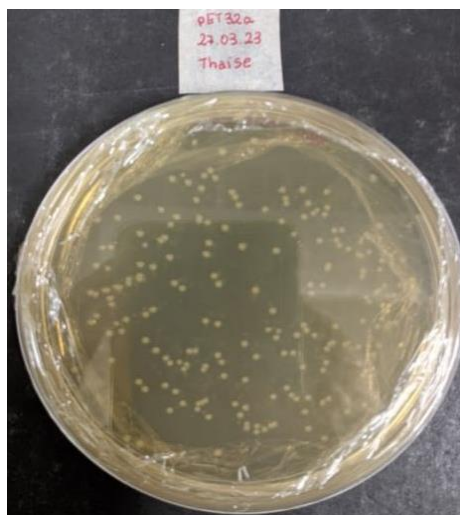


Figura 12: Transformação de pET-32a-MnP em estirpe Rosetta (DE3) de *E. coli*. Placa positiva contendo meio LB-ágar, ampicilina e cloranfenicol, células competentes e vetor resultando no crescimento de colônias selecionadas.

3.2 Expressão das colônias obtendo proteína heteróloga

Os extratos proteicos da estirpe *Rosetta* (DE3) transformada, analisados por SDS-PAGE, revelaram uma banda de aproximadamente 56 kDa, compatível com a massa molecular predita para a proteína recombinante Trx-(His)₆-MnP (Figuras 13). Considerando que o produto de fusão pET-32a inclui a proteína recombinante, os sítios proteolíticos, a tioredoxina e a cauda de seis histidinas para purificação (~1,7 kDa), foi possível observar uma banda diferencialmente expressa no controle positivo em comparação ao controle negativo sem IPTG, em todas as concentrações testadas (0,1 a 1,0 mM IPTG) e temperaturas (37° C, 25° C e 18° C) .

Entretanto, o acúmulo proteico ocorreu predominantemente na fração insolúvel (FI) do extrato bacteriano, independentemente da concentração de IPTG, temperatura ou tempo de indução.

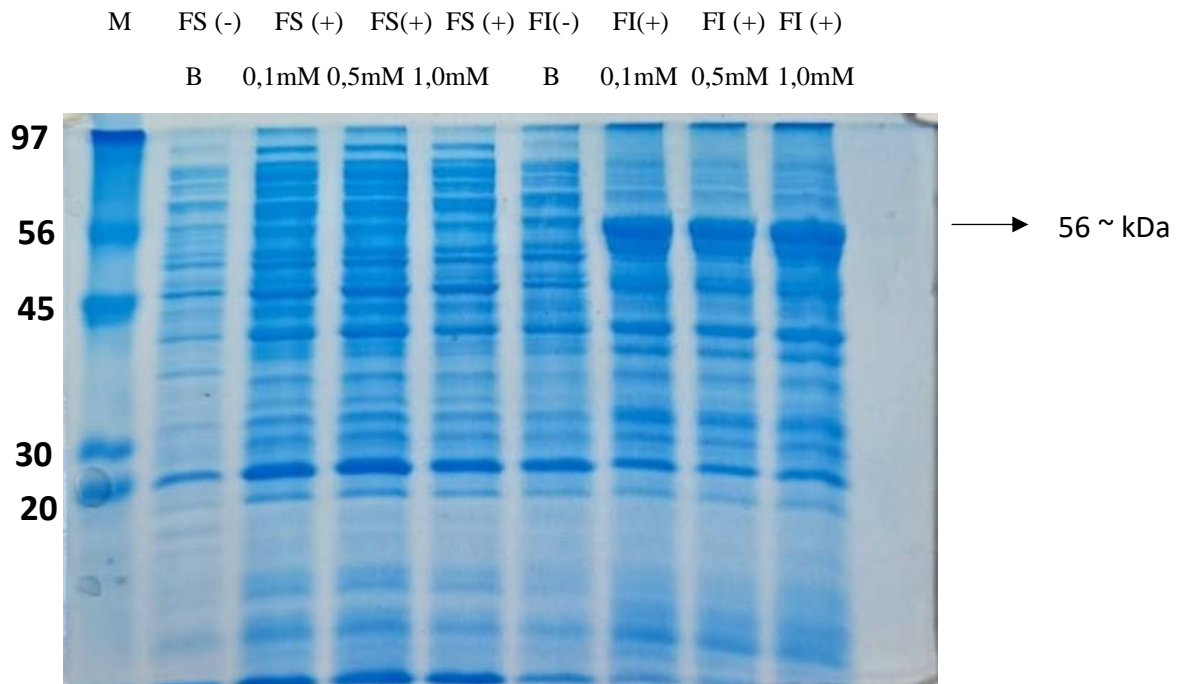


Figura 13: Teste de expressão heteróloga em estirpe de *E. coli* ROSETTA (DE3) a 37° C por 4 horas, em SDS PAGE 12,5%. Marcador (M); fração solúvel (FS) e fração insolúvel (FI), sem (-) IPTG e com (+) IPTG variando entre 0,1 a 1,0 mM.

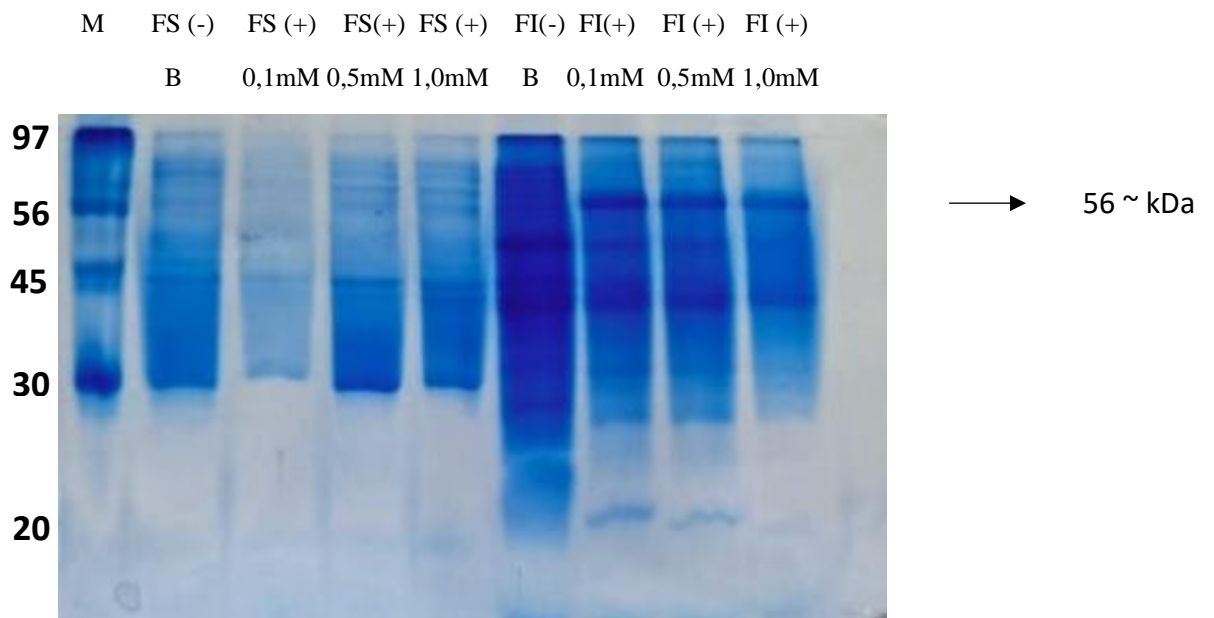


Figura 14: Teste de expressão heteróloga em estirpe de *E. coli* ROSETTA (DE3) a 25° C por 16 horas, em SDS PAGE 12,5%. Marcador (M); fração solúvel (FS) e fração insolúvel (FI), sem (-) IPTG e com (+) IPTG variando entre 0,1, 0,5 e 1,0 mM.

Com o objetivo de expressar a proteína na fase solúvel, foram realizados novos testes de expressão a 18°C (Figura 15). Nesses ensaios foram testados diferentes tempo de indução (24 horas) e concentração de IPTG (0,1, 0,5 e 1,0 uM). Os resultados foram analisados por SDS-PAGE e estão representados na figura 15. Os resultados indicam que a expressão da proteína MnP pET32a a 18°C pode ser visualizada para todas as concentrações de IPTG testadas, independentemente do tempo de indução. Entretanto, mesmo com a redução da temperatura, a maior parte da proteína permaneceu na fração insolúvel.

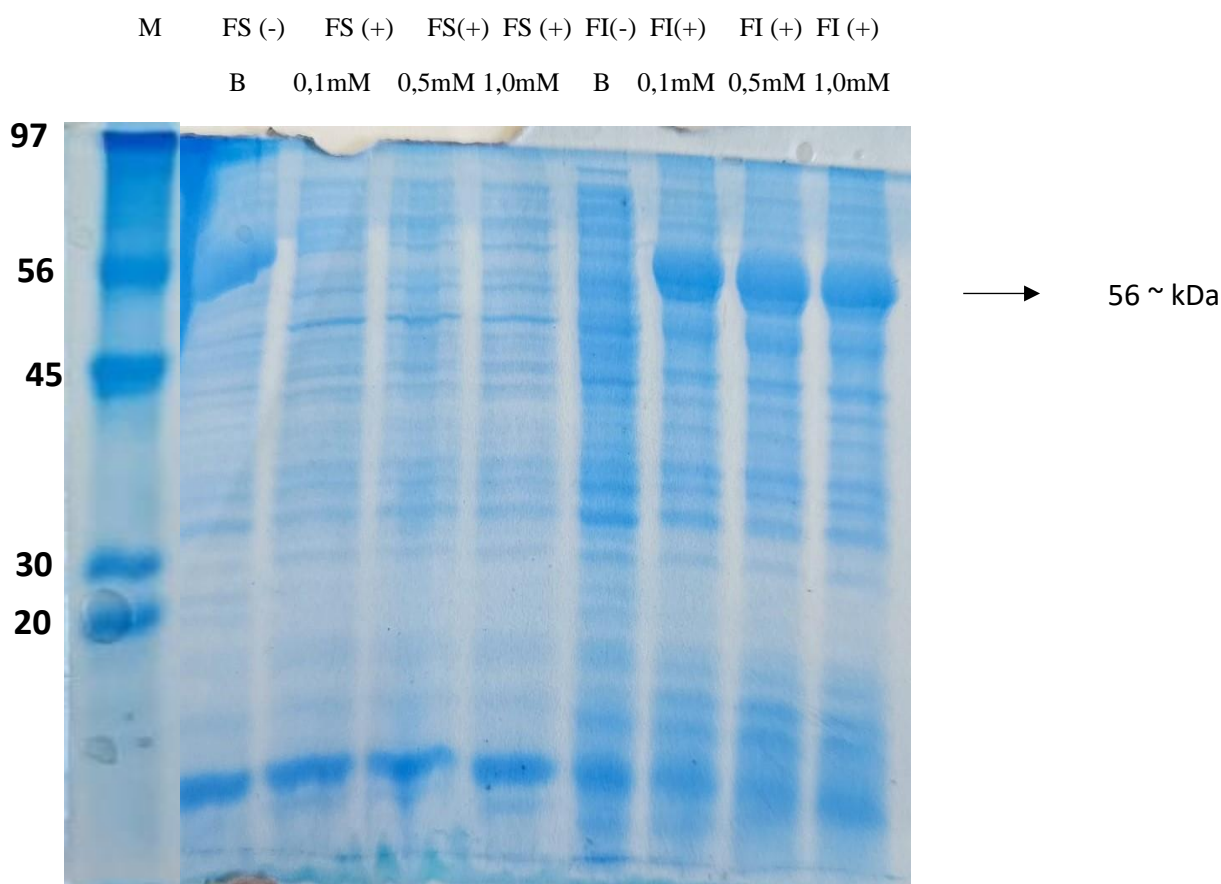


Figura 15: Teste de expressão heteróloga em estirpe de *E. coli* ROSETTA (DE3) a 18° C por 24 horas, em SDS PAGE 12,5%. Marcador (M); fração solúvel (FS) e fração insolúvel (FI), sem (-) IPTG e com (+) IPTG variando entre 0,1, 0,5 e 1,0 mM.

Com base nos resultados obtidos, a variação de concentração de IPTG, temperatura e tempo de indução não se mostraram eficaz para promover a expressão da proteína na fração solúvel. Portanto, para os ensaios de expressão em larga escala, foram selecionadas as seguintes condições: indução a 37°C com 0,1 mM de IPTG por 4 horas.

3.3 Purificação da proteína rTrx-(His)₆ MnP por cromatografia de afinidade

A partir da obtenção dos pellets de indução foi realizada a ruptura celular bacteriana por processos químicos e depois mecânicos para purificar o pellet (fração insolúvel) contendo a proteína heteróloga de MnP. Por meio da técnica de cromatografia por afinidade de metais de transição catiônicos, a proteína de fusão com uma cauda de histidina foi eluída à medida que a concentração do imidazol aumentou; a proteína apresentou maior eluição na concentração de 75mmol L⁻¹ (Figura 16).

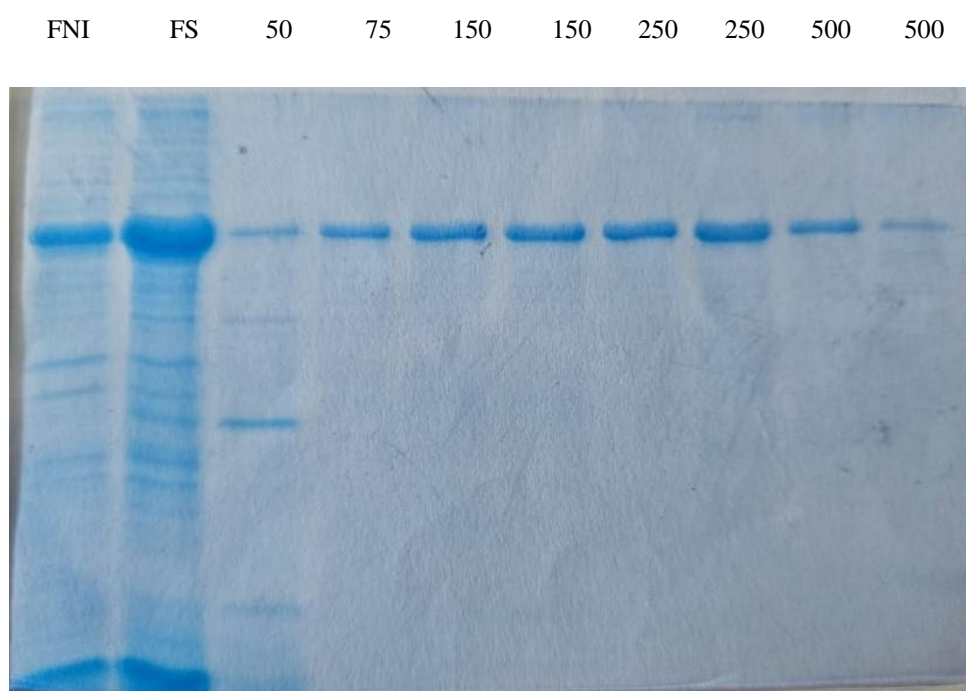


Figura 16: SDS-PAGE 12,5% da purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. Marcador (M); Fração não interagida (FNI); fração solúvel (FS); amostras eluídas com as concentrações de imidazol variando de 50 a 500 mmol L⁻¹.

A análise da figura 16 indica que as concentrações com 75 e 500mM de imidazol contribuíram para retirar a maioria dos contaminantes e a proteína começou a ser eluída de forma majoritária a partir de 75 mM de imidazol. Porém as primeiras eluições apresentam bandas de contaminação, sendo mais intensas a 50 mM de imidazol. Estes contaminantes podem ser resultado da eficácia parcial no processo de purificação. Porém não podemos descartar a hipótese de serem produtos de degradação da enzima, possível produto de ataque

proteolítico ou agregação com outras proteínas. A análise da Figura 16 indica que a partir da segunda eluição com 75 mM de imidazol a proteína foi eluída com menor contaminação.

3.4 Determinação da concentração da proteína total e teste de atividade

Os resultados da atividade enzimática bruta obtidos para MnP recombinante nas condições testadas são apresentados na Tabela 6. A atividade enzimática foi avaliada utilizando diferentes controles (extrato fúngico, MnP recombinante e suas respectivas formas fervidas).

O extrato fúngico apresentou atividade de 3,266 U/L, concentração de proteína de 3,5 µg/µL e atividade específica de 0,9 U/µgP. O extrato fervido, por sua vez, não apresentou atividade detectável, resultando em valores negativos.

Tabela 3: Atividade enzimática bruta de um manganês peroxidase de *Ganoderma boninense*.

	Atividade Bruta U/L	Concentração µg/uL	Atividade específica U/ugP
Extrato fúngico	3,266	3,5	0,9
Extrato fúngico Fervido	NA*		
MnP recombinante Ativa	3,542	49,3	0,07
MnP recombinante Fervida	NA*		

*Atividade não detectada

A fração proteica ativa apresentou atividade enzimática de 3,542 U/L, concentração proteica significativamente maior (49,3 µg/µL) em comparação ao extrato fúngico e atividade específica de 0,07 U/µgP. A proteína fervida também não apresentou atividade, evidenciando perda funcional após tratamento térmico.

4. DISCUSSÃO

A manganês peroxidase (MnP) constitui uma das principais enzimas oxidativas fúngicas, desempenhando papel fundamental na degradação da biomassa lignocelulósica (ZHOU et al., 201). No entanto, a expressão de MnP deve ser cuidadosamente considerada, pois o nível de expressão em alguns isolados é insuficiente para aplicações industriais, havendo necessidade de explorar espécies e sistemas que possibilitem maiores rendimentos. Nesse contexto, a expressão heteróloga de uma sequência de MnP de *Ganoderma boninense* em *E. coli* representa uma alternativa promissora para aumentar os níveis de produção.

O gene correspondente à MnP de *G. boninense* foi clonado com sucesso no vetor pET32a(+), conforme demonstrado na Figura 9. Esse vetor permite a expressão de uma cauda de seis histidinas, essencial para a purificação por cromatografia de afinidade com níquel, e a fusão com tiorredoxina (Trx), incluindo sítios para enteroquinase e trombina, permitindo a expressão da proteína alvo como proteína de fusão. A Trx é um pequeno monômero que facilita a expressão solúvel de fatores de crescimento e citocinas (SINGH et al., 2005). Essa fusão não apenas melhora a estabilidade do RNAm, como também aumenta a solubilidade da proteína recombinante, uma vez que muitas proteínas normalmente insolúveis em *E. coli* tornam-se mais solúveis quando expressas em fusão com Trx. Apesar dessa estratégia, a MnP não foi obtida na forma solúvel nas condições testadas.

Durante o processo de expressão, foram realizados testes com diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5; 1,0 mM), temperaturas (37°C, 25°C e 18°C) e tempos de indução (4, 16 e 24 horas). A análise por SDS-PAGE revelou a presença de uma banda correspondente ao tamanho esperado do produto de fusão da proteína alvo, mas apenas na fração insolúvel (Figuras 13 a 15).

Frequentemente, proteínas heterólogas expressas em *E. coli* acumulam-se como corpos de inclusão (ALOIS, 2007). Diversas explicações para essa formação têm sido relatadas. Estudos de RINAS & BAYNES (1993) sugerem que os corpos de inclusão podem resultar de: (1) quantidade limitada de chaperoninas frente à superexpressão gênica, combinada com uma taxa de síntese proteica superior à capacidade celular de enovelamento (ALFI et al., 2019); (2) presença de sequências específicas de aminoácidos; e (3) diferenças entre o enovelamento

proteico eucarioto e procariótico, sendo que em eucariotos o enovelamento ocorre simultaneamente à tradução, enquanto em procariotos é pós-traducional (LI et al., 2004).

Estas hipóteses ajudam a explicar por que a maioria das proteínas eucarióticas tende a se agregar quando superexpressa em procariotos. Contudo, o problema do enovelamento proteico não pode ser completamente compreendido sem considerar o contexto biológico do enovelamento, especialmente em proteínas grandes, multidomínios ou multisubunidades (ASLAN et al., 2016).

Diante das múltiplas variáveis que contribuem para a formação de corpos de inclusão, aliadas à dificuldade de renovar proteínas após purificação em condições desnaturantes, o principal objetivo na expressão de proteínas recombinantes tem sido o delineamento experimental visando aumentar a solubilidade. Entre as estratégias aplicadas para a MnP recombinante, destacam-se a redução da temperatura durante a indução e a adição de surfactantes ao meio de cultura, como Triton X-100 e Tween-80, que podem dificultar a formação de corpos de inclusão em *E. coli* (CHOI et al., 2008; TANG et al., 2004). Wang et al. adotaram estratégia semelhante, produzindo MnP recombinante solúvel na presença de quatro aditivos Triton X-100, Tween-80, etanol e glicerol, durante indução a 16°C, utilizando o vetor pET28a e a linhagem Rosetta (DE3) de *E. coli*. Considera-se essa abordagem como uma alternativa promissora para futuros ensaios visando obter a proteína na forma solúvel.

Uma das etapas realizadas neste trabalho para a recuperação proteica foi o *refolding*, com o objetivo de promover o redobramento adequado da enzima, foi possível recuperar a enzima em sua forma ativa, apresentando atividade enzimática, porém ainda em baixa proporção, indicando que novos protocolos de *refolding* e estratégias de expressão precisam ser investigados para viabilizar a produção de uma maior proporção de MnP funcional. Segundo Vohra et al. (2007), é essencial que o *refolding* promova a formação de pontes dissulfeto e a incorporação do grupo heme, garantindo a recuperação de MnP biologicamente ativa. Whitwam et al. (1995) também relataram que as condições de redobramento influenciam a recuperação de MnP heteróloga em *E. coli*, na presença de hemina, cálcio e glutathione oxidada.

A manganês peroxidase (MnP) pertence à família das catalases-peroxidases, apresentando um grupo heme no sítio ativo. Além disso, a formação de ligações dissulfeto, mediada por resíduos de cisteína, no presente estudo, a sequência contém sete desses resíduos,

o que pode favorecer a agregação da proteína em corpos de inclusão insolúveis, em vez da forma enzimaticamente ativa, tornando necessário o redobramento *in vitro* (RYOKO et al., 2014; YAMAGUCHI et al., 2013). Essas particularidades tornam o enovelamento proteico mais complexo, exigindo a combinação de diferentes aditivos. O ditioneitol (DTT) é adicionado para prevenir a oxidação de proteínas citoplasmáticas, enquanto o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) se liga a íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , promovendo pontes cruzadas com lipopolissacarídeos adjacentes e favorecendo condições adequadas para o redobramento (NORMA et al., 2011). Adicionalmente, CaCl_2 e hemina desempenham papel crucial na obtenção de peroxidases ativas, pois os íons Ca^{2+} são necessários para a formação de uma estrutura proteica capaz de incorporar corretamente o grupo heme (ASAD et al., 2013).

Outros fatores influenciam a formação de corpos de inclusão, como as altas temperaturas, altas taxas de tradução e a ausência de um ambiente oxidativo citoplasmático que favoreça a insolubilidade. Por outro lado, a redução da temperatura de indução diminui a taxa de síntese proteica, Esposito et al. (2006) relataram que temperaturas de expressão mais baixas melhoraram a solubilidade de proteínas em *E. coli*, enquanto temperaturas elevadas favoreceram a formação de proteína insolúvel em cepas da linhagem Rosetta (DE3). Esta estratégia foi adotada em nossos ensaios, mesmo com indução a 18°C e baixa concentração de IPTG, não foi possível observar aumento significativo da solubilidade da MnP.

Entretanto, a formação de corpos de inclusão não deve ser considerada apenas como desvantagem. Ela representa uma estratégia eficiente de produção heteróloga: o cultivo é de baixo custo, o crescimento é rápido, mais de 30% da proteína celular total pode ser expressa, a proteína é protegida da degradação proteolítica e o produto recombinante pode alcançar até 95% de pureza, com pequenas quantidades de contaminantes. WANG et al. (2016) compararam a atividade de MnP recombinante em *E. coli* e observaram que a proteína redobrada *in vitro* apresentou atividade superior à proteína solúvel. Assim, condições otimizadas de *refolding* podem ser cruciais para a produção enzimática funcional e eficiente.

Em relação aos resultados obtidos para a atividade catalítica, tanto o extrato fúngico quanto a MnP recombinante apresentaram valores mensuráveis, confirmando a presença da enzima em sua forma funcional, embora com baixa produtividade. Dessa forma, foram registrados valores de 3,266 U/L para o extrato fúngico e 3,542 U/L para a MnP recombinante.

Embora a atividade tenha sido confirmada, observou-se que os valores obtidos foram inferiores aos relatados em outros estudos com proteínas recombinantes. Por exemplo, Wang et al. (2022) relataram uma atividade de 3659,5 U/L para MnP recombinante expressa em *Pichia pastoris*, utilizando ABTS como substrato. De forma semelhante, Canul et al. (2020), ao empregar um sistema de expressão em *E. coli* com otimização de códons, obtiveram uma atividade de 166,3 U/L e atividade específica entre 0,196 e 0,179 U/mg resultados ainda significativamente superiores aos aqui observados.

No presente trabalho foi possível, portanto, produzir a enzima em sua forma ativa, apresentando atividade enzimática, porém ainda em baixa proporção, indicando que novos protocolos de *refolding* e estratégias de expressão precisam ser investigados para viabilizar a produção de uma maior proporção de MnP funcional.

5.CONCLUSÃO

Com base nos resultados parciais deste trabalho, conclui-se que a construção pET32a-MnP possibilitou a produção em *E. coli* da MnP recombinante, uma vez que, utilizando a cepa *E. coli* Rosetta (DE3), a proteína foi expressa na fração insolúvel na maior parte das condições testadas.

A atividade enzimática da MnP recombinante foi detectada em pequena quantidade, indicando que serão necessários novos delineamentos experimentais para obter uma maior proporção da proteína na forma solúvel ou redobrada adequadamente.

A otimização desses protocolos permitirá uma produção e caracterização funcional completa da enzima e contribuirá para o desenvolvimento de um processo de produção enzimática mais eficiente e economicamente viável, visando sua aplicação na deslignificação de biomassa

6. .REFERENCIAS

- ALFI A, ZHU B, DAMNJANOVIĆ J, KOJIMA T, IWASAKI Y, NAKANO H. Production of active manganese peroxidase in *Escherichia coli* by co-expression of chaperones and in vitro maturation by ATP-dependent chaperone release. **J Biosci Bioeng.** 2019.
- ALOIS JUNGBAUER, WALTRAUD KAAR, Current status of technical protein refolding, **Journal of Biotechnology**, Volume 128, Issue 3, 2007.
- ASAD, S., DABIRMANESH, B., GHAEMI, N. *et al.* Studies on the Refolding Process of Recombinant Horseradish Peroxidase. **Mol Biotechnol** 54,2013.
- ASLAN HWANHUI LEE, CHANG-MIN KANG, YOUNG MIN LEE, HANBYUL LEE, Cloning, Heterologous Expression and Properties of a Recombinant Active Turnip Peroxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2011.
- BAÊTA, B. E. L. **Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-deaçúcar considerando o contexto da biorrefinaria.** 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental – Tecnologia ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.
- CANUL AC, CARRILLO-CAMPOS J, BALLINAS-CASARRUBIAS ML, SOLIS-OVIEDO RL, HERNÁNDEZ-RASCÓN SK, HERNÁNDEZ-OCHOA LR, GUTIÉRREZ-MÉNDEZ N, GARCÍA-TRIANA A. Functional Expression and One-Step Protein Purification of Manganese Peroxidase 1 (rMnP1) from *Phanerochaete chrysosporium* Using the *E. coli*-Expression System. **Int J Mol Sci.** 2020.
- CHEOL-WON YUN, GYU-HYEOK KIM, JAE-JIN KIM, Heterologous expression of a new manganese-dependent peroxidase gene from *Peniophora incarnata* KUC8836 and its ability to remove anthracene in *Saccharomyces cerevisiae*, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Volume 122, Issue 6, 2016.
- CHOI JH, LEE SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2004.
- ESPOSITO D, CHATTERJEE DK. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. **Curr Opin Biotech.** 2006.
- LETO DF, JACKSON TA. Peroxomanganese complexes as an aid to understanding redox-active manganese enzymes. **J Biol Inorg Chem.** 2014.
- MING LI, ZHI-GUO SU, JAN-CHRISTER JANSON, In vitro protein refolding by chromatographic procedures, **Protein Expression and Purification**, Volume 33, Issue 1, 2004.
- NORMA A. RODRÍGUEZ-CABRERA, C. REGALADO, AND BLANCA E. GARCÍA-ALMENDÁREZ RYOKO NINOMIYA, BO ZHU, TAKAAKI KOJIMA, YUGO IWASAKI, HIDEO NAKANO, Role of disulfide bond isomerase DsbC, calcium ions, and hemin in cell-free protein synthesis of active manganese peroxidase isolated from *Phanerochaete chrysosporium*, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Volume 117, Issue 5, 2014.

RICE DB, MASSIE AA, JACKSON TA. Manganchaperone-Oxygen Intermediates in O-O Bond Activation and Hydrogen-Atom Transfer Reactions. **Acc Chem Res.** 2017

SCHEEL T, HÖFER M, LUDWIG S, HÖLKER U. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2000.

SURINDER MOHAN SINGH, AMULYA KUMAR PANDA, Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Volume 99, Issue 4, 2005.

TANG JB, YANG HM, SONG SL, ZHU P, JI AG. Effect of Glycine and Triton X-100 on secretion and expression of ZZ-EGFP fusion protein. **Food Chem.** 2008.

WANG N, REN K, JIA R, CHEN W, SUN R. Expression of a fungal manganese peroxidase in *Escherichia coli*: a comparison between the soluble and refolded enzymes. **BMC Biotechnol.** 2016.

WHITWAM RE, GAZARIAN IG, TIEN M. Expression of fungal Mn peroxidase in *E. coli* and refolding to yield active enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995.

YAMAGUCHI, S., YAMAMOTO, E., MANNEN, T., NAGAMUNE, T. AND NAGAMUNE, T. Protein refolding using chemical refolding additives. **Biotechnology Journal**, 8: 17-31. 2013.

ZELENA, Katerina Nadine Eisele, Ralf G. Berger, *Escherichia coli* as a production host for novel enzymes from basidiomycota, **Biotechnology Advances**, Volume 32, Issue 8, 2014

ZHOU XUAN-WEI, WEI-RAN CONG, KAI-QI SU & YONG-MING ZHANG. Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp: Current status and potential applications, **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, p. 416-426, 2013.

ZHOU XW, CONG WR, SU KQ, ZHANG YM. Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp: current status and potential applications. **Crit Rev Microbiol.** 2013.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial da sequência MnP-QOW95911.1 como candidata promissora para expressão heteróloga e caracterização funcional, bem como a viabilidade da construção pET32a-MnP para a produção da proteína recombinante. No entanto, a predominância da expressão na forma insolúvel e a baixa recuperação de enzima ativa evidenciam limitações nos protocolos empregados.

A partir dos dados obtidos, pode ser realizado o aprimoramento das condições de expressão heteróloga, incluindo o uso de cepas hospedeiras alternativas, uso de diferentes concentrações de surfactantes para a possibilidade da expressão na fração solúvel e ajustes de temperatura e indutores; desenvolvimento de protocolos de *refolding* mais eficientes, com combinações otimizadas de cofatores, aditivos redox e condições físico-químicas. Além disso, podem ser feitas otimizações das análises *in silico*, com aprofundamento em modelagem estrutural e dinâmica molecular para propor modificações da proteína.

A implementação dessas estratégias poderá viabilizar a obtenção de MnP em quantidades adequadas e em sua forma funcional, possibilitando a caracterização detalhada da proteína e, futuramente, perspectivas de aplicação industrial dessas enzimas, viabilizando o desenvolvimento de processos biotecnológicos mais eficientes e economicamente sustentáveis.

