

# Novas Enzimas para Aplicações nas áreas da Biodegradação e das Biorefinarias



## Projetos de Mestrado

### **Projeto 1 – Melhorar a termoestabilidade da PpAzoR, uma azoredutase de *Pseudomonas putida* MET94, por engenharia de proteínas**

Atualmente mais de 100,000 corantes sintéticos existem no mercado e mais de  $7 \times 10^5$  toneladas de corantes são produzidos anualmente cerca dos quais  $1-1.5 \times 10^5$  são libertados para o ambiente em águas residuais das indústrias têxtil. Estes corantes são dificilmente removidos destes efluentes através de tratamentos de água convencionais, levando à deterioração da qualidade da água sendo ainda, uma ameaça para a saúde pública, devido às suas propriedades mutagénicas e carcinogénicas. Os processos enzimáticos de biodegradação são particularmente promissores no tratamento dos efluentes com corantes sintéticos uma vez que devido à sua especificidade, as enzimas atacam unicamente as moléculas de corante, enquanto que os aditivos presentes, geralmente dispendiosos, mantêm-se intactos e podem ser potencialmente re-utilizados. Recentemente, mostrámos que a enzima PpAzoR de *P. putida* MET94 é uma NADPH:corante oxidoreductase dependente de FMN que mostra uma especificidade bastante alargada para corantes da classe azo. No entanto, no decurso da sua caracterização bioquímica verificámos que a sua estabilidade operacional é bastante reduzida, com um tempo de meia vida de 30 min a 40°C, o que é um forte impeditivo à sua aplicação biotecnológica. Propomo-nos neste projecto, proceder à evolução da PpAzoR para maior estabilidade, através de técnicas de mutagénese aleatória seguidas de rastreio robótico. Os variantes que apresentarem maior estabilidade após a primeira geração, serão optimizados em ciclos subsequentes até se isolar um variante suficientemente robusto e assim, com um potencial de biotransformação maximizado.

### **Projeto 2 – À descoberta do mecanismo catalítico de DyP-peroxidases bacterianas**

As peroxidases são enzimas que contém um grupo hémico e que utilizam o peróxido de hidrogénio como aceitador de electrões na catálise de inúmeras reações oxidativas com aplicações nas áreas de diagnóstico e das bio-indústrias. Recentemente, uma nova família de peroxidases foi identificada em várias espécies fúngicas e em algumas bactérias. Estas novas enzimas foram descritas como oxidando corantes sintéticos do tipo antraquinónico, exibindo elevado potencial redox, que não são convertidos por nenhuma outra peroxidase descrita até à data, tendo-se proposto classificá-las como pertencentes à família das “dye-decolourising peroxidases (DyP)”. As DyP mostram uma divergência estrutural das peroxidases clássicas com origem nas plantas ou animais, faltando-lhes por exemplo, a

histidina conservada distal típica. Mostram uma especificidade alargada para substratos, um pH óptimo na zona acídica e mostraram ser enzimas relevantes na área da degradação de material linhocelulósico, nomeadamente de unidades fenólicas e não fenólicas da lenhina. Recentemente fizemos um rastreio para a presença de DyP em bases de dados genómicos e clonámos e expressámos em *Escherichia coli* dois genes que codificam para enzimas do tipo DyP de *Pseudomonas putida* MET94 e de *Bacillus subtilis*. A caracterização cinética destas enzimas permitirá entender os determinantes moleculares da especificidade para os diversos substratos com uma importância fundamental quer sob o ponto de vista fundamental, quer na definição do seu potencial biotecnológico.

### **Projeto 3 – Papel dos motivos ricos em metionina na especificidade das enzimas “multicopper oxidases”**

“Multicopper oxidases” (MCOs) são uma família grande de enzimas que acoplam a oxidação de substratos à redução de oxigénio molecular a água. Esta família é única entre as proteínas que incorporam cobre uma vez que contêm os três tipos de centros de cobre, tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) e o binuclear tipo 3 (T3). O centro T1 é o local de oxidação de substrato, e a este respeito, as MCOs podem ser divididas em duas classes; as enzimas que oxidam substratos aromáticos com elevada eficiência, i.e. laccases, e as que apresentam como substratos preferenciais iões metálicos, como o Cu(I) ou o Fe(II), sendo designadas por metalo-oxidases. As metalo-oxidases são enzimas envolvidas na regulação da concentração de iões no meio intracelular dos organismos que as contêm. De facto, sendo os metais essenciais, a sua concentração não pode ultrapassar níveis quasi residuais, sem que a sua presença não assuma um carácter de forte citotoxicidade. São desconhecidos as características estruturais que determinam a diferente função das lacases versus metalo-oxidases. Neste projecto vamos focar a nossa atenção na metalo-oxidase McoA de *Aquifex aeolicus*, uma enzima hipertermofílica e hipertermoestável. Esta enzima possui perto do centro catalítico T1 uma região de 42 aminoácidos que contém 12 resíduos de metionina, remanescente das existentes nas proteínas de homeostase de cobre. Verificámos que esta região modula a actividade enzimática, muito provavelmente através da ligação e libertação de cobre exógeno. Neste projeto, pretendemos determinar a afinidade deste segmento pelo cobre, através da utilização de péptidos modelo, e identificar os resíduos de Met envolvidos na sua ligação/coordenação. Os resultados obtidos contribuirão para identificar os factores envolvidos na eficiência e selectividade das MCOs.

#### **Áreas:**

Biotecnologia/Bioquímica/Microbiologia/ Biologia Molecular/Engenharia de proteínas

#### **Supervisor:**

Lígia O. Martins,  
Laboratório de Tecnologia Microbiana e Enzimática,  
ITQB/UNL, Oeiras.  
Tel: 214469534, E-mail: [lmartins@itqb.unl.pt](mailto:lmartins@itqb.unl.pt)

