



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Caroline Torres de Oliveira

**Produção, purificação, caracterização e insights estruturais de cutinases do ascomiceto
Fusarium verticillioides: de sistemas convencionais de produção via fermentação em
estado sólido à expressão heteróloga em *Escherichia coli***

FLORIANÓPOLIS

2023

Caroline Torres de Oliveira

**Produção, purificação, caracterização e insights estruturais de cutinases do ascomiceto
Fusarium verticillioides: de sistemas convencionais de produção via fermentação em
estado sólido à expressão heteróloga em *Escherichia coli***

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia
Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira.

Coorientadores: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.

Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

FLORIANÓPOLIS

2023

Torres de Oliveira, Caroline

Produção, purificação, caracterização e insights estruturais de cutinases do ascomiceto *Fusarium verticillioides* : de sistemas convencionais de produção via fermentação em estado sólido à expressão heteróloga em *Escherichia coli* / Caroline Torres de Oliveira ; orientadora, Débora de Oliveira, coorientador, Marcio Antonio Mazutti, coorientador, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, 2023.

183 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Enzimas. 3. Fermentação em estado sólido. 4. Expressão heteróloga. 5. Caracterização de enzimas. I. de Oliveira, Débora. II. Antonio Mazutti, Marcio. III. Amarante Guimarães Pereira, Gonçalo IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Caroline Torres de Oliveira

Produção, purificação, caracterização e insights estruturais de cutinases do ascomiceto *Fusarium verticillioides*: de sistemas convencionais de produção via fermentação em estado sólido à expressão heteróloga em *Escherichia coli*

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 21 de julho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Raquel Cristine Kuhn, Dra.

Instituição: Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Prof. Fellipe da Silva Bezerra de Mello, Dr.

Instituição: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Prof. Cristiano José de Andrade, Dr.

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. (a) Débora de Oliveira, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Segundo Maurice Halbwachs, nossas lembranças são coletivas, porque nunca estamos sozinhos. E essa etapa do doutorado foi repleta de desafios e participações especiais. Agradeço especialmente aos meus pais por acreditarem em mim e por não terem medido esforços para que eu chegasse ao fim dessa etapa. Ao meu irmão Afonso que acompanhou de perto meu dia a dia como pesquisadora em um dos momentos mais desafiadores de nossas vidas e, apesar de nossas diferenças, me apoiou imensamente nesse processo, muito obrigada por tudo!

À minha amiga Karina, que acompanhou cada etapa desse processo, os momentos difíceis e os de alegria. Obrigada pela amizade, pelos conselhos, pelos risos e por ter compartilhado essa jornada comigo mesmo a quilômetros de distância.

Meu agradecimento especial ao meu companheiro Kaique por todo o apoio, incentivo e companheirismo. Obrigada por tornar o caminho mais leve, pelos conselhos e por me ouvir nos dias que pensei em desistir. Você faz parte dessa conquista e eu sou imensamente grata por tudo.

Agradeço aos meus orientadores professores Débora de Oliveira, Marcio Mazutti e Gonçalo Pereira, pela orientação, apoio, paciência, compreensão, incentivo e conhecimento transmitido.

Obrigada aos Laboratórios de Simulação Numérica de Sistemas Químicos e de Transferência de Massa (LABSIN-LABMASSA) pela parceria no desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço aos colegas do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos que de alguma forma participaram dessa conquista. À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e a todos os professores e demais funcionários, meu mais sincero agradecimento, o apoio de todos foi essencial para este trabalho.

Agradeço à equipe do Laboratório de Bioprocessos (LaBiP) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela parceria que viabilizou o desenvolvimento de parte dessa pesquisa. Vocês foram fundamentais!

Meu muito obrigada às equipes dos Laboratórios de Genômica e Bioenergia (LGE) e de Enzimologia e Biologia Molecular de Microrganismos (LEBIMO) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por possibilitarem o desenvolvimento de grande parte desta pesquisa. Obrigada pela parceria, pelos cafés e pelas trocas de experiências. Vocês fazem parte do maior desafio da minha vida acadêmica. Agradeço especialmente a Michelle Alexandrino pela paciência, dedicação, apoio, companheirismo e pelo conhecimento transmitido nesses últimos anos. Meu agradecimento especial também ao João Paulo pela colaboração.

Meus sinceros agradecimentos à equipe da OMA Ativos Ambientais pelo apoio na reta final desta caminhada. Obrigada a todos pelo carinho e por tornarem o dia da minha defesa mais leve e feliz.

A caminhada foi longa e fui muito bem recebida em cada lugar que passei. Então deixo aqui o meu profundo agradecimento aos amigos e amigas de longa data e aqueles que fiz durante essa caminhada. Sou extremamente grata pela amizade e companheirismo! Obrigada por todos os conselhos, pelos risos e momentos de descontração. Vocês fazem parte dessa conquista!

Por fim, agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro e a todos que de certa forma colaboraram para que este projeto se concretizasse.

“A única coisa permanente na vida é a mudança.”

Tim Berners-Lee

RESUMO

As cutinases são serina esterases pertencentes à superfamília das α/β hidrolases. Os substratos naturais dessas enzimas são cutina e suberina, componentes da cutícula vegetal. Alguns fungos filamentosos produzem cutinases como estratégia para facilitar a infecção de plantas. Os primeiros relatos da detecção de cutinases ocorreram na década de 1960 e estavam relacionados a características de patogenicidade e virulência de alguns fungos produtores dessa enzima. O aumento no interesse por cutinases tem ocorrido principalmente devido ao seu potencial para hidrólise de plásticos. No entanto, essas enzimas são capazes de hidrolisar diversos outros substratos, como cutículas de plantas, para obtenção de produtos com valor agregado. As cutinases de *Fusarium verticillioides* são pouco exploradas na literatura. Nesse sentido, o presente estudo tem por objetivo explorar as cutinases produzidas pelo ascomiceto *F. verticillioides*. Para tanto foi avaliada a produção de cutinase pelo microrganismo selvagem via fermentação em estado sólido (FES) e a produção via expressão heteróloga. A produção via FES foi otimizada. A composição do meio foi uma das variáveis avaliadas, com o objetivo de aumentar a porosidade do substrato sólido. Após otimização e avaliação dos parâmetros espessura do meio e tempo de fermentação a atividade de cutinase aumentou aproximadamente 10 vezes. A atividade chegou a 9,14 U/g_{substrato} para uma espessura de substrato de 4 cm e 12 dias de fermentação. Na etapa de scale up, a produção de cutinase em reator com agitação mecânica não obteve sucesso. A maior atividade para 7 dias de fermentação foi 0,4 U/g_{substrato}. A produção em reator de leito fixo foi razoavelmente superior (1,3 U/g_{substrato} em 7 dias). As baixas atividades obtidas no scale up podem ser atribuídas a condições ambientais e ao menor tempo de fermentação avaliado, em comparação com a atividade em frascos menores. Diante das limitações de produção da enzima pelo microrganismo selvagem utilizando FES, as cutinases de *F. verticillioides* foram produzidas por expressão heteróloga e caracterizadas individualmente quanto a função e estrutura. As três sequências codificadoras de cutinases (CDS) foram clonadas, produzidas em *Escherichia coli* e purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC). *FvCut1* apresenta diferenças estruturais e funcionais mais evidentes. *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* apresentaram temperaturas ótimas de 20, 40 e 35 °C e pH ótimo de 9, 7 e 8, respectivamente. Alguns produtos químicos foram capazes de melhorar a atividade enzimática, como CaCl₂ e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) no caso de *FvCut1* e Triton X-100 para *FvCut2* e *FvCut3*, enquanto o KCl mostrou o mesmo efeito para *FvCut3*. Os parâmetros cinéticos revelaram que *FvCut1* possui maior eficiência enzimática no substrato p-nitrofenilbutirato (p-NPB) em comparação com *FvCut2* e *FvCut3*. A estrutura tridimensional

dessas enzimas revela que as três cutinases possuem um sítio catalítico do tipo fenda rasa exposta ao solvente, típico de cutinases. *FvCut1* possui um sítio catalítico mais fechado. Essa abertura de fenda pequena pode resultar em dificuldade para hidrolisar substratos volumosos, como polietileno tereftalato (PET). Portanto, *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* foram avaliadas quanto a capacidade de hidrolisar PET e não foi possível detectar produtos de hidrólise nas amostras avaliadas. Um indício de que essas cutinases apresentam dificuldade para hidrolisar esse tipo de polímero. Essa foi a primeira vez que se avaliou o scale-up da produção de cutinases de *F. verticillioides* via FES e, também, a primeira vez que três cutinases desse fungo foram expressas em sistema procarioto e caracterizadas funcional e estruturalmente. Os resultados do presente estudo fornecem insights que podem orientar a produção de cutinases de *F. verticillioides* e influenciar futuras decisões referentes a aplicações dessas enzimas, além de contribuir para a ampliação do conhecimento da diversidade de cutinases.

Palavras-chave: Fungos. Casca de arroz. Fermentação em estado sólido. Cutinases recombinantes. Caracterização funcional. Caracterização estrutural.

ABSTRACT

Cutinases are serine esterases belonging to the α/β hydrolases superfamily. The natural substrates of these enzymes are cutin and suberin, components of the plant cuticle. Some filamentous fungi produce cutinases as a strategy to facilitate plant infection. The first reports of the detection of cutinases occurred in the 1960s and were related to the pathogenicity and virulence characteristics of some fungi that produce this enzyme. The increased interest in cutinases has been mainly due to their potential for the hydrolysis of plastics. However, these enzymes can hydrolyze several other substrates, plant cuticles to obtain products with added value. *Fusarium verticillioides* cutinases are little explored in the literature. In this sense, the present study aims to explore the cutinases produced by the ascomycete *F. verticillioides*, contributing to increasing knowledge about the diversity of cutinases. For this purpose, cutinase production by the wild microorganism via solid-state fermentation (FES) and production via heterologous expression were evaluated. Production via FES has been optimized. The composition of the medium was one of the evaluated variables, with the aim of increasing the porosity of the solid substrate. After optimization and evaluation of the parameters of medium thickness and fermentation time, the cutinase activity increased approximately 10 times. The activity reached 9.14 U/g_{substrate} for a substrate thickness of 4 cm and 12 days of fermentation. In the scale-up stage, the production of cutinase in a reactor with mechanical agitation was unsuccessful. The highest activity for 7 days of fermentation was 0.4 U/g_{substrate}. Production in a fixed bed reactor was reasonably higher (1.3 U/g_{substrate} in 7 days). The low activities obtained in the scale-up can be attributed to environmental conditions and the shorter fermentation time evaluated, in comparison with the activity in smaller flasks. Given the limitations of enzyme production by the wild microorganism using FES, cutinases from *F. verticillioides* were produced by heterologous expression and individually characterized in terms of functionality and structure. The three cutinases coding sequences (CDS) were cloned, produced in *Escherichia coli* and purified by size exclusion chromatography (SEC). *FvCut1* presents more evident structural and functional differences. *FvCut1*, *FvCut2* and *FvCut3* showed optimum temperatures of 20, 40 and 35 °C and optimum pH of 9, 7 and 8, respectively. Some chemicals were able to improve enzyme activity, such as CaCl₂ and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) in the case of *FvCut1* and Triton X-100 for *FvCut2* and *FvCut3*, while KCl showed the same effect for *FvCut3*. Kinetic parameters revealed that *FvCut1* has higher enzymatic efficiency on p-nitrophenylbutyrate (p-NPB) substrate than *FvCut2* and *FvCut3*. The three-dimensional structure of these enzymes reveals that the three cutinases have a shallow slit-type

catalytic site exposed to the solvent, typical of cutinases. *FvCut1* has a more closed catalytic site. This small slit opening can result in difficulty hydrolyzing bulky substrates such as polyethylene terephthalate (PET). Therefore, *FvCut1*, *FvCut2* and *FvCut3* were evaluated for their ability to hydrolyze PET and it was not possible to detect hydrolysis products in the evaluated samples. An indication that these cutinases have difficulty hydrolyzing this type of polymer. This was the first time that the scale-up of cutinase production by *F. verticillioides* was evaluated via FES, and the first time that three cutinases from this fungus were expressed in a prokaryotic system and functionally and structurally characterized. The results of the present study provide insights that can guide the production of cutinases by *F. verticillioides* and influence future decisions regarding the application of these enzymes, in addition to contributing to the expansion of knowledge of the diversity of cutinases.

Keywords: Fungi. Rice husk. Solid-state fermentation. Recombinant cutinases. Functional characterization. Structural characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização da cutícula de plantas e estrutura molecular da cutina. A) Imagem de microscopia da seção transversal do pericarpo de frutos de tomate. A cutícula da planta é a membrana mais externa (amarela) que cobre a epiderme. B) Possível estrutura molecular da cutina.	22
Figura 2: Interação de um fungo hemibiotrófico com a planta hospedeira. No estágio inicial de infecção os esporos entram em contato com a superfície da cutícula e secretam cutinases que liberam monômeros de cutina de forma localizada. Os primeiros monômeros liberados emitem sinais para a secreção de mais cutinases para a continuação e progressão da infecção. Em seguida ocorre o desenvolvimento de uma estrutura de infecção especializada chamada apressório, que coloniza a célula infectada sem causar morte celular (estágio inicial). Posteriormente, em um estágio avançado de infecção, ocorre a degradação parede celular e da membrana plasmática, seguida da morte celular (estágio final).....	27
Figura 3: Estrutura do grão de arroz e componentes da casca e farelo do arroz.	30
Figura 4: Esquema geral de produção de enzimas por expressão heteróloga usando <i>E. coli</i> como hospedeiro de expressão.	36
Figura 5: Estrutura geral para um vetor de expressão ideal.	39
Figura 6: Estrutura tridimensional da LC-cutinase do tipo selvagem (magenta) (PDB: 4EB0) e LC-cutinase variante (rosa claro) (PDB: 6THT). (A) A estrutura é representada em forma de desenho com destaque para os aminoácidos da tríade catalítica (amarelo) e aminoácidos mutantes (verde). (B) Representação da superfície de contato da enzima com o solvente, destacando os aminoácidos da tríade catalítica (amarelo) e aminoácidos mutados (verde).....	68
Figura 7: Fluxograma das etapas experimentais desenvolvidas. A etapa 1 refere-se à produção de cutinase pelo fungo selvagem e resultou em baixos rendimentos enzimáticos. A etapa 2 refere-se à produção das cutinases de <i>F. verticillioides</i> em um sistema de expressão	72
Figura 8: Configuração do biorreator com agitação mecânica utilizado nos testes de aumento de escala da produção de cutinase de <i>F. verticillioides</i>	76
Figura 9: Configuração do biorreator de leito fixo utilizado nos testes de aumento de escala da produção de cutinase de <i>F. verticillioides</i>	77
Figura 10: Mapa do vetor de expressão pET28a (+) utilizado para produção das cutinases de <i>F. verticillioides</i> nas cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e Arctic Express (DE3) antes da clonagem dos genes de cutinase.	80

Figura 11: Fluxo de trabalho geral para purificação de proteína com etiqueta 6xHis por IMAC usando resina TALON carregada com Co^{2+} . A coluna é carregada com a fração solúvel de cutinase, em seguida são realizadas etapas de lavagem para eliminar compostos indesejáveis, inclusive outras proteínas, por fim a cutinase marcada com a etiqueta 6xHis é eluída em tampão com imidazol.	82
Figura 12: Superfície de contorno para atividade de cutinase otimizada através do planejamento DCCR para três variáveis independentes (umidade, temperatura, composição do meio). A) Região de atividade ótima (vermelho escuro) quando a umidade foi fixada em 86,8%. B) Região de atividade ótima (vermelho escuro) quando a temperatura foi fixada em 26 °C. C) Região de atividade ótima (vermelho escuro) quando a composição do meio foi fixada em 70% farelo de arroz e 30% casca de arroz.	92
Figura 13: Efeito de diferentes espessuras do substrato na atividade de cutinase para processo de produção via FES em frascos cilíndricos.....	94
Figura 14: Efeito de diferentes tempos de fermentação na atividade enzimática de cutinase via FES em frascos cilíndricos.	95
Figura 15: Mapa do vetor de expressão pET28a contendo o gene de <i>FvCut1</i>	98
Figura 16: Mapa do vetor de expressão pET28a contendo o gene de <i>FvCut2</i>	99
Figura 17: Mapa do vetor de expressão pET28a contendo o gene de <i>FvCut3</i>	99
Figura 18: Análise de SDS-PAGE de <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> , e <i>FvCut3</i> após a primeira etapa de purificação por IMAC. A primeira coluna corresponde ao marcador molecular (kDa). O tamanho esperado das cutinases é aproximadamente 25 kDa. As colunas <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> , e <i>FvCut3</i> correspondem as amostras purificadas contendo as respectivas cutinases.....	100
Figura 19: Análise de SDS-PAGE após segunda etapa de purificação por SEC de A) <i>FvCut2</i> , B) <i>FvCut1</i> e <i>FvCut3</i> . A primeira coluna corresponde ao marcador molecular (kDa). O tamanho esperado das cutinases é aproximadamente 25 kDa.	101
Figura 20: Análise filogenética de sequências de cutinase caracterizadas recuperadas do banco de dados CAZy, banco de dados Uniprot (dentro do grupo Sordariomycetes) e as três sequências previstas encontradas no genoma de <i>F. verticillioides</i> (banco de dados Ensembl Fungi). A análise de máxima verossimilhança foi realizada no modo “a la carte” para classificar as sequências de CE5 CDSs em acetil xilana esterases (clado vermelho) ou cutinases (clado roxo) e PETases (clado verde).	102
Figura 21: Alinhamento das sequências de aminoácidos das cutinases de <i>F. verticillioides</i> (<i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i>) e LC-cutinase, conhecida pelo potencial para hidrólise de PET. Na parte inferior da figura são apresentados os percentuais de identidade das quatro enzimas..	103

Figura 22: Efeito da temperatura na atividade enzimática de <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i> . As reações ocorreram por 2 min em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,7, utilizando p-NPB (1 mM) como substrato.....	105
Figura 23: Efeito do pH na atividade enzimática de <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i> . As reações ocorreram por 2 min na temperatura ótima de cada enzima, tampão 50 mM, usando p-NPB (1 mM) como substrato.....	106
Figura 24: Efeito de 1 mM (cinza claro) e 5 mM (cinza escuro) de íons metálicos na atividade enzimática de <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i> . As reações ocorreram por 2 min em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9, 20 °C para <i>FvCut1</i> , pH 7, 40 °C para <i>FvCut2</i> e pH 8, 35 °C para <i>FvCut3</i> , usando p-NPB (1 mM) como substrato.	108
Figura 25: Efeito de 15% v/v (cinza claro) e 30% v/v (cinza escuro) de solventes orgânicos na atividade enzimática de <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i> . As reações ocorreram por 2 min em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9, 20 °C para <i>FvCut1</i> , pH 7, 40 °C para <i>FvCut2</i> e pH 8, 35 °C para <i>FvCut3</i> , usando p-NPB (1 mM) como substrato.	110
Figura 26: Efeitos de 1 mM (cinza claro) e 5 mM (cinza escuro) de inibidores e detergentes na atividade enzimática de <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i>	113
Figura 27: Detalhes estruturais de <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i> . A). Modelo geral da estrutura de <i>FvCut1</i> sobreposta com o template HiC (PDB: 4OYY.1) (I), <i>FvCut2</i> e FsC (PDB: 1XZM.1) (II), <i>FvCut3</i> e FoC (PDB: 5AJH.2) (III). B) Modelo da superfície de acesso ao solvente com o sítio catalítico destacado em amarelo para <i>FvCut1</i> (I), <i>FvCut2</i> (II) e <i>FvCut3</i> (III). C) Detalhes do sítio catalítico mostrando a tríade catalítica (Asp, His, e Ser) para <i>FvCut1</i> (I), <i>FvCut2</i> (II) e <i>FvCut3</i> (III).....	117
Figura 28: Diferenças estruturais de <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i> são destacadas com um círculo preto. O sítio ativo de cada enzima está destacado em amarelo.....	118
Figura 29: Estrutura das cutinases com identificação das ligações dissulfeto (verde) de <i>FvCut1</i> (A), <i>FvCut2</i> (B) e <i>FvCut3</i> (C). Os sítios ativos das enzimas estão destacados em amarelo. .	119
Figura 30: Cromatograma A.) dos produtos padrão da hidrólise de PET (TPA e BHET), B.) da reação controle (sem enzima) e as amostras de PET após hidrólise enzimática com <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i> a 30 °C.	122
Figura 31: Cromatograma A.) dos produtos padrão da hidrólise de PET (TPA e BHET), B.) da reação de controle (sem enzima) e as amostras de PET após hidrólise enzimática com <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i> a 50 °C.	123
Figura 32: Curva de calibração de p-NP para as reações com volume de 4 mL, referentes ao tópico 4.1.7 Determinação da atividade de cutinase.	179

Figura 33: Curva de calibração de p-NP para as reações com volume de 200 μ L, referentes ao tópico 4.2.5 Atividade enzimática. 179

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Microrganismos <i>Fusarium</i> sp. produtores de cutinase.....	25
Tabela 2: Subprodutos agroindústrias utilizados na produção de cutinase microbiana.	30
Tabela 3: Sistemas procariotos utilizados para expressão de diferentes cutinases.	39
Tabela 4: Cutinases com atividade hidrolítica em polímeros.....	49
Tabela 5: Efeitos estruturais e funcionais de mutações em cutinases.	58
Tabela 6: Matriz do planejamento Plackett-Burmann para seleção de variáveis significativas no processo de fermentação. Planejamento consistiu em 12 experimentos variando os valores de cada variável em torno dos pontos centrais. Foram realizados cinco ensaios com os valores médios das variáveis (pontos centrais). Todos os valores reais e codificados utilizados para os cálculos estatísticos são fornecidos na tabela.	74
Tabela 7: Matriz do planejamento DCCR para otimização das variáveis significativas no processo de fermentação. Planejamento consistiu na avaliação de três variáveis independentes (temperatura, umidade e a porcentagem de farelo de arroz). Todos os valores reais e codificados das variáveis, utilizados para os cálculos estatísticos, são fornecidos na tabela.	75
Tabela 8: Matriz do planejamento Plackett-Burmann para seleção de variáveis significativas no processo de fermentação. Planejamento consistiu em 12 experimentos variando os valores de cada variável em torno dos pontos centrais. Foram realizados cinco ensaios com os valores médios das variáveis (pontos centrais). Todos os valores reais e codificados utilizados para os cálculos estatísticos são fornecidos na tabela, assim como os resultados em termos de atividade enzimática.....	88
Tabela 9: Efeitos individual e médio das variáveis analisadas no planejamento Plackett-Burman sobre a atividade de cutinase produzida via FES.	89
Tabela 10: Matriz do planejamento DCCR para otimização das variáveis significativas no processo de fermentação. Planejamento consistiu na avaliação de três variáveis independentes (temperatura, umidade e a porcentagem de farelo de arroz). Todos os valores reais e codificados das variáveis, utilizados para os cálculos estatísticos, são fornecidos na tabela, assim como os resultados em termos de atividade enzimática.	89
Tabela 11: Composição centesimal dos substratos farelo e casca de arroz, utilizados na FES para produção de cutinase.....	91
Tabela 12: Efeitos lineares (L), quadráticos (Q) e de interação entre variáveis do DCCR na produção enzimática. ($R^2 = 0,89957$).	92
Tabela 13: Parâmetros cinéticos de $F_v\text{Cut}1$, $F_v\text{Cut}2$ e $F_v\text{Cut}3$	115

Tabela 14: Comprimentos de onda e tempos de retenção para os picos detectados no cromatograma das amostras de PET após hidrólise com <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i> nas temperaturas de 30 e 50 °C.....	124
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C 16 – Cadeia de 16 carbonos

C 18 – Cadeia de 18 carbonos

p-NPA – p-nitrofenil acetato

p-NPB – p-nitrofenil butirato

cDNA – DNA complementar

lon – Serina peptidase

ompT – Aspartil protease

EPA – Ácido eicosapentaenóico

DHA – Ácido docosahexaenóico

FES – Fermentação em estado sólido

PET – Polietileno tereftalato

PCL – Policaprolactona

PLLA – Ácido Poli-L-Lático

PBS – Polibutileno succinato

PBSA – Polibutileno succinato adipato

PES – Polietileno succinate

PBA – Polibutileno adipato

PBSub – Polibutileno suberato

GenBank – Banco de dados de anotações de sequências de nucleotídeos

PDB – Banco de dados de proteínas

UniprotKB – Banco de dados universal de proteínas

ENA – Arquivo europeu de nucleotídeos

TPA – Ácido tereftálico

MHET – Monoetil-2-hidroxiethyltereftalato

BHET – Tereftalato de bis-hidroxiethyl

CAZymes – Enzimas ativas de carboidratos

CAZy – Banco de dados de enzimas ativas em carboidratos

CE5 – Família carboidrato-esterase 5

NCBI – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

BDA - Batata-dextrose- ágar

PB12 – Planejamento experimental Plackett-Burmann com 12 experimentos

DCCR – Delineamento composto central rotacional

THF – Tetrahydrofurano

CDS – Sequência codificadora

FvCut1 – Cutinase 1 de *Fusarium verticillioides*

FvCut2 – Cutinase 2 de *Fusarium verticillioides*

FvCut3 – Cutinase 3 de *Fusarium verticillioides*

6xHis-tag – Etiqueta de poli-histidina

LB – Meio Luria-Bertani

DH5 α – Cepa de *Escherichia coli*

BL21(DE3) – Cepa de *Escherichia coli*

Arctic Express (DE3) – Cepa de *Escherichia coli*

IPTG - Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosido

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil

IMAC - Cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados

SEC - Cromatografia de exclusão de tamanho

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida

DMSO - Dimetil sulfóxido

SDS - Dodecil sulfato de sódio

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

pb – Pares de base

pI - Ponto isoelétrico

aLRT - Approximate Likelihood-Ratio Test

SUMÁRIO

DIAGRAMA CONCEITUAL.....	20
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 OBJETIVOS	21
1.1.1 Objetivo Geral.....	21
1.1.2 Objetivos Específicos.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 CUTINASES	22
2.2 PRODUÇÃO DE CUTINASES	24
2.2.1 Microrganismos produtores de cutinase.....	25
2.2.2 Processo de fermentação	28
2.2.3 Escalonamento	32
2.3 CUTINASES RECOMBINANTES	34
2.3.1 Sistemas de expressão procariotos na produção de cutinases.....	35
2.3.2 Sistemas de expressão eucariotos na produção de cutinases.....	41
2.4 APLICAÇÕES.....	43
2.4.1 Degradação de plásticos	46
2.4.2 Otimização de cutinases via engenharia de proteínas	57
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	71
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
3.1 PRODUÇÃO DE CUTINASE PELO MICRORGANISMO NATIVO.....	72
3.1.1 Substratos e outros químicos.....	72
3.1.2 Microrganismo e inóculo	73
3.1.3 Fermentação em estado sólido	73
3.1.4 Composição centesimal do substrato	75
3.1.5 <i>Scale up</i> da produção de cutinase.....	76
3.1.6 Extração da enzima	77
3.1.7 Determinação da atividade de cutinase	78
3.1.8 Análise estatística dos resultados	78
3.2 PRODUÇÃO DE CUTINASE RECOMBINANTE DE <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	78
3.2.1 Análise das sequências de cutinases.....	78
3.2.2 Análise filogenética das cutinases.....	79
3.2.3 Produção da proteína recombinante	79
3.2.4 Purificação da proteína.....	81

3.2.5 Atividade enzimática.....	83
3.2.6 Caracterização das cutinases	84
3.2.7 Modelagem por homologia	85
3.2.8 Análises de hidrólise de PET	85
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1 PRODUÇÃO DE CUTINASE PELO MICRORGANISMO NATIVO.....	87
4.1.1 <i>Screening</i> de variáveis para o processo de fermentação	87
4.1.2 Escalonamento da produção de cutinase	96
4.2 PRODUÇÃO DE CUTINASE RECOMBINANTE.....	97
4.2.1 Análise das sequências e otimização de codon dos três genes de cutinases de <i>Fusarium verticillioides</i>	98
4.2.2 Análise filogenética das cutinases.....	101
4.2.3 Efeitos da temperatura e do pH na atividade enzimática de <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i>	104
4.2.4 Efeitos de solventes orgânicos, íons metálicos, inibidores e detergentes na atividade enzimática.....	107
4.2.5 Parâmetros cinéticos de <i>FvCut1</i> , <i>FvCut2</i> e <i>FvCut3</i>	115
4.2.6 Estrutura tridimensional das cutinases de <i>Fusarium verticillioides</i>	115
4.2.7 Análises de hidrólise de PET	121
5 CONCLUSÃO.....	125
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	127
REFERÊNCIAS	128
ANEXO A – Composição centesimal	154
ANEXO B – Relatórios de otimização de genes	160
ANEXO C – Gráficos de Ramachandran	176
ANEXO D – Curvas de calibração	179

DIAGRAMA CONCEITUAL

POR QUE?

- A cutinase é uma enzima multifuncional e com potencial aplicação na hidrólise de vários polímeros sintéticos e naturais;
- Existe um grande número de cutinases inexploradas.
- Considerando a possibilidade de aplicação da cutinase surge a necessidade de desenvolver estratégias de aumento da produção da enzima.
- O aumento de escala e o uso estratégias de engenharia genética são geralmente aplicadas para o aumento da produção de outras biomoléculas.
- A expressão heteróloga é frequentemente utilizada para contornar as limitações de microrganismos selvagens.

QUEM FEZ?

- Não foram encontrados na literatura relatos do aumento de escala da produção de cutinase via fermentação em estado sólido;
- A produção de cutinases recombinantes de *Fusarium verticillioides* em sistema procarioto não foi relatada na literatura,
- Caracterização funcional e *insights* estruturais das cutinases de *F. verticillioides* não foram reportados na literatura.

HIPÓTESES

- Quais parâmetros influenciam significativamente no processo em pequena escala?
- O aumento de escala na produção de cutinase aplicando reatores com e sem agitação é eficiente?
- Um microrganismo procarioto é capaz de expressar as cutinases de *F. verticillioides*?
- Quais são as principais características funcionais e estruturais das cutinases de *F. verticillioides*?
- Essas cutinases são capazes de liberar produtos de degradação de PET?

METODOLOGIAS

- Planejamentos experimentais para avaliação da significância de variáveis do processo de fermentação em estado sólido;
- Estratégias de aumento de escala;
- Descobertas dos genes de cutinase de *F. verticillioides*;
- Produção, purificação e caracterização funcional e estrutural das enzimas recombinantes.

RESPOSTAS

- Produzir cutinase, em maior escala, com valores de atividade semelhantes àqueles obtidos em pequena escala;
- Produzir cutinases recombinantes funcionais em sistema de expressão procarioto.

1 INTRODUÇÃO

Cutinases (EC 3.1.1.74) são uma classe de enzimas que hidrolisam poliésteres naturais, além de ésteres de ácidos graxos solúveis, triglicerídeos e poliésteres sintéticos de alto peso molecular (CARVALHO; AIRES-BARROS; CABRAL, 1999; DIMAROGONA et al., 2015b; GUI et al., 2018). As primeiras publicações relatando a detecção de cutinases ocorreram na década de 1960. Foi relatada a capacidade do fungo *Penicillium spinulosum* de hidrolisar materiais cerosos e penetrar na camada cuticular das folhas (HEINEN, 1960, 1962). A partir dessa descoberta, outros fungos fitopatogênicos passaram a ser avaliados quanto à capacidade de produção dessa enzima (LINSKENS; HAAGE, 1963).

Na década de 1970, um grupo de pesquisadores estudou a biossíntese da cutina, a composição desse polímero (KOLATTUKUDY, 1970) e os processos de despolimerização com cutinases (CROTEAU; KOLATTUKUDY, 1974). Observou-se que algumas cutinases eram capazes de hidrolisar apenas cadeias laterais menores de ácidos graxos (SHISHIYAMA; ARAKI; AKAI, 1970), enquanto outras enzimas conseguem hidrolisar a estrutura principal dos poliésteres (ARNLING BÅÅTH; BORCH; WESTH, 2020). Desde então, uma série de estudos da cutinase de *Fusarium solani f. pisi* foram publicados, propriedades enzimáticas foram avaliadas (PURDY; KOLATTUKUDY, 1975a), purificação e composição de aminoácidos foram descritas (PURDY; KOLATTUKUDY, 1975b), estudos de indução foram feitos em diferentes substratos (LIN; KOLATTUKUDY, 1978) e novas cutinases foram descobertas (DICKMAN; PATIL; KOLATTUKUDY, 1982; MAITI; KOLATTUKUDY; SHAYKH, 1979; SEBASTIAN; KOLATTUKUDY, 1988).

Os estudos iniciais foram focados em compreender a influência da cutinase na fitopatogenicidade dos fungos (MAITI; KOLATTUKUDY, 1979). Nesse sentido, estudos de mutagênese foram realizados em fungos patogênicos de plantas e algumas cepas mutantes deficientes em cutinase deixaram de ser patogênicas ou perderam a virulência (DANTZIG; ZUCKERMAN; ANDONOV-ROLAND, 1986; DICKMAN; PATIL, 1986; SWEIGARD; CHUMLEY; VALENT, 1992).

Os primeiros relatos de clonagem de genes de cutinases ocorreram na década de 1980. A cutinase de *Colletotrichum capsici* foi clonada e expressa em sistema procariótico, utilizando as cepas de *E. coli* Y1088 e Y1090 (ETTINGER; KOLATTUKUDY; THUKRAL, 1987). Posteriormente, a cutinase de *F. solani f. pisi* foi clonada e expressa em sistema eucariótico, o

hospedeiro utilizado foi outro fungo fitopatogênico, o ascomiceto *Mycosphaerella* spp. (DICKMAN; PODILA; KOLATTUKUDY, 1989). Após a clonagem e expressão, a estrutura cristalina da cutinase de *F. solani f. pisi* foi determinada (ABERGEL et al., 1990).

Uma das primeiras revisões sobre cutinases descreve aplicações no campo da biocatálise que incluem hidrólise, esterificação, transesterificação e resolução de misturas racêmicas (CARVALHO; AIRES-BARROS; CABRAL, 1999). Posteriormente, destacou-se o papel significativo das cutinases como biocatalisadores na indústria têxtil, além do potencial de biodegradação de polímeros e pesticidas (CHEN et al., 2013). Em uma revisão mais recente, são relatadas as características bioquímicas e estruturais das cutinases, técnicas para melhorar a estabilidade térmica e operacional e aplicações mais recentes dessa enzima (NIKOLAIVITS et al., 2018).

Estudos sobre o potencial de aplicação na área de polímeros, tanto na degradação quanto na síntese desses compostos, têm se destacado (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; NIKOLAIVITS et al., 2018). Em particular, tem sido estimulada a possibilidade de degradar polímeros sintéticos, compostos de difícil decomposição em ambientes naturais. Estudos desse tipo podem contribuir para minimizar o acúmulo de plásticos no meio ambiente (GIGLI et al., 2019).

Um fator importante para viabilizar aplicações de enzimas é a necessidade de alto rendimento enzimático. Portanto, estratégias de otimização de processos de produção são fundamentais, mas nem sempre são suficientes. É comum que a produção de enzimas por microrganismos selvagens apresente limitações, principalmente relacionadas a baixos rendimentos. A técnica de expressão heteróloga é uma alternativa amplamente aplicada para superar as preocupações com a produtividade (BORRELLI; TRONO, 2015; MENG et al., 2022). O uso dessa técnica facilita a obtenção e caracterização de uma única enzima. Além disso, estudos de caracterização funcional e estrutural também são fundamentais para auxiliar na compreensão da relação estrutura função das enzimas e dar indícios de potenciais aplicações.

Diante do exposto buscou-se, no presente trabalho, ampliar o conhecimento sobre a diversidade de cutinases. Para tanto, foi proposta a otimização da produção de cutinase utilizando *F. verticillioides* selvagem, um fungo pouco estudado para a produção de cutinase, e a produção das cutinases desse microrganismo em um sistema de expressão heteróloga seguido da purificação e caracterização das cutinases recombinantes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento da biodiversidade de cutinases através de estudos de otimização da produção de cutinases de *F. verticillioides* via FES, expressão heteróloga e caracterização funcional e estrutural dessas enzimas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a produção de cutinase de *F. verticillioides* via FES em pequena escala.
- Avaliar o escalonamento da produção de cutinases via FES em biorreator com agitação e biorreator de leito fixo.
- Selecionar genes de cutinase no genoma de *F. verticillioides* e expressar as proteínas individualmente em sistema heterólogo procaríoto.
- Purificar as cutinases e caracterizar as enzimas funcionalmente e estruturalmente.
- Testar o potencial de hidrólise de PET das enzimas recombinantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

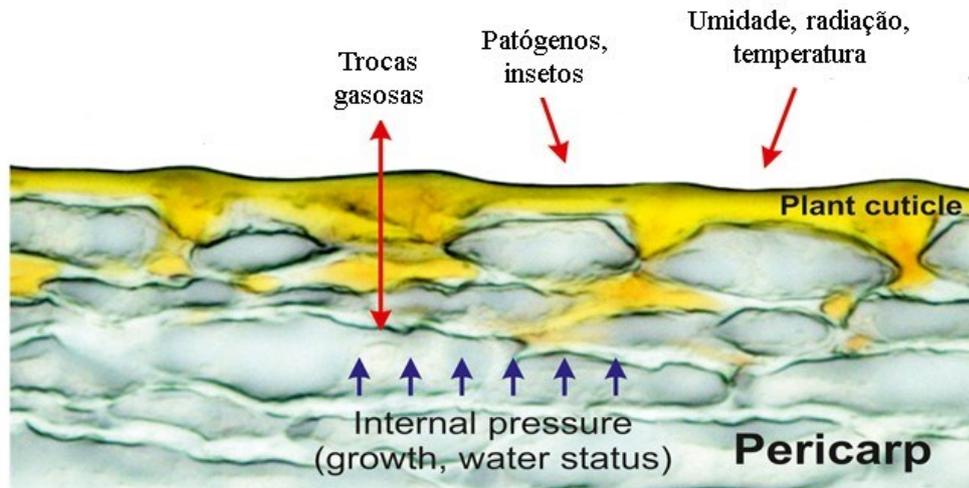
Este capítulo apresentará uma revisão de literatura sobre os assuntos pertinentes ao desenvolvimento desse trabalho. Primeiramente, será apresentada uma visão geral sobre cutinases. Em seguida serão discutidas as fontes microbianas dessas enzimas, as formas de produção e as principais limitações. Posteriormente, os sistemas de expressão heteróloga de cutinases serão abordados como uma estratégia para contornar as limitações de produção de enzimas a partir de organismos nativos e, por fim, as aplicações de cutinases serão revisadas. Os tópicos referentes a cutinases recombinantes (2.3) e aplicações (2.4) são parte de um artigo de revisão intitulado “Production of recombinant cutinases and their potential applications in polymer hydrolysis: the current status”, submetido à revista *Process Biochemistry* em maio de 2023.

2.1 CUTINASES

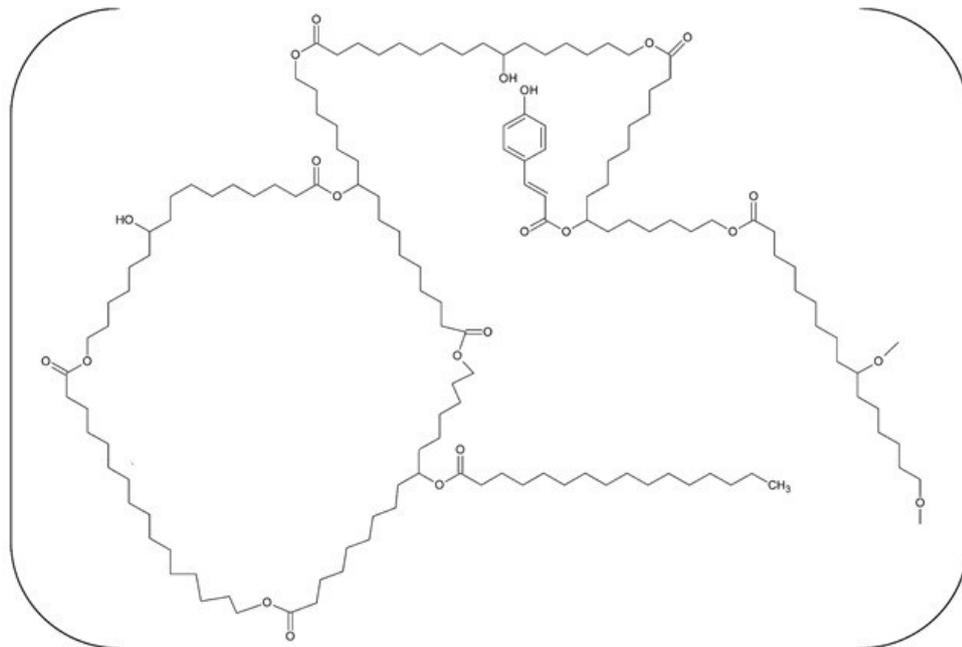
As cutinases são enzimas extracelulares (EC 3.1.1.74) capazes de hidrolisar ligações éster e são conhecidas pela capacidade de degradar cutina (HALONEN et al., 2009; NIKOLAIVITS et al., 2018; NYYSSÖLÄ, 2015). A cutina é um polímero com estrutura tridimensional complexa, formada por estruturas esterificadas heterogêneas. Os principais componentes dessas estruturas são ácidos graxos hidróxi e epóxi com cadeias de carbono C 16 e C 18 (Figura 1B). A cutina é o principal constituinte estrutural da cutícula de plantas, considerada uma barreira densa e resistente que cobre as partes aéreas das plantas e tem funções como proteger contra infecções microbianas e poluentes ambientais (Figura 1A) (HALONEN et al., 2009; HEREDIA, 2003; KOLATTUKUDY, 2001; RYAN et al., 1995). As cutinases também são capazes de degradar a suberina, um biopoliéster complexo, componente da casca de plantas, que também exerce papel fundamental como barreira protetora (FERREIRA et al., 2013; KAWAI; KAWABATA; ODA, 2020).

Figura 1: Localização da cutícula de plantas e estrutura molecular da cutina. A) Imagem de microscopia da seção transversal do pericarpo de frutos de tomate. A cutícula da planta é a membrana mais externa (amarela) que cobre a epiderme. B) Possível estrutura molecular da cutina.

A



B



Fonte: Fonte: Adaptada de (HEREDIA-GUERRERO et al., 2018) e (NIKOLAIVITS et al., 2018).

As cutinases bem caracterizadas bioquimicamente são classificadas como serina esterases pertencentes à família das α/β hidrolases. Além disso, possuem a clássica tríade catalítica Ser-His-Asp e um orifício oxianion para estabilização do estado de transição do

substrato. (CARVALHO; AIRES-BARROS; CABRAL, 1998; HALONEN et al., 2009; NOVY et al., 2021). Essa enzima também é classificada como uma carboidrato-esterase da família 5 (CE5) (NOVY et al., 2021). O pH ótimo relatado para as cutinases está caracteristicamente na faixa neutra a alcalina (7,0 a 9,5). Eventualmente, condições ligeiramente ácidas (pH 6) ou ácidas (pH 4-5) são preferíveis (NIKOLAIVITS et al., 2018). A faixa de temperatura ótima varia em função do organismo fonte. As cutinases bacterianas derivadas de microrganismos termofílicos atuam otimamente de 50 a 60 °C. Tipicamente, as cutinases fúngicas têm temperaturas ótimas de 40 a 45 °C. Em alguns casos a faixa ótima de temperatura varia de 20 a 30 °C e em outros casos varia de 50 a 60 °C (NIKOLAIVITS et al., 2018; YANG et al., 2018).

De modo geral, as cutinases são consideradas intermediárias de esterases e lipases. Diferente das lipases, a tríade catalítica das cutinases é localizada em uma fenda de ligação rasa, exposta ao solvente. Isso permite que cutinases atuem em moléculas hidrofóbicas e de alto peso molecular sem a necessidade de ativação de superfície (NOVY et al., 2021). Essas enzimas apresentam capacidade de hidrolisar uma ampla gama de substratos, essa característica pode estar relacionada a heterogeneidade das estruturas esterificadas encontradas na cutina, substrato natural da enzima (HALONEN et al., 2009). Avaliações da especificidade do substrato realizadas com ésteres p-nitrofenil (p-NP) são comuns. A maioria das cutinases prefere ésteres com comprimentos de cadeia de dois a quatro átomos de carbono, como p-nitrofenil acetato (p-NPA) e p-NPB. Outras preferem ésteres com cadeias um pouco mais longas (NIKOLAIVITS et al., 2018).

Diversos microrganismos são capazes de produzir cutinases. Os fungos fitopatogênicos são frequentemente relacionados a produção dessas enzimas, uma vez que elas são necessárias para que esses microrganismos penetrem na cutícula das plantas e provoquem a infecção patogênica (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; NYSSÖLÄ, 2015). Além dos fungos, algumas fontes bacterianas são frequentemente relatadas na literatura como produtoras de cutinases (LI et al., 2022a; LU et al., 2022; TOURNIER et al., 2020; WEI et al., 2019). O tópico a seguir explorará a produção de cutinases, bem como as principais fontes microbianas.

2.2 PRODUÇÃO DE CUTINASES

Neste tópico serão abordadas as diferentes fontes microbianas de cutinases, especialmente os fungos patogênicos de plantas e suas estratégias para infecção.

Posteriormente, serão discutidas as características fundamentais da FES e aspectos importantes para o aumento de escala da FES.

2.2.1 Microrganismos produtores de cutinase

Na literatura existem relatos da produção de cutinase de fontes microbianas (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; LIN; KOLATTUKUDY, 1980b; NIKOLAIVITS et al., 2018) e de origem vegetal (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; MAITI; KOLATTUKUDY; SHAYKH, 1979). As fontes vegetais apresentam alguns problemas principalmente relacionados ao cultivo, à manutenção e ao isolamento da enzima em larga escala, que são mais complexos em relação a produção microbiana (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009).

Os microrganismos produtores de cutinases incluem fungos e bactérias. As bactérias *Thermobifida fusca*, *Ideonella sakaiensis* e um conjunto misto de genes de actinomicetos são alguns exemplos de fontes procarióticas relatadas na literatura (LI et al., 2022a; LU et al., 2022; TOURNIER et al., 2020; WEI et al., 2019). Além disso, essa enzima é tipicamente produzida por fungos fitopatogênicos para facilitar as diversas fases de infecção das plantas hospedeiras. (CHEN et al., 2008, 2013; DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; NIKOLAIVITS et al., 2018) . Fungos do gênero *Fusarium* sp. são exemplos de causadores de infecção em plantas (BOGDAN, 1953) que já foram sugeridos como produtores de cutinase, conforme Tabela 1. *F. solani pisi* foi um dos primeiros microrganismos relatado como produtor de cutinase. Posteriormente diversos estudos foram realizados com cutinases nativas desse fungo. Outra espécie bastante explorada para obtenção dessas enzimas é o *Fusarium oxysporum*. Por outro lado, algumas espécies como *F. verticillioides*, *Fusarium acuminatum* e *Fusarium equiseti*, por exemplo, são pouco investigadas na literatura.

Tabela 1: Microrganismos *Fusarium* sp. produtores de cutinase.

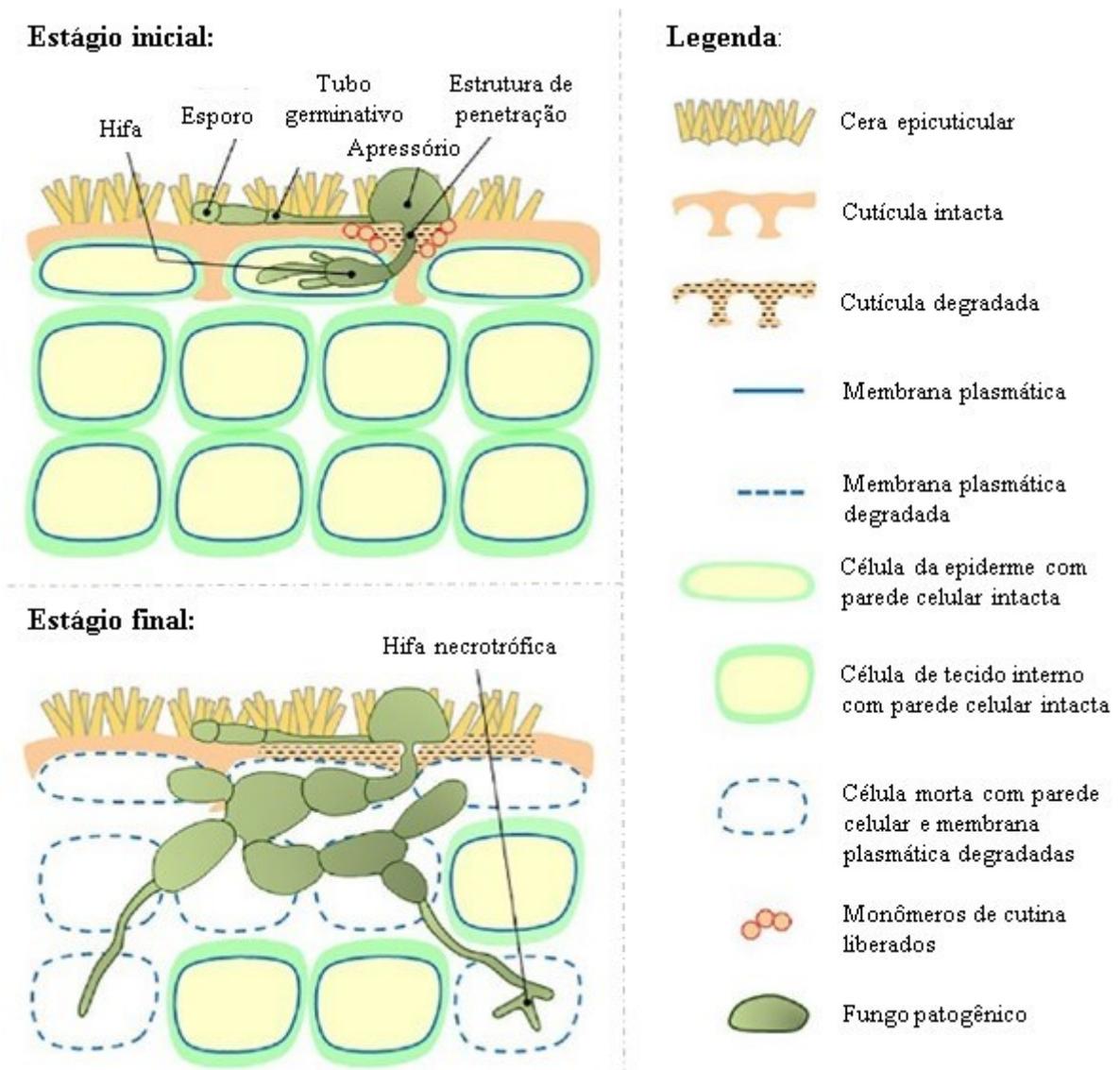
Microrganismo	Referência
<i>F. solani pisi</i>	(BADENES; LEMOS; CABRAL, 2011b) (EGMOND; DE VLIEG, 2000) (GRISWOLD et al., 2003) (KWON et al., 2009) (PURDY; KOLATTUKUDY, 1975a)

<i>F. oxysporum</i>	(CHAUDHARI; SINGHAL, 2015) (DIMAROGONA et al., 2015a) (FRAGA; CARVALHO; MACEDO, 2012) (HALONEN et al., 2009) (PIO; MACEDO, 2007, 2008) (SPERANZA; CARVALHO; MACEDO, 2011)
<i>F. verticillioides</i>	(DE OLIVEIRA et al., 2019a) (GU et al., 2021)
<i>F. acuminatum</i>	(DE OLIVEIRA et al., 2019a)
<i>F. equiseti</i>	(DE OLIVEIRA et al., 2019a)
<i>Fusarium roseum culmorum</i>	(LIN; KOLATTUKUDY, 1980a) (SOLIDAY; KOLATTUKUDY, 1976)
<i>Fusarium venenatum</i>	(SORENSEN; PETERSEN; WIEBE, 2007)
<i>Fusarium roseum sambucinum</i>	(LIN; KOLATTUKUDY, 1980a)
<i>Fusarium falciforme</i>	(SOOKSAI et al., 2019)

Os fungos patogênicos de plantas podem utilizar diferentes estratégias para superar a barreira formada pela cutícula. A entrada do fungo pode ocorrer pelos estômatos ou fendas naturais, através da perfuração da superfície por força mecânica ou a partir da secreção de uma mistura de enzimas especializadas em degradar a parede celular. A cutinase é uma dessas enzimas, com capacidade única de liberar monômeros de cutina (ARYA et al., 2021; KUBICEK; STARR; GLASS, 2014). Esses patógenos podem abrigar vários genes que codificam cutinases diferentes, essa condição facilita a degradação de uma ampla gama de polímeros vegetais e facilita a atuação da enzima em diferentes etapas da infecção (CHEN et al., 2013; GUI et al., 2018). O processo de infecção passa por estágios iniciais de adesão dos esporos na superfície da planta, germinação dos esporos, formação de órgãos de infecção especializados, quebra da cutícula e colonização da planta hospedeira. A cutinase é capaz de impactar cada uma dessas fases (ARYA et al., 2021; KOLATTUKUDY, 1985). A Figura 2 apresenta um esquema de interação de um fungo patogênico com a planta hospedeira.

Após as investigações iniciais que visavam a compreensão do processo de infecção desses patógenos surgiram os primeiros estudos focados em possíveis aplicações biotecnológicas para as cutinases. Consequentemente, uma nova linha de pesquisa focada em aplicações de cutinases demandava um maior entendimento sobre o processo de produção dessa enzima. Portanto, no tópico a seguir será abordada a produção de cutinase via processos fermentativos.

Figura 2: Interação de um fungo hemibiotrófico com a planta hospedeira. No estágio inicial de infecção os esporos entram em contato com a superfície da cutícula e secretam cutinases que liberam monômeros de cutina de forma localizada. Os primeiros monômeros liberados emitem sinais para a secreção de mais cutinases para a continuação e progressão da infecção. Em seguida ocorre o desenvolvimento de uma estrutura de infecção especializada chamada apressório, que coloniza a célula infectada sem causar morte celular (estágio inicial). Posteriormente, em um estágio avançado de infecção, ocorre a degradação parede celular e da membrana plasmática, seguida da morte celular (estágio final).



Fonte: Adaptada de (ARYA et al., 2021).

2.2.2 Processo de fermentação

Tipicamente, as cutinases microbianas são obtidas via fermentação submersa (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; FETT et al., 1992, 2000). Esse tipo de cultura é fundamentada no cultivo de microrganismos em meio líquido enriquecido com nutrientes (MARTINS et al., 2011).

Na literatura também é relatada a produção de cutinase via FES (DE OLIVEIRA et al., 2019a; MACEDO; FRAGA, 2007). Esse método é baseado no crescimento microbiano e formação simultânea de produtos em partículas sólidas (MARTINS et al., 2011). Para tanto, deve ser adicionada quantidade suficiente de água ao meio sólido, possibilitando o crescimento e metabolismo do microrganismo (PANDEY, 2003; TOSUNER; TAYLAN; ÖZMIHÇI, 2019). Esse processo é uma alternativa adequada para produções onde resíduos agroindustriais são usados como substratos (RAHARDJO; TRAMPER; RINZEMA, 2006; TOSUNER; TAYLAN; ÖZMIHÇI, 2019).

Devido ao baixo teor de umidade em FES, condição semelhante ao meio natural de fungos, esses microrganismos crescem facilmente no meio. Por outro lado, bactérias costumam encontrar dificuldades de crescimento em meio sólido (DE CASTRO; SATO, 2015; MANSOUR et al., 2016; MARTINS et al., 2011). Diante do exposto, é importante considerar as particularidades do microrganismo para seleção de um processo fermentativo adequado (DE CASTRO; SATO, 2015). Além disso, muitos fatores e condições de processo influenciam a FES. A seleção do substrato, as condições iniciais de umidade do substrato e temperatura na qual ocorrerá a fermentação são alguns exemplos de variáveis decisivas no desenvolvimento e otimização da FES (DE CASTRO; SATO, 2015). O substrato ou matriz sólida, nesse caso, pode apresentar duas funções distintas: suporte físico e fonte de nutrientes para o microrganismo (DE CASTRO; SATO, 2015; SCHMIDELL et al., 2001).

A matriz sólida deve apresentar características que promovam um maior rendimento do processo. É necessário que o substrato apresente alto grau de acessibilidade em todo o meio, o que ressalta a importância da porosidade, tamanho e formato das partículas. Cada caso deve ser avaliado separadamente, pois tamanhos de partículas menores, apesar de oferecer uma área superficial maior, podem comprometer a circulação de ar no meio bem como a dissipação de gases e calor produzidos durante a fermentação (SCHMIDELL et al., 2001). A porosidade do meio deve ser considerada para definição da granulometria e da altura do substrato no reator (BELLON-MAUREL; ORLIAC; CHRISTEN, 2003; THOMAS; LARROCHE; PANDEY,

2013), pois trata-se de uma variável crítica no processo de FES que interfere na ocorrência dos fenômenos de transferência de calor e massa no processo (TOSUNER; TAYLAN; ÖZMIHÇI, 2019).

Além da porosidade, o substrato também deve dispor de uma capacidade mínima de absorção de água. É essa característica que irá assegurar que o microrganismo cresça e realize suas atividades biológicas nas horas iniciais de fermentação. Em alguns casos pode ocorrer que a matriz sólida selecionada não é naturalmente adequada para o desenvolvimento de microrganismos, nesse caso pode ser feita a adição de nutrientes ao meio (DE CASTRO; SATO, 2015). Essa suplementação deve ser avaliada individualmente, pois alguns suplementos podem favorecer o crescimento do microrganismo e ao mesmo tempo inibir a produção de alguns tipos de enzimas. Isso ocorre no caso da produção de cutinase com adição de glicose, a glicose é um repressor para a produção dessa enzima (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009).

Resíduos e subprodutos agroindustriais podem ser excelentes substratos para a FES. Muitos desses resíduos e subprodutos são ricos em nutrientes necessários para o crescimento microbiano. Além disso, podem representar uma fonte de substrato sólido de baixo custo (DE CASTRO; SATO, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2019a). Diversos resíduos e subprodutos agroindustriais já foram avaliados quanto a aplicação em processos fermentativos para produção de enzimas. Os estudos apresentados na Tabela 2 demonstraram a capacidade de produção de cutinase a partir de diferentes meios e indicam o potencial de subprodutos agroindustriais como fonte de carbono em fermentações em estado sólido.

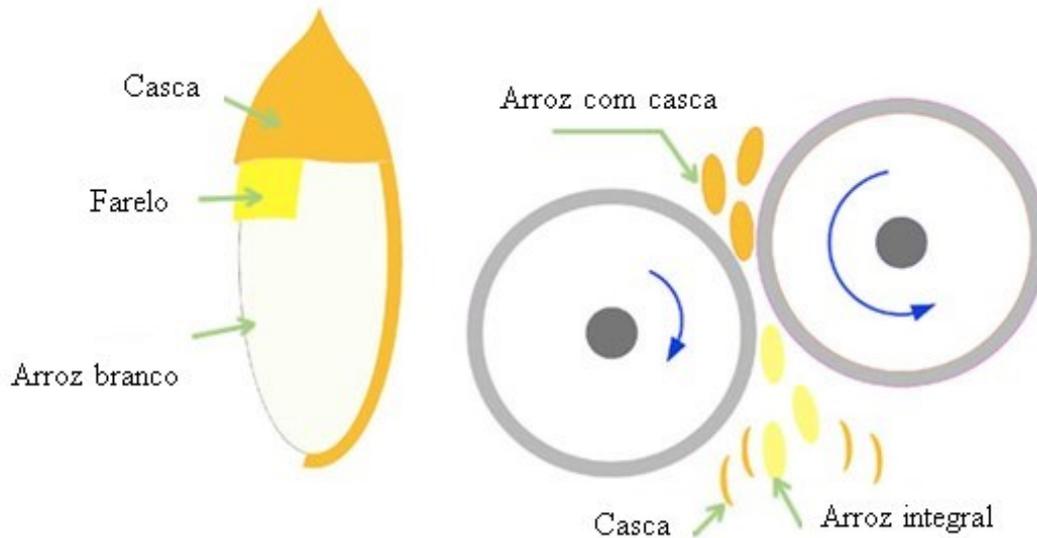
Os resíduos da produção de arroz estão entre os mais produzidos no mundo (DAGNINO et al., 2013). Dentre os substratos apresentados na Tabela 2, o farelo de arroz é apontado como um excelente substrato para produção de enzimas via FES, sua aplicação pode ocorrer sem a necessidade de suplementação adicional (CHUTMANOP et al., 2008). A casca de arroz também é um resíduo agroindustrial adequado para diferentes bioprocessos (DAGNINO et al., 2013) e já foi aplicado em processos de FES para obtenção de diferentes produtos (DAGNINO et al., 2013; POSTEMSKY et al., 2017; POTUMARTHI et al., 2013; TOSUNER; TAYLAN; ÖZMIHÇI, 2019). Farelo e casca de arroz possuem cutina em sua composição. A casca de arroz funciona como um revestimento do grão e possui uma espessa camada de cutícula na parte externa. Já o farelo de arroz é um subproduto do polimento do grão de arroz. A etapa de polimento inclui a retirada de várias camadas que envolvem o grão de arroz branco, incluindo uma espessa camada de cutícula chamada tegumento (GALERA, 2006; JULIANO; TUAÑO,

2019; NASCIMENTO et al., 2015; PEDROSO, 2019). A estrutura geral do grão de arroz e alguns componentes da casca e farelo de arroz estão representados na Figura 3.

Tabela 2: Subprodutos agroindústrias utilizados na produção de cutinase microbiana.

Subproduto agroindustrial	Referência
Azeite de oliva	(PIO; MACEDO, 2008)
Óleo de soja	(PIO; MACEDO, 2008)
Óleo de girassol	(PIO; MACEDO, 2008)
Óleo de palma	(PIO; MACEDO, 2008)
Farelo de trigo	(FRAGA; CARVALHO; MACEDO, 2012)
Farelo de arroz	(DE OLIVEIRA et al., 2019a; FRAGA; CARVALHO; MACEDO, 2012)
Casca de soja	(FRAGA; CARVALHO; MACEDO, 2012)
Resíduo de malte	(DE OLIVEIRA et al., 2019a)
Arroz	(DE OLIVEIRA et al., 2019a)
Casca de melancia	(CHAUDHARI; SINGHAL, 2015)
Casca de tomate	(CHAUDHARI; SINGHAL, 2015; FETT et al., 1992, 1999)
Bagaço de maçã	(FETT et al., 1992, 1999)

Figura 3: Estrutura do grão de arroz e componentes da casca e farelo do arroz.



Casca	{	<ul style="list-style-type: none"> Celulose e hemicelulose Lignina Cutina Óleos Proteínas... 		Farelo	{	<ul style="list-style-type: none"> Cutina Óleos Proteínas...
-------	---	---	--	--------	---	---

Fonte: Fonte: Figura adaptada (GALERA, 2006; JULIANO; TUAÑO, 2019; NASCIMENTO et al., 2015; PEDROSO, 2019).

Além da seleção de um substrato sólido adequado, o controle do teor de umidade do meio também é um parâmetro que interfere na eficiência da FES (BELLON-MAUREL; ORLIAC; CHRISTEN, 2003; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). O grau de umidade de um substrato, tanto no início quanto ao longo da fermentação, pode variar de acordo com o microrganismo selecionado e com o produto desejado (DEMIR; TARI, 2016; ZHANG et al., 2013). Teores de umidade abaixo de 12% não são suficientes para o crescimento microbiano (CAHN, 1935; SCHMIDELL et al., 2001). Usualmente, para FES esse parâmetro varia entre 18 e 85%, de acordo com o poder de absorção da matriz sólida. O indicado para facilitar a dispersão e a transferência de massa de nutrientes e oxigênio é a presença de um filme superficial de água no meio e simultaneamente essa condição deve permitir a difusão de gases e dissipação do calor pelos interstícios (DEMIR; TARI, 2016; STREDANSKY; CONTI, 1999). Altos teores de umidade podem diminuir a porosidade do meio e favorecer a contaminação principalmente por bactérias e o contrário (baixa umidade) poderá prejudicar o crescimento do microrganismo bem como reduzir o rendimento do produto (YAZID et al., 2017).

A temperatura é outro parâmetro importante que deve ser controlado. Segundo Schmidell

et al. (2001) o crescimento microbiano, a germinação dos esporos, a esporulação e a formação de produto estão diretamente ligadas a esse fator. O controle da temperatura pode ser feito pela introdução de ar através do meio de cultura, controlando a temperatura do ambiente ou do biorreator, além disso também é possível projetar um sistema de camisas com circulação de água refrigerante em torno do equipamento. A altura da camada de substrato dentro do fermentador também é determinante no controle da temperatura (DEMIR; TARI, 2016; STREDANSKY; CONTI, 1999).

Após a etapa de produção da cutinase via FES o produto obtido pode ser extraído por suspensão do meio com água, solução tampão ou solventes e em alguns casos (como para a produção de bioinseticidas) o meio fermentado pode ser simplesmente seco e armazenado para uso posterior (SCHMIDELL et al., 2001). Considerando a necessidade de extração do produto a etapa seguinte é a aplicação de técnicas de concentração e/ou purificação (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009), fundamental para posterior exploração do potencial comercial de biomoléculas (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). O grau de purificação desses produtos está relacionado com a aplicação pretendida. As metodologias geralmente utilizadas envolvem a concentração do sobrenadante da cultura que contém a enzima (GANGADHARAPP et al., 2017) através de precipitação, ultrafiltração, cromatografia entre outras metodologias (CHEN et al., 2007; ESCOBAR; BARNETT, 1995; SEBASTIAN; KOLATTUKUDY, 1988).

No entanto, a produção em pequena escala não é capaz de atender demandas industriais. Diante disso, surge a necessidade de buscar estratégias para o aumento da produção e, conseqüentemente, o aumento de escala da FES. Diversos tipos de reatores podem ser utilizados de acordo com a estratégia estabelecida.

2.2.3 Escalonamento

A ampliação de escala para FES geralmente está relacionada a desafios de transferência de calor e de homogeneidade do meio, que são as principais limitações desse tipo de cultivo (DI LUCCIO et al., 2004). No entanto, existe uma série de vantagens na obtenção de produtos por essa via. Para Martins et al. (2011) tais produtos apresentam melhores características e maior rendimento e produtividade em relação aos produtos obtidos em cultivos submersos. Como o produto final é mais concentrado em alguns casos é possível utilizar um processo direto de secagem e embalagem do produto final obtido, sem necessidade de extração. Essa estratégia pode ser aplicada para a produção de bioinseticidas ou ração animal, por exemplo. Além disso,

quando houver a necessidade de extração para recuperação do material é possível utilizar menores quantidades de solventes. Os baixos teores de umidade utilizados, juntamente com a alta concentração de inóculo incorporado ao meio, reduzem o problema de contaminação por outros microrganismos indesejáveis diminuindo os custos de esterilização. Além disso, raramente é necessária a agitação contínua do substrato e a aeração, natural ou forçada, é facilmente conduzida devido aos interstícios existentes entre as partículas do substrato (CHEN; LIU; DAI, 2014; PANDEY, 2003).

No entanto, apesar da FES de apresentar algumas vantagens para o escalonamento de processo, alguns parâmetros da pequena escala não são compatíveis com uma escala industrial. Os parâmetros que usualmente exigem reavaliações são referentes aos efeitos da compactação do substrato, da taxa de aeração e da dissipação de calor (SCHMIDELL et al., 2001). Nesse sentido, a escolha do tipo de biorreator é fundamental. Para o aumento de escala dos processos fermentativos em estado sólido existem alguns tipos de biorreatores usuais (SINGHANIA et al., 2009; SOCCOL et al., 2017):

- Reatores estáticos ou reatores com bandejas;
- Reatores com agitação ou tambor rotativo;
- Reatores com leito fixo e;
- Reatores com leito fluidizado gás-sólido.

Os reatores de bandeja são muito utilizados, no entanto, as condições de transferência de oxigênio e o controle das condições do ambiente são bastante limitadas. Nesse quesito, os reatores agitados parecem mais atrativos, pois permitem a agitação do meio de cultivo e conseqüentemente a melhoria na transferência de oxigênio e de controle das condições ambientais (DESGRANGES et al., 1991; SRINIVAS; CHAND; LONSANE, 1994). Esse tipo de biorreator permite o uso de agitação contínua ou intermitente do meio sólido e podem ser equipados com camisa de água para controle de temperatura. No entanto, o uso de agitação pode afetar o crescimento do microrganismo (SOCCOL et al., 2017).

Também podem ser utilizados os reatores de leito fixo e de leito fluidizado. Nos dois casos ocorre a passagem de ar ou gás inerte através do meio de cultivo, porém no leito fluidizado a velocidade de passagem do fluído é mais elevada e resulta na suspensão do sólido na corrente gasosa. Esse sistema contribui no controle da temperatura e na transferência de oxigênio e nutrientes (PANDEY, 1991; SOCCOL et al., 2017).

Alguns autores já utilizaram reatores de leito fixo para obtenção de produtos via FES (ASTOLFI et al., 2011; ÁVILA et al., 2019; MOLDES et al., 2003) e atingiram resultados promissores. Um grupo de pesquisadores realizou um estudo referente a utilização de reator de leito fixo com diferentes formas de aeração (ASTOLFI et al., 2011). Segundo os autores, convencionalmente, utiliza-se um sistema de resfriamento evaporativo (realizado pelo ajuste da taxa de aeração) para manutenção da temperatura adequada do processo. Quando a temperatura estiver muito baixa, a diminuição da taxa de aeração permite que a temperatura aumente. Por outro lado, se a temperatura do substrato estiver elevada, o aumento da taxa de aeração promove o resfriamento do substrato. No entanto, o resfriamento do meio pela elevação da taxa de aeração não favorece o crescimento do microrganismo. Diante desse impasse, Astolfi et al. (2011) propuseram a utilização de ar parcialmente saturado para a aeração. Ainda segundo os mesmos autores existe a possibilidade de uso de biorreatores de mistura intermitente. Essa estratégia pode ser empregada em associação com a operação do biorreator no modo batelada alimentada, pois a adição de substrato sólido em intervalos de tempo determinados, seguido da mistura do leito resultaria na diminuição da temperatura. Mais tarde, outro estudo avaliou a aplicação de um biorreator de leito fixo multiuso (ÁVILA et al., 2019). Nesse caso a temperatura foi regulada através de uma camisa de água e foi injetado ar umidificado através do leito. O processo foi analisado em diferentes condições de temperatura e taxas de fluxo de ar e resultou em alto rendimento do processo.

No entanto, nem todos os organismos são facilmente cultivados através desses métodos tradicionais. Frequentemente ocorrem problemas de reprodutibilidade e rendimento da produção para microrganismos selvagens. Essas limitações levaram ao desenvolvimento de novas técnicas para obtenção de enzimas, como a expressão heteróloga. A produção de proteínas recombinantes minimizou os problemas de reprodutibilidade e rendimento e facilitou o uso de enzimas em escala industrial (BORRELLI; TRONO, 2015).

2.3 CUTINASES RECOMBINANTES

Os microrganismos são as principais fontes de enzimas recombinantes para fins industriais. O genoma relativamente simples de alguns organismos favorece a identificação de sequências gênicas que codificam as enzimas de interesse (BORRELLI; TRONO, 2015).

A expressão heteróloga impulsionou o uso de enzimas em escala industrial, aumentando a reprodutibilidade e os rendimentos da produção enzimática. Essa técnica permite a produção de enzimas nativas de microrganismos que não podem ser facilmente cultivadas. Além disso, também é possível produzir enzimas de engenharia por meio desse sistema (BORRELLI; TRONO, 2015). Diferentes organismos hospedeiros podem ser aplicados a sistemas de expressão. As duas categorias gerais de hospedeiros de expressão abrangem organismos procarióticos e eucarióticos. Os sistemas procarióticos incluem bactérias. Os sistemas eucarióticos incluem o uso de leveduras, fungos filamentosos, insetos e células de mamíferos. Os fungos filamentosos, leveduras e bactérias são considerados hospedeiros mais fáceis de manipular, mais acessíveis e, portanto, preferidos para aplicações industriais (BORRELLI; TRONO, 2015; SINGHA et al., 2017).

No entanto, cada sistema de expressão possui características particulares que podem oferecer vantagens e desvantagens (BAGHBAN et al., 2019). Portanto, nos tópicos a seguir serão apresentadas as principais características dos sistemas de expressão procariotos e eucariotos na produção de cutinases recombinantes.

2.3.1 Sistemas de expressão procariotos na produção de cutinases

Hospedeiros procarióticos são frequentemente usados para expressão de proteínas heterólogas. Isso ocorre devido à facilidade de manipulação desse tipo de microrganismo, que além de apresentarem curtos tempos de crescimento, atingem altas densidades celulares em meios de baixo custo e são microrganismos bem caracterizados geneticamente. A disponibilidade de uma ampla variedade de vetores para clonagem e de cepas hospedeiras mutantes também favorece o uso de sistemas de expressão procarióticos (BORRELLI; TRONO, 2015).

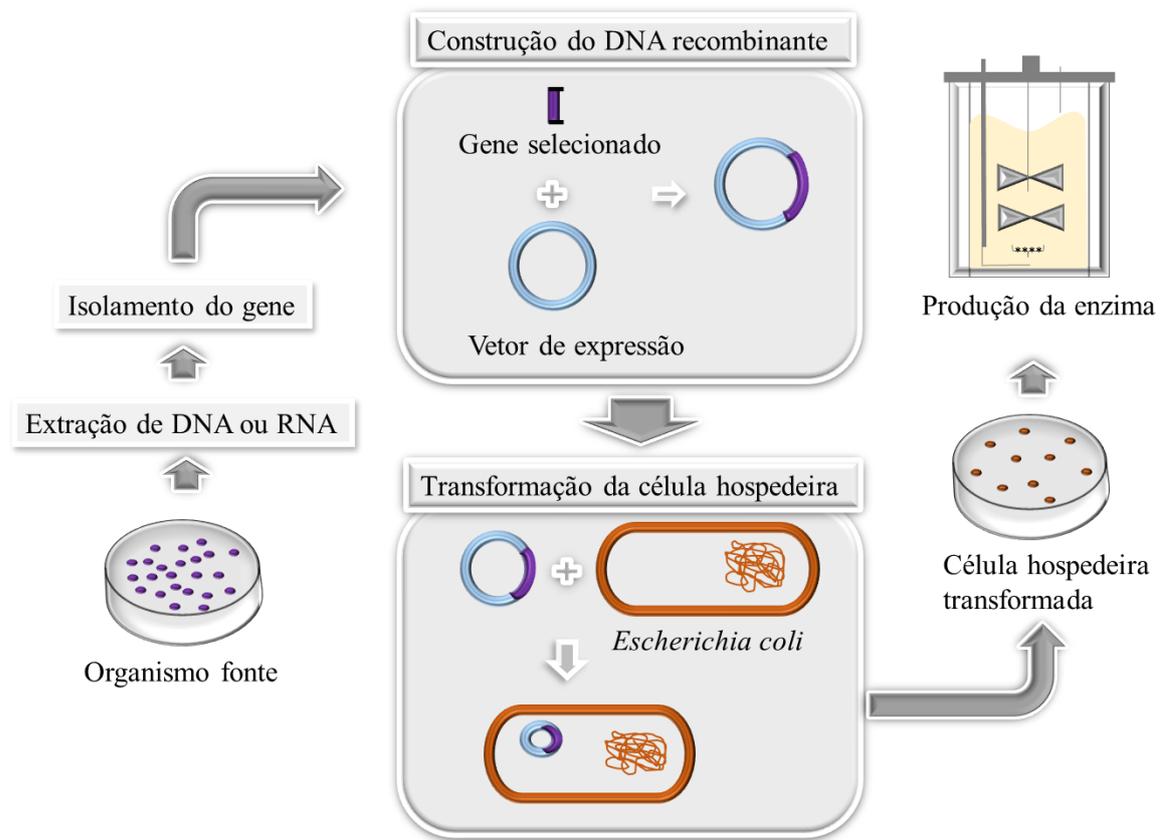
Os principais sistemas procariotos de expressão de proteínas incluem bactérias, tal como de *Bacillus* sp., *E. coli* e *Corynebacterium glutamicum*. As espécies de *Bacillus* sp. são bastante atraentes devido à alta capacidade de secretar proteínas no meio extracelular (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004). Além disso, em geral, são organismos robustos em relação às condições de crescimento e possuem baixa demanda nutricional (HEMMERICH et al., 2016; LIU et al., 2013a, 2013b). Além das espécies de *Bacillus* sp., uma alternativa atraente para expressão de proteínas extracelulares é a *C. glutamicum*. Essa bactéria tem demonstrado

capacidade de secretar proteínas, amplo conhecimento de bioprocessos e disponibilidade de métodos para manipulação genética (HEMMERICH et al., 2016). No entanto, as vias de secreção bacterianas ainda são um fator limitante para o desenvolvimento de sistemas de expressão extracelulares eficientes em organismos procarióticos (BYUN et al., 2022; HELLECKES et al., 2022; HEMMERICH et al., 2019).

De modo geral, a *E. coli* é notoriamente o sistema procarioto de expressão mais utilizado para aplicações industriais e laboratoriais, sendo o organismo mais bem caracterizado para este fim (BORRELLI; TRONO, 2015; PONTRELLI et al., 2018; ROSANO; CECCARELLI, 2014). O amplo conhecimento em bioquímica, fisiologia e genética de *E. coli* possibilitou a obtenção de novos fenótipos que superam os produtores nativos tradicionais (PONTRELLI et al., 2018). Atualmente, uma grande variedade de ferramentas moleculares é comercializada. Essas ferramentas permitem a construção de um sistema de expressão adequado para obtenção de altos rendimentos (BORRELLI; TRONO, 2015). A Figura 4 apresenta um esquema geral de produção de enzimas por expressão heteróloga usando *E. coli* como hospedeiro.

Várias cepas de *E. coli* estão disponíveis para uso como hospedeiros de expressão. No entanto para uma triagem de primeira expressão, apenas algumas cepas podem ser suficientes. As linhagens do tipo B são frequentemente utilizadas, especialmente BL21(DE3) assim como algumas cepas derivadas da linhagem K-12. A cepa BL21 (DE3) juntamente com suas derivadas, são as mais utilizadas para expressão de proteínas. As principais características genéticas dessas cepas são as exclusões dos genes que codificam as proteases lon e ompT (FATHI-ROUDSARI; AKHAVIAN-TEHRANI; MAGHSOUDI, 2016; ROSANO; CECCARELLI, 2014). A ausência das proteases lon dificulta a degradação proteolítica de enzimas estranhas dentro da célula. Por outro lado, a ausência de ompT dificulta a degradação de proteínas extracelulares, evitando a hidrólise da enzima recombinante após a etapa de lise celular. Porém, muitas outras situações podem impedir a obtenção de quantidades suficientes de proteína em sua forma funcional (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Figura 4: Esquema geral de produção de enzimas por expressão heteróloga usando *E. coli* como hospedeiro de expressão.



Fonte: O autor.

A formação de aglomerados de proteínas biologicamente inativas, chamados de corpos de inclusão, é um dos principais problemas reportados na expressão heteróloga (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Fatores como a formação incorreta de ligações dissulfeto, dobramento incorreto, baixa solubilidade da proteína e ausência de modificações pós-traducionais essenciais são algumas explicações possíveis para a formação de corpos de inclusão. Cada um desses fatores pode exigir soluções diferentes. Algumas possíveis soluções para dobramento incorreto de proteínas, por exemplo, são a co-expressão de chaperonas moleculares, suplementação do meio e redução da taxa de produção de enzima através da redução da temperatura de expressão da proteína. A cepa Arctic Express (DE3) derivada de *E. coli* BL21-Gold é um exemplo de hospedeiro que expressa chaperonas exógenas e é adaptado para produção em baixas temperaturas (BELVAL et al., 2015; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

No que se refere a problemas de formação incorreta de ligações dissulfeto as possíveis soluções são diferentes e em geral envolvem expressão da proteína no periplasma ou o uso de cepas com o ambiente citoplasmático oxidativo (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Cepas

derivadas de K-12, que também são utilizadas em alguns casos, são exemplos de hospedeiros com a região do citoplasma adaptada para formação de ligações dissulfeto (BABA et al., 2006; PONTRELLI et al., 2018). Linhagens de Origami, por exemplo, possuem menor poder redutor no citoplasma (PONTRELLI et al., 2018). Cepas SHuffle T7 também foram projetadas para expressar proteínas recombinantes com múltiplas pontes dissulfeto. Isso foi possível através da expressão de uma versão da proteína dissulfeto isomerase periplasmática DsbC no citoplasma e da exclusão de genes que codificam a glutaredoxina redutase e a tioredoxina redutase (FATHI-ROUDSARI; AKHAVIAN-TEHRANI; MAGHSOUDI, 2016; LOBSTEIN et al., 2012). As mesmas mutações de glutaredoxina redutase e tioredoxina redutase também caracterizam as cepas Rosetta-gami B (DE3). Além do ambiente citoplasmático com menor poder redutor a Rosetta-gami B (DE3) também pode superar um outro problema conhecido como viés de códons (FATHI-ROUDSARI; AKHAVIAN-TEHRANI; MAGHSOUDI, 2016; MENG et al., 2018; ROSANO; CECCARELLI, 2014; SCHWEICKERT; CHENG, 2020).

De modo geral, o campo de expressão de proteínas recombinantes está em constante desenvolvimento. Hospedeiros de expressão podem ser melhorados considerando as particularidades da proteína recombinante alvo, buscando evitar a degradação e aumentar a solubilidade da proteína no sistema de expressão, além de contornar problemas de toxicidade para a célula hospedeira (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Para a produção de cutinases recombinantes em *E. coli* já foram aplicadas diferentes estratégias que variam entre as soluções apresentadas anteriormente (Tabela 3). Alguns autores expressaram uma cutinase de *F. oxysporum* na região do periplasma de *E. coli* BL21 (DE3) utilizando um peptídeo sinal pelB e obtiveram maiores quantidades de enzima solúvel em comparação a expressão no citoplasma dessa mesma cepa (DIMAROGONA et al., 2015a; NIKOLAIIVITS et al., 2016). A expressão da mesma cutinase de *F. oxysporum* no citoplasma oxidativo de *E. coli* Origami 2 (DE3) também obteve sucesso e produziu uma enzima mais termoestável em comparação com a cutinase produzida no periplasma de BL21 (DE3) (NIKOLAIIVITS et al., 2016). Outros autores optaram por outras cepas de *E. coli* com ambiente citoplasmático oxidativo, como a Shuffle T7 e a Rosetta-gami B (DE3) (JABLOUNE et al., 2020; KAWAI et al., 2014).

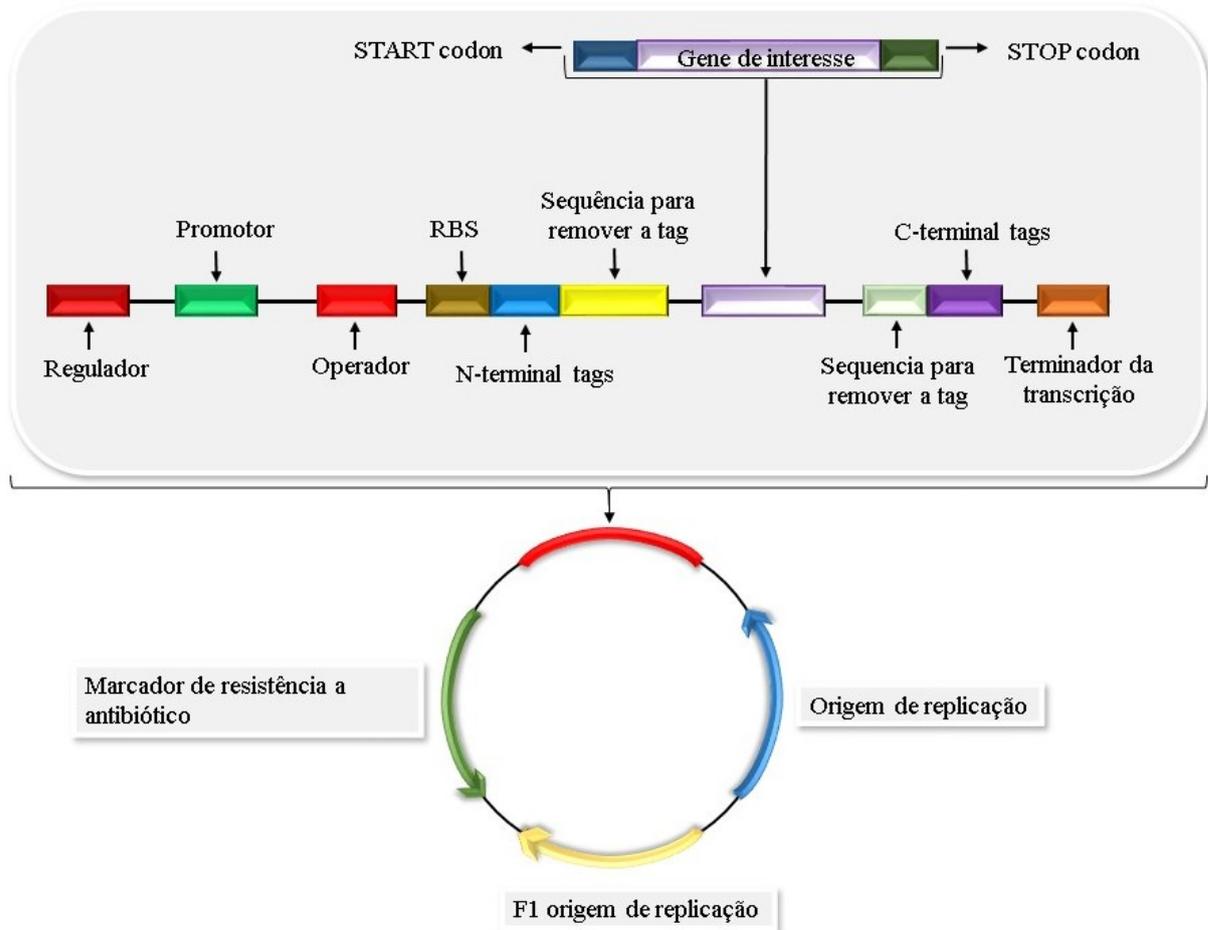
Além da cepa hospedeira, a escolha de um vetor de expressão apropriado para a produção de proteínas também é um fator importante. Muitos vetores estão disponíveis comercialmente. Vantagens e desvantagens de vários tipos de vetores para *E. coli* estão disponíveis na literatura (RIGGS, 2018). Em geral, um vetor de expressão plasmidial é

composto pelo promotor e pelas sequências regulatórias necessárias para seu controle. Além dos elementos reguladores, há um sítio de ligação ao ribossomo (RBS) que promove a tradução, um marcador de resistência a antibióticos e uma origem de replicação que garante a manutenção do plasmídeo em seu hospedeiro de expressão (RIGGS, 2018; SINGHA et al., 2017). A Figura 5 mostra um esquema geral da estrutura ideal para vetores de expressão.

Tabela 3: Sistemas procariotos utilizados para expressão de diferentes cutinases.

Organismo fonte	Hospedeiro de expressão	Vetor de expressão	Referência
<i>Streptomyces scabies</i>	<i>E. coli</i> Shuffle T7	pET30a(+)	(JABLOUNE et al., 2020)
<i>F. oxysporum</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET22b(+)	(DIMAROGONA et al., 2015a)
<i>F. oxysporum</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET22b(+)	(NIKOLAIVITS et al., 2016)
<i>F. oxysporum</i>	<i>E. coli</i> Origami 2 (DE3)	pET22b(+)	(NIKOLAIVITS et al., 2016)
<i>Humicola insolens</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET20b(+)	(SU et al., 2020)
<i>Moniliophthora roreri</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET22b(+)	(VÁZQUEZ-ALCÁNTARA et al., 2021)
<i>T. fusca</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET24a(+)	(SU; HONG; WU, 2015)
<i>Saccharomonospora viridis</i>	<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	pQE80L	(KAWAI et al., 2014)
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pMAL-c5x	(LU et al., 2018)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	<i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3)	pET26b (+)	(HAERNVALL et al., 2018)

Figura 5: Estrutura geral para um vetor de expressão ideal.



Fonte: Figura adaptada (SINGHA et al., 2017).

Dentre os inúmeros vetores disponíveis comercialmente, a série de plasmídeos de expressão pET é amplamente utilizada para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli*. O plasmídeo de expressão pET28a é o mais popular do mercado (SHILLING et al., 2020). Diversos sistemas de expressão de cutinase em *E. coli* alcançaram bons resultados utilizando vetores da série pET (DIMAROGONA et al., 2015a; NIKOLAIVITS et al., 2016; SU et al., 2015; SU; HONG; WU, 2015).

Mas apesar dos esforços para aumentar robustez dos sistemas baseados em *E. coli*, eles são ineficazes na realização de modificações pós-traducionais, como correto enovelamento de algumas proteínas, fosforilação e glicosilação (BORRELLI; TRONO, 2015; PONTRELLI et al., 2018). Dessa forma, algumas vezes pode ser necessário recorrer a expressão em sistemas eucariotos, por exemplo (SCHWEICKERT; CHENG, 2020; SINGHA et al., 2017).

2.3.2 Sistemas de expressão eucariotos na produção de cutinases

Hospedeiros eucarióticos, como leveduras e fungos filamentosos, são conhecidos por suas vantagens na expressão de proteínas complexas. Organismos eucarióticos são capazes de fazer modificações pós-traducionais, ao contrário dos procariotos (BORRELLI; TRONO, 2015). Algumas leveduras geralmente aplicadas como hospedeiros de expressão para obtenção de cutinases recombinantes incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Arxula adenivorans* (BAGHBAN et al., 2019; BURDETTE et al., 2018).

S. cerevisiae é um microrganismo modelo na pesquisa científica. Foi a primeira levedura utilizada para expressão heteróloga (BORRELLI; TRONO, 2015). É um versátil hospedeiro de expressão e a principal levedura utilizada na indústria alimentícia. Além disso, as ferramentas para edição do genoma deste organismo estão bem estabelecidas (AL-FAHAD et al., 2020; BAO et al., 2020; LI et al., 2021). No entanto, esse microrganismo também apresenta algumas limitações, como hiperglicosilação, baixo rendimento e instabilidade plasmidial (XIE; HAN; MIAO, 2018). Sistemas de expressão de cutinase em *S. cerevisiae* utilizaram a cepa INVSc1 (His-, Leu-, Trp-, Ura-) (AOYAGI; KATAKURA; IWASAKI, 2016; ZHANG et al., 2017). INVSc1 é uma cepa auxotrófica diploide que cresce em meio mínimo com suplementos de histidina, leucina, triptofano e uracila (TANG et al., 2013). As cutinases de *Thermobifida fusca* e *Aspergillus oryzae*, produzidas na cepa INVSc1, atingiram atividades de 12,00 e 0,13 U/mL, respectivamente (AOYAGI; KATAKURA; IWASAKI, 2016; ZHANG et al., 2017).

P. pastoris é considerada uma hospedeira robusta para aplicações biotecnológicas em laboratório e na indústria (BILL, 2014; ZHANG; LIU; LI, 2020). É uma levedura que pode utilizar o metanol como fonte exclusiva de carbono e energia e a mudança do meio glicose para metanol induz alto nível de expressão da proteína recombinante em *P. pastoris* (BORRELLI; TRONO, 2015). No entanto, o metabolismo do metanol pode ser ineficiente e dificultar a ampliação do processo (THERON et al., 2017; ZAVEC; GASSER; MATTANOVICH, 2020). Apesar disso, a utilização desse microrganismo como sistema de expressão é atrativa devido à disponibilidade de ferramentas de manipulação genética (RASCHMANOVÁ et al., 2018; ZHANG; LIU; LI, 2020). Além disso, cepas mutantes deficientes em protease dificultam a degradação da proteína recombinante produzida, aumentando o rendimento do produto (BAGHBAN et al., 2019; ZHANG; LIU; LI, 2020). Várias cepas selvagens e mutantes foram relatadas na literatura (BAGHBAN et al., 2019; DALY; HEARN, 2005; KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020). Entre elas, as cepas X-33, KM71H e GS115 já foram utilizadas

na produção de cutinases e atingiram atividades de 4370,00 U/mg_{proteína} (PING et al., 2017), 1059,96 U/mg_{proteína} (YANG et al., 2018) e 2322,40 U/mg_{proteína} (DUAN et al., 2019) respectivamente. A cepa X-33 é uma levedura do tipo selvagem, enquanto a KM71 e a GS115 são cepas deficientes em histidina desidrogenase. Este fato permite a seleção de transformantes com base em sua capacidade de crescer em meio sem histidina (BAGHBAN et al., 2019). No entanto, KM71 tem um fenótipo de utilização de metanol lento, enquanto GS115 tem um fenótipo de utilização de metanol semelhante a levedura de tipo selvagem (CHAROENRAT et al., 2013; DALY; HEARN, 2005).

A. adenivorans é uma levedura halotolerante com potencial para uso como hospedeiro de expressão heteróloga. Algumas características, como a variação da morfologia em função da temperatura e modificações pós-traducionais dependentes da morfologia, reforçam esse potencial. Essa levedura apresenta um metabolismo flexível, que permite o uso de uma ampla variedade de fontes de carbono e nitrogênio (BISCHOFF et al., 2017; MALAK; BARONIAN; KUNZE, 2016). Plataformas de transformação/expressão foram desenvolvidas para este organismo, possibilitando manipulações genéticas simples e rápidas. Algumas cepas mutantes são bem descritas na literatura (BISCHOFF et al., 2017), incluindo *A. adenivorans* G1212 [aleu2 atrp1::ALEU2] que se destaca na estabilidade mitótica durante o cultivo em meio rica e mínimo (MALAK; BARONIAN; KUNZE, 2016). Porém, a expressão de cutinase em *A. adenivorans* G1212 resultou em altos níveis de secreção de proteínas estranhas juntamente com a cutinase, característica indesejada para sistemas de expressão heteróloga (BISCHOFF et al., 2015).

Além das leveduras os fungos filamentosos também são ótimos sistemas de expressão, e são capazes de produzir proteínas industriais, como hospedeiros nativos e hospedeiros heterólogos. Além disso, apresentam grande capacidade de fazer modificações pós-traducionais corretamente (BERGQUIST et al., 2002; BORRELLI; TRONO, 2015; ZHANG et al., 2020a). Os fungos filamentosos também possuem uma poderosa via secretora e podem rapidamente eliminar proteínas mal dobradas (BORRELLI; TRONO, 2015). *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* são hospedeiros especialmente atrativos para a produção de proteínas recombinantes. Mas, apesar de plataformas fúngicas oferecerem vantagens claras em comparação com outros sistemas de expressão enzimática, elas ainda são plataformas em desenvolvimento. Estudos com foco no aumento da produtividade e secreção de proteínas têm sido realizados. A compreensão dos mecanismos de transcrição, tradução, processamento pós-traducional e vias de secreção desses organismos tem avançado. Apesar disso, a secreção de

proteínas estranhas nesses sistemas ainda não atingiu os níveis intrínsecos desses organismos (NEVALAINEN; PETERSON, 2014; NEVALAINEN; TE'O; BERGQUIST, 2005; SAKEKAR; GAIKWAD; PUNEKAR, 2021). Portanto, como o esperado, a produção de cutinase nesse tipo de plataforma é pouco explorada e o rendimento é baixo em relação ao rendimento de *P. pastoris* (5,3 mg_{cutinase}/mL) (DUAN et al., 2019). Por exemplo, a cutinase produzida em *Aspergillus niger* PY11 atingiu uma atividade de 36,70 U/mL (KAMARUDDIN et al., 2018) e a produção em *Aspergillus oryzae* atingiu 203 µg_{cutinase}/mL (ICHIKAWA et al., 2022).

2.4 APLICAÇÕES

A cutinase é uma enzima versátil com potencial de aplicação industrial extremamente diversificado (CHEN et al., 2013). Pode ser amplamente aplicada na indústria de alimentos, farmacêutica, de detergentes, têxtil, agricultura, meio ambiente, entre outras (CARVALHO; AIRES-BARROS; CABRAL, 1999) (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009). A hidrólise de cutina, substrato natural dessa enzima, produz ácidos graxos com uma combinação diversificada de grupos funcionais, incluindo grupos epóxi, álcool e carboxi. Os ácidos graxos derivados da cutícula vegetal têm potencial para utilização como precursores de polímeros interessantes para aplicações químicas e podem substituir compostos petroquímicos convencionais (FERREIRA et al., 2013; NOVY et al., 2021).

Na indústria de alimentos, cutinases foram avaliadas como catalisadores para a produção de frutas secas, vários produtos lácteos, compostos aromáticos e alguns importantes ácidos graxos, incluindo o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; NYSSÖLÄ, 2015). No processo de produção de frutas secas a cutinase pode atuar no aumento da permeabilidade da água, facilitando a secagem da fruta (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; NYSSÖLÄ, 2015; POULOSE; BOSTON, 1994). Essas enzimas também podem ser eficazes para obtenção de edulcorantes, conservantes e estabilizadores em frutas e vegetais (POULOSE; BOSTON, 1994). A produção de aromas naturais pela síntese de compostos aromáticos utilizando enzimas hidrolíticas no processo de catálise é uma possibilidade de aplicação para a indústria de alimentos bem como a farmacêutica (PIO et al., 2008). Além do mais, a cutinase também pode substituir a lipase

utilizada na indústria alimentar para produção de sabores caseiros em produtos de padaria, manteiga e molhos (NYSSÖLÄ, 2015).

Na indústria química, cutinases podem ser utilizadas para a produção de biodiesel, compostos fenólicos, surfactantes e síntese de materiais. Na produção de biodiesel pode ser aplicada na etapa de transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009). Usualmente lipases são utilizadas como catalisadores nessa reação, no entanto a cutinase mostra-se vantajosa por não precisar de ativação interfacial na hidrólise de triacilglicerol solúvel e emulsionado (MARTINEZ et al., 1992). Além disso, apresentam potencial para funcionalização da superfície dos polímeros e remoção de revestimentos (BADENES; LEMOS; CABRAL, 2010, 2011a; BARROS et al., 2009; CHEN et al., 2013). Um estudo recente sugere a aplicação de cutinase para obtenção de materiais porosos (SHI et al., 2020b). Este tipo de material apresenta grande potencial de aplicação na engenharia de tecidos. O objetivo dos autores era criar materiais porosos sintetizados por degradação enzimática seletiva. Uma cutinase de *Fusarium solani* foi utilizada juntamente com uma proteinase K na degradação seletiva de uma mistura de PBS e PLA (SHI et al., 2019, 2020b). Segundo os autores é possível controlar o tamanho dos poros formados ajustando a proporção de PBS na mistura e o tempo de reação enzimática. A síntese de outros materiais, como ésteres de amido com alto teor de ácidos graxos, também pode ser realizada usando cutinase. Esses ésteres podem ser usados como produtos químicos essenciais em vários setores industriais. Em um estudo recente, a síntese de éster de amido foi realizada usando uma variante de cutinase de *Cryptococcus* sp. (RAJAN; SUDHA; ABRAHAM, 2008; SISILA et al., 2021).

Na indústria de detergentes, as cutinases foram avaliadas como enzimas lipolíticas em formulações de detergentes para lavagem de roupa e louça (CHEN et al., 2013). Diante da boa estabilidade da enzima à temperaturas de 20-50 °C e em pH 8-11, bem como da estabilidade na presença de outras enzimas (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009), essa biomolécula é ideal para aplicação em formulações de detergentes (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; NYSSÖLÄ, 2015). Além disso, a inclusão de cutinase na formulação desses produtos não ocasiona limitação de uso (KOLATTUKUDY; POULOSE, 1996).

As cutinases também desempenham um papel significativo como biocatalisadores na indústria têxtil (CHEN et al., 2007). Os tecidos crus de algodão são cobertos com uma cutícula hidrofóbica, da qual a cutina é o principal componente (DEGANI; GEPSTEIN; DOSORETZ, 2002; NYSSÖLÄ, 2015). A molhabilidade das fibras é melhorada através da remoção dessa cutícula por lavagem, isso facilita o tingimento uniforme e o acabamento (DONG et al., 2020;

HONG et al., 2019; NYSSÖLÄ, 2015). A lavagem é tradicionalmente realizada via hidrólise alcalina a altas temperaturas, o que gera grandes volumes de águas residuais alcalinas e causa danos às fibras (AGRAWAL; NIERSTRASZ; WARMOESKERKEN, 2008; CHEN et al., 2013; LEE; SONG; KIM, 2009; NYSSÖLÄ, 2015). Nesse sentido, as cutinases têm sido sugeridas como uma alternativa à lavagem química. Além da cutina, os alvos para a hidrólise catalisada pela cutinase são as ceras amorfas incorporadas na matriz da cutina (NYSSÖLÄ, 2015). Recentemente, uma cutinase mutante de *T. fusca* foi construída para aplicação em lavagem de algodão (DONG et al., 2020). Os autores tentaram melhorar a remoção da cutícula modificando o local de ligação da enzima ao substrato. A eficiência de remoção da cutícula do algodão foi avaliada com a enzima mutante e a selvagem. O tratamento com a cutinase mutante reduziu significativamente o tempo de umedecimento da fibra de algodão. A cutinase de *T. fusca* selvagem também foi aplicada para o tratamento de algodão em combinação com cutinase de *H. insolens*. A ação sinérgica das duas enzimas foi mais eficiente na lavagem dos tecidos do que o uso de uma única enzima. Além de melhorar a molhabilidade e facilitar o tingimento do tecido, o tratamento enzimático também resultou em menos danos ao tecido do que o tratamento alcalino tradicional (HONG et al., 2019). Além disso, cutinases também podem ser aplicadas em outros setores da indústria têxtil, como na modificação de fibras sintéticas e tratamento de tecidos de lã (CHEN et al., 2013).

No setor agrícola as cutinases foram sugeridas como adjuvantes em produtos químicos utilizados nesse setor (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009). Os adjuvantes são capazes de aumentar o efeito farmacológico de químicos agrícolas, o que pode resultar em aplicação de uma quantidade reduzida desses produtos e mesmo assim chegar ao efeito desejado (KOLATTUKUDY; POULOSE, 1996). Nesse sentido, Kolattukudy e Poulouse (1996) desenvolveram uma patente que propõe a seleção de uma enzima capaz de degradar pelo menos uma porção do polímero de células vegetais de uma planta para a qual um produto químico agrícola terá um efeito farmacológico. Essa enzima pode ser aplicada à planta antes ou concomitantemente com a aplicação do produto químico agrícola na planta. Outro estudo (DE OLIVEIRA et al., 2019a) relata o uso da cutinase como adjuvante em uma formulação contendo cutinase e um bioherbicida. Normalmente, os bioherbicidas apresentam baixa eficiência, necessitando aplicação conjunta com outros compostos que potencializem sua atividade (DE ALMEIDA et al., 2020). Foram realizados testes em folhas de plantas daninhas, que apresentam uma fina camada de cutina que dificulta a entrada do ingrediente ativo. A enzima foi utilizada

para degradar a cutina, aumentando a taxa de absorção do produto aplicado e, consequentemente, aumentando a atividade bioherbicida (DE OLIVEIRA et al., 2019a).

Na área ambiental, a cutinase é útil na biodegradação de resíduos, incluindo resíduos de polímeros e pesticidas (BHARDWAJ; GUPTA; TIWARI, 2013; DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; KLEEBERG et al., 1998). Cutinases já foram aplicadas na remediação de solo contaminado por produtos químicos (NYYSSÖLÄ, 2015). A degradação enzimática de produtos químicos, como o parabeno, presentes nas águas residuais também foi relatada (ZHU; WEI, 2019). Os parabenos são compostos amplamente utilizados em cosméticos, fármacos e produtos alimentícios por apresentarem atividade antibacteriana e antifúngica (GUO; KANNAN, 2013; KARTHIKRAJ et al., 2018; LIAO; LIU; KANNAN, 2013; ZHU; WEI, 2019). As estações convencionais de tratamento de águas residuais não são projetadas para eliminar os parabenos. Portanto, o desenvolvimento de tecnologias inovadoras para a eliminação desse tipo de composto é fundamental (NAGHDI et al., 2018; ZHU; WEI, 2019). O sistema utilizado envolveu a expressão de uma cutinase de *F. solani pisi* na superfície da célula de *S. cerevisiae* EBY100. O sistema de display de superfície tem demonstrado potencial para o desenvolvimento de biocatalisadores funcionais, estáveis, reutilizáveis e regeneráveis para a degradação de contaminantes no tratamento de água (CHEN et al., 2016). O biocatalisador desenvolvido demonstrou efetivamente a remoção de parabenos mediada por cutinase. Em uma solução real de esgoto, a cutinase degradou propilparabeno, butilparabeno e benzilparabeno, como um único composto ou como uma mistura (ZHU; WEI, 2019).

Ainda considerando as preocupações ambientais emergentes, nos últimos anos investigações sobre a capacidade de degradação de plásticos por cutinases têm sido extensamente exploradas na literatura (KAWAI; KAWABATA; ODA, 2020; LIU; ZHANG; WU, 2022; TOURNIER et al., 2020; XI et al., 2021). No tópico a seguir esse potencial de aplicação será abordado com maior profundidade.

2.4.1 Degradação de plásticos

A dificuldade de decomposição de polímeros sintéticos em ambientes naturais incentivou o desenvolvimento de pesquisas em busca de soluções capazes de minimizar o acúmulo de plásticos sintéticos no meio ambiente. Nesse sentido, a degradação enzimática de

polímeros é uma alternativa promissora e tem recebido atenção especial nos últimos anos (GIGLI et al., 2019; HAERNVALL et al., 2018; KAWAI, 2021; SHI et al., 2020a).

Os processos enzimáticos são atraentes porque promovem a despolimerização dos plásticos e permitem a recuperação dos monômeros resultantes. Os monômeros recuperados podem ser reutilizados para sintetizar novos materiais, mantendo os resíduos plásticos em um ciclo fechado. Esta proposta está alinhada com os princípios da economia circular. Além disso, diferentemente do processo tradicional de reciclagem termomecânica, a reciclagem de plásticos pela rota enzimática minimiza a perda de propriedades mecânicas do produto. Portanto, através da via enzimática é possível produzir plásticos reciclados de melhor qualidade em relação ao processo termomecânico tradicional (TOURNIER et al., 2020).

A hidrólise enzimática de vários tipos de poliésteres tem sido investigada na literatura. No entanto, estudos recentes focam principalmente na degradação do PET para gerenciamento de resíduos de plásticos (CHEN et al., 2022; EUGENIO et al., 2022; LU et al., 2022; TOURNIER et al., 2020; ZENG et al., 2022). O PET é um polímero produzido em grande quantidade e quando utilizado em embalagens apresenta baixos índices de reciclagem. Diferentes enzimas já foram avaliadas quanto ao potencial de despolimerização do PET, em especial cutinases termofílicas (KAWAI, 2021; KAWAI; KAWABATA; ODA, 2019, 2020). Mas, apesar dos esforços, os processos enzimáticos ainda são menos eficientes do que a despolimerização com catalisadores químicos (CASTRO et al., 2019). Parâmetros de degradação, como temperatura de reação, tamanho de partícula, cristalinidade do polímero e subprodutos de inibição, podem interferir significativamente na atividade enzimática (NIKOLAIVITS et al., 2018). Nesse sentido, uma das principais limitações no uso de alguns biocatalisadores é a temperatura necessária para a hidrólise do polímero. Para facilitar o acesso enzimático nesse tipo de material, recomenda-se aumentar sua flexibilidade, o que ocorre com o aumento da temperatura acima da temperatura de transição vítrea do polímero (ODA et al., 2018). A temperatura de transição vítrea do PET em meio aquoso, por exemplo, é de 75 – 80 °C (KAWAI et al., 2014; TOURNIER et al., 2020). Isso explica os esforços direcionados para a melhoria da termoestabilidade de cutinases e a frequente preferência por cutinases termofílicas para esse fim (NIKOLAIVITS et al., 2018). No entanto, enzimas capazes de hidrolisar PET em temperaturas moderadas também foram investigadas (ALTAMMAR et al., 2022; CUI et al., 2019; JOO et al., 2018; LU et al., 2022). Uma vez que grandes quantidades de plásticos são descartadas de forma inadequada em ambientes naturais, é interessante descobrir enzimas que possam ser aplicadas em soluções para degradação in situ do PET. Além

disso, as reações de hidrólise em temperaturas moderadas podem reduzir os custos do processo (LU et al., 2022; WORM et al., 2017).

Vários microrganismos são fontes de cutinases com potencial para degradação de polímeros, e características particulares de cada enzima podem influenciar na eficiência do processo de degradação. Além disso, a eficiência dos biocatalizadores também é dependente do tipo de poliéster utilizado (Tabela 4).

Tabela 4: Cutinases com atividade hidrolítica em polímeros.

Enzima	Mutação?	Organismo fonte	Degradação de polímeros			Referência
			Informações de degradação	Polímero	Condições de reação	
Fontes bacterianas						
Cut1 (GenBank: MK689853)	Não	<i>Streptomyces scabies</i>	Liberou 213 µg/mL de ácido tereftálico (TA)	Grânulos PET	37 °C, 20 days	(JABLOUNE et al., 2020)
The_Cut2_DM (PDB: 5LÜK)	N29R/ V30A	<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	Liberou 900 µM ácido láctico	Filme de PLLA	37 °C, 72 h	(RIBITSCH et al., 2017)
Cut190* variante	D250C- E296C/Q138 A/Q123H/ N202H	<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190	Taxa de degradação de 28,6 µmol/cm ² e despolimerização de 33,6 %.	Filme de PET-GF amorfo (cristalinidade: 6,3%)	70 °C, 3 dias	(ODA et al., 2018)
DuraPETase (PDB: 6KY5)	S214H/ Q119Y/ L117F/ I168R/S188Q /W159H/ T140D/R280 A/A180I/ G165A	<i>Ideonella sakaiensis</i>	Liberou 3,1 mM de produtos de degradação e despolimerização de 15%	Filme de PET semicristalino (cristalinidade: 30%)	37 °, 10 dias	(CUI et al., 2021)
DuraPETase (PDB: 6KY5)	S214H/ Q119Y/ L117F/ I168R/S188Q /W159H/	<i>Ideonella sakaiensis</i>	Liberou 5,7 µM de produtos de degradação	Filme de Polibutileno Tereftalato (PBT)	37 °C, 10 dias	(CUI et al., 2021)

	T140D/R280 A/A180I/ G165A			(cristalinidade: 34%)		
DuraPETase (PDB: 6KY5)	S214H/ Q119Y/ L117F/ I168R/S188Q /W159H/ T140D/R280 A/A180I/ G165A	<i>Ideonella sakaiensis</i>	Liberou 48 µM de produtos de degradação	Filme de Polietileno Naftalato (PEN) (cristalinidade: 21%)	37 °C, 10 dias	(CUI et al., 2021)
BhrPETase (GenBank: GBD22443)	Não	Cepa de bacteria termofílica HR29	Liberou 6,3 mM de produtos de degradação	PET amorfo em pó (cristalinidade: 11,2%)	70 °C, 20 h	(XI et al., 2021)
IsPETase (UniprotKB: A0A0K8P6T7)	Não	<i>Ideonella sakaiensis</i>	Liberou 2,1 mM de produtos de degradação	PET amorfo em pó (cristalinidade: 11,2%)	40 °C, 20 h	(XI et al., 2021)
LCC (UniprotKB: G9BY57)	Não	Metagenoma de composto de folhas e galhos	Liberou 5,8 mM de produtos de degradação	PET amorfo em pó (cristalinidade: 11,2%)	70 °C, 20 h	(XI et al., 2021)
DSI-Tfuc2 ¹	D204C/ E253C	<i>Thermobifida fusca</i>	Despolimerização de 58%	Filme de PET amorfo pré-tratado	70°, 96 h	(LIU; ZHANG; WU, 2022)
TfCut2 variante ²	S121P/ D174S/ D204P	<i>Thermobifida fusca</i> KW3	Liberou 11 mM de produtos de degradação e degradou 21 %	PET em pó (cristalinidade: 35,5%)	70 °C, 48 h	(LI et al., 2022a)
ThermoPETase (PDB: 6IJ6)	S121E/ D186H/ R280A	<i>Ideonella sakaiensis</i>	Liberou 120,9 µM de produtos de degradação	Filme de PET (cristalinidade: 41,8%)	40 °C, 3 dias	(SON et al., 2019)

FAST-PETase (PDB: 7SH6)	N233K/ R224Q/ S121E/ D186H/ R280A	<i>Ideonella sakaiensis</i>	Taxa de degradação de 1,4 mM/h, e perda de peso de 100 %	Embalagem de plástico para bolo (cristalinidade: 2,1%)	50 °C, 24 h	(LU et al., 2022)
Rcut (GenBank: OL660765)	Não	<i>Rhodococcus</i> sp.	Taxa de degradação de 76 mg/h/mg Rcut	Filme de PCL	30 °C, 6 h	(WON; YIM; KIM, 2022)
LC-cutinase (PDB: 4EB0)	Não	Metagenoma de composto de folhas e galhos	52 % de despolimerização do PET	Garrafa PET pós-consumo pré-tratada	72 °C, 24 h	(TOURNIER et al., 2020)
LC-cutinase variante (PDB: 6THT) ³	F243I/ /Y127G/ D238C- S283C	Metagenoma de composto de folhas e galhos	90 % de despolimerização do PET	Garrafa PET pós-consumo pré-tratada	72 °C, 10 h	(TOURNIER et al., 2020)
LC-cutinase variante (PDB: 6THT) ³	F243I/ /Y127G/ D238C- S283C	Metagenoma de composto de folhas e galhos	Perda de peso de 7 %	Filme de PET semi-cristalino (cristalinidade: 37%)	70 °C, 8 dias	(OH et al., 2022)
TfCut-4Mz	H184S/Q92G /F209I/I213K	<i>Thermobifida fusca</i>	Despolimerização de 68%	Garrafas comerciais pré- tratadas	60 °C, 96 h	(CHEN et al., 2022)
LCC-SGIK	H218S/ Y127G/ F243I/ S247K	Metagenoma de composto de folhas e galhos	Taxa de degradação de 26 %	Garrafas comerciais pré- tratadas	60 °C, 96 h	(CHEN et al., 2022)
BhrPETase-SGIK	H184S/ F93G/F209I/ S213K	Cepa de bactéria termofílica HR29	Taxa de degradação de 73%	Garrafas comerciais pré- tratadas	60 °C, 96 h	(CHEN et al., 2022)
PET2 7M (PDB: 7ECB)	F105R/ E110K/R47C /G89C/	Metagenoma de reator de degradação de gelatina	Liberou 125 µM de produtos de degradação	Filme de PET amorfo	68 °C, 24 h	(NAKAMUR A et al., 2021)

G180A/
S156P/T297P

PES-H1 variante 1	L92F/Q94Y	Biblioteca de metagenoma de composto	Despolimerização de 40%, e liberação de 85 mM de produtos de degradação (TPA e MHET)	PET em pó pré-tratado (cristalinidade: 33%)	72 °, 24 h	(PFAFF et al., 2022)
PES-H1 variante 2	R204C/S250C	Biblioteca de metagenoma de composto	Despolimerização de 7%, e liberação de 12 mM de produtos de degradação (TPA e MHET)	PET em pó pré-tratado (cristalinidade: 33%)	72 °C, 24 h	(PFAFF et al., 2022)
LC-cutinase RIP (PDB: 7W44)	A59R/V63I/N248P	Metagenoma de composto de folhas e galhos	Liberou 1070 µM de produtos de degradação	PET reforçado (cristalinidade: 7,58%)	85 °C, 6 dias	(ZENG et al., 2022)
LC-cutinase KIP (PDB: 7W45)	A59K/V63I/N248P	Metagenoma de composto de folhas e galhos	Liberou 980 µM de produtos de degradação	PET reforçado (cristalinidade: 7,58%)	85 °C, 7 dias	(ZENG et al., 2022)
LC-cutinase KRP (PDB: 7W1N)	A59K/V75R/N248P	Metagenoma de composto de folhas e galhos	Liberou 920 µM de produtos de degradação	PET reforçado (cristalinidade: 7,58%)	85 °C, 7 dias	(ZENG et al., 2022)
Ple629 variante	D226A/S279A	Consórcio microbiano marinho	Liberou 4,4 mM de produtos de degradação	Nanopartículas de PET amorfo	30 °C, 24 h	(LI et al., 2022b)

Fontes fúngicas

HiC variante	L66A/I169A	<i>Humicola insolens</i>	Liberou 0,11 mg/mL de produtos de degradação (ácido acético)	Resina composta macroporosa de poli(vinil acetato)	70 °C, 8 h	(SU et al., 2020)
HiC variante	L66A/I169A	<i>Humicola insolens</i>	Liberou 2,88 µL/mL de produtos de degradação (metanol e etanol)	Resina composta	70 °C, 8 h	(SU et al., 2020)

HiC ⁴	-	<i>Humicola insolens</i>	Liberou 105,62 mmol/L de produtos de degradação (TPA)	macroporosa de poli(acrilato) Flocos moídos de PET pós-consumo (cristalinidade: 41,1%)	70 °C, 96 h	(EUGENIO et al., 2022)
HiC ⁴	-	<i>H. insolens</i>	Liberou 2593 µM de produto de degradação (TPA)	Fibras de PET NML 10 mm (cristalinidade: 35,4%)	70 °C, 14 dias	(DE CASTRO et al., 2022)
HiC ⁴	-	<i>H. insolens</i>	Perda de peso de 65%	Filme de PBS	40 °C, 4 h	(ROSATO et al., 2022)
HiC ⁴	-	<i>H. insolens</i>	Perda de peso de 100% e taxa de degradação de 6,38 mg/h/cm ²	Filme de PBSA	40 °C, 2 h	(ROSATO et al., 2022)
HiC ⁴	-	<i>H. insolens</i>	Perda de peso de 100% e taxa de degradação de 1,96 mg/h/cm ²	Filme de PCL6800D	40 °C, 4,5 h	(ROSATO et al., 2022)
AnCUT3	Não	<i>Aspergillus niger</i>	Perda de peso indetectável	Pellet de PET	25 °C, 7 dias	(ALTAMMAR et al., 2022)
AnCUT3	Não	<i>Aspergillus niger</i>	Perda de peso de 8 mg	Pellet de PCL pré-tratado	25 °C, 7 dias	(ALTAMMAR et al., 2022)
CUT_FS (UniprotKB: P00590)	Não	<i>Fusarium solani pisi</i>	Liberou 1,96 g/L de produtos de degradação (TPA e MHET)	PET em pó pré-tratado	28 °C, 240 h	(KOSIOROW SKA et al., 2022)
CUT_FS (UniprotKB: P00590)	Não	<i>Fusarium solani pisi</i>	Perda de peso de 91 %	Filme de PCL pré-tratado	28 °C, 144 h	(KOSIOROW SKA et al., 2021)

CUT_TR (GenBank: ETS02914)	Não	<i>Trichoderma reesei</i>	Perda de peso de 5 %	Filme de PCL pré-tratado	28 °C, 144 h	(KOSIOROW SKA et al., 2021)
MRCUT1 (UniprotKB: WG66_16246)	Não	<i>Moniliophthora roreri</i>	Perda de peso de 59 %	Filme de PES	37 °C, 21 dias	(VÁZQUEZ- ALCÁNTARA et al., 2021)
MRCUT1 (UniprotKB: WG66_16246)	Não	<i>M. roreri</i>	Perda de peso de 43 %	Filme de PCL	37 °C, 21 dias	(VÁZQUEZ- ALCÁNTARA et al., 2021)
MRCUT1 (UniprotKB: WG66_16246)	Não	<i>M. roreri</i>	Perda de peso de 31 %	Garrafas plásticas comerciais	37 °C, 21 dias	(VÁZQUEZ- ALCÁNTARA et al., 2021)

Fonte: A autora.

Legenda: Todas as enzimas listadas são cutinases recombinantes. ¹ Tfuc2 é um mutante de Tfu_0883 (GenBank: YP_288944). ² TfCut2 variante (TfCut2 S121P/D174S/D204P) é um mutante de TfCut2 (ENA: HG939556). ³ LC-cutinase variante ICCG-S165A. ⁴ Enzima comercial.

Cutinases fúngicas e bacterianas já foram avaliadas quanto à capacidade de hidrolisar diferentes poliésteres, como PET, Policaprolactona (PCL), Ácido Poli-L-Lático (PLLA), Polibutileno succinato (PBS), Polibutileno succinato adipato (PBSA) e Polietileno succinato (PES). A maioria das publicações faz uma avaliação preliminar da degradação de plásticos em pó ou filme, e poucos estudos avaliaram a degradação de plásticos pós-consumo. Alguns estudos que avaliaram a hidrólise de PET pós-consumo ou filme de PET com cristalinidade maior que 30% em temperaturas amenas (menos de 40 °C) utilizaram longos tempos de reação de hidrólise, chegando a 10 (CUI et al., 2021), 20 (JABLOUNE et al., 2020) e 21 dias (VÁZQUEZ-ALCÁNTARA et al., 2021) de reação. No entanto, outras publicações recentes mostraram resultados encorajadores para a hidrólise de plásticos pós-consumo.

A variante LC-cutinase alcançou um dos melhores resultados de degradação para PET pós-consumo (90%) usando PET pré-tratado (14,6% de porcentagem de cristalinidade) e 10 h de reação em temperatura elevada (72 °C) (TOURNIER et al., 2020). A enzima mutante é derivada da LCC cutinase. O LCC foi isolado de um metagenoma composto de folhas e ramos (SULAIMAN et al., 2012) e é considerado um agrupamento misto de genes de cutinase de actinomicetos. Alguns pesquisadores (KAWAI; KAWABATA; ODA, 2019) consideram os actinomicetos termofílicos as fontes microbianas mais promissoras para PET hidrolases. No entanto, em outro estudo, a variante LC-cutinase foi usada na hidrólise de filme PET semicristalino não tratado (cristalinidade: 37%) com uma temperatura de reação de 70 °C por 8 dias e resultou em uma perda de peso de PET de apenas 7 % (OH et al., 2022). Esses dados podem indicar que o pré-tratamento do plástico ainda é um fator decisivo para a hidrólise enzimática de PET.

Outra enzima com excelentes resultados de hidrólise para embalagens plásticas pós-consumo (cristalinidade: 2,1%) sem pré-tratamento foi a FAST-PETase, que atingiu 100% de degradação em 24 h (LU et al., 2022). Essa enzima resultou do redesenho da IsPETase, cujo principal objetivo era hidrolisar o PET em temperaturas mais amenas. Para fins de comparação, os pesquisadores realizaram reações de hidrólise de PET com FAST-PETase e a variante LC-cutinase, nas mesmas condições, exceto pela temperatura de reação. FAST-PETase mostrou atividade ligeiramente maior a 50 °C e 24 h de reação, liberando 34 mM de monômeros (TPA e MHET). A variante LC-cutinase liberou 30 mM de produtos a 60 °C e 24 h de reação. No entanto, é essencial observar que a hidrólise do PET pode resultar em outros compostos além do TPA e do MHET. Por exemplo, um subproduto comumente liberado durante a degradação do PET é o bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET) (TOURNIER et al., 2020), que os autores não

consideraram na comparação entre FAST-PETase e LC-cutinase (LU et al., 2022). Além disso, a LC-cutinase atingiu sua maior eficiência de hidrólise de PET a 72 °C (TOURNIER et al., 2020), diferente da temperatura avaliada para comparação com FAST-PETase (60 °C) (LU et al., 2022).

As enzimas variantes BhrPETase-SGIK, TfCut-4Mz, LCC-SGIK (CHEN et al., 2022), e PES-H1 variante 1 (PFAFF et al., 2022) também foram capazes de hidrolisar o PET pós-consumo. BhrPETase-SGIK, TfCut-4Mz e LCC-SGIK foram avaliados durante 96 h, em reações de hidrólise a 60 °C, quanto à sua capacidade de degradar garrafas plásticas comerciais pré-tratadas e atingiram taxas de degradação de 73, 68 e 26%, respectivamente (CHEN et al., 2022). Enquanto isso, PES-H1 variante 1 liberou 85 mM de produtos de degradação TPA e MHET após 24 h de reação de hidrólise de pó de PET pós-consumo pré-tratado (cristalinidade: 33%) a 72 °C (PFAFF et al., 2022).

A hidrólise do filme ou pellets de PCL também foi avaliada algumas vezes com e sem pré-tratamento da amostra. Várias cutinases foram estudadas e resultaram em taxas de degradação diferentes. A cutinase de *H. insolens* resultou em uma perda de peso de 100% dos filmes de PCL sem pré-tratamento em apenas 4,5 h a 40 °C (ROSATO et al., 2022). A cutinase de *F. solani pisi* também resultou em alta perda de peso (91%) do filme de PCL. No entanto, o PCL foi pré-tratado, o tempo de reação foi longo (6 dias) e a temperatura de reação foi menor (28 °C) (KOSIOROWSKA et al., 2021). Uma perda de peso menor (43%) ocorreu para a hidrólise do filme de PCL sem pré-tratamento com cutinase de *M. royeri*. Além disso, o tempo de reação foi longo (21 dias) (VÁZQUEZ-ALCÁNTARA et al., 2021) em comparação com cutinases de *H. insolens* e *F. solani pisi*. Duas outras cutinases também mostraram potencial para hidrólise de PCL sob diferentes condições de reação, porém o percentual de perda de peso do material não foi calculado (ALTAMMAR et al., 2022; WON; YIM; KIM, 2022). Adicionalmente, algumas cutinases hidrolisaram parcial ou totalmente outros tipos de polímeros sintéticos (CUI et al., 2021; RIBITSCH et al., 2017; ROSATO et al., 2022; SU et al., 2020; VÁZQUEZ-ALCÁNTARA et al., 2021).

Em geral, a maioria dos estudos de hidrólise de polímeros se concentrou no uso de cutinases selvagens e variantes obtidas a partir de fontes bacterianas. Portanto, apesar do interesse em descobrir enzimas capazes de hidrolisar polímeros, a diversidade de cutinases ainda precisa ser explorada. Analisando as entradas do banco de dados CAZy (LOMBARD et al., 2014), um banco de dados focado em exibir e analisar informações genômicas, estruturais e bioquímicas sobre enzimas ativas de carboidratos (CAZymes), existem mais de 4.500 entradas

para a família de carboidratos-esterases 5 (CE5). As cutinases pertencem à família CE5, juntamente com as acetil xilana esterases. Das enzimas pertencentes a família CE5, apenas 18 foram caracterizados, sendo que 12 possuem estrutura descrita. Ressalta-se também que algumas cutinases relatadas na literatura não pertencem à família CE5, como a LC-cutinase e a IsPETase. À vista disso, existe uma variedade de enzimas classificadas como cutinases que permanecem inexploradas.

Além disso, apesar dos esforços concentrados para projetar cutinases mais ativas e termoestáveis, a hidrólise de plásticos com alta cristalinidade ainda é um desafio que pode exigir abordagens mais robustas. Nesse sentido, é essencial continuar aprimorando os métodos de previsão de mutações estabilizadoras de proteínas para melhorar a atividade enzimática e a estabilidade térmica das cutinases. No tópico a seguir, serão relatadas algumas estratégias bem-sucedidas aplicadas para projeção de cutinases mutantes visando melhoria de atividade e aumento de termoestabilidade.

2.4.2 Otimização de cutinases via engenharia de proteínas

As enzimas são biomoléculas sensíveis e em sua forma selvagem, geralmente apresentam limitações que dificultam algumas aplicações práticas específicas. Diante desse cenário, a engenharia de proteínas tem um papel fundamental a desempenhar no design de sequências enzimáticas otimizadas (MUSIL et al., 2019). Esforços para produzir cutinases mais estáveis, especialmente, com atividade hidrolítica em plásticos têm se expandido nos últimos anos e várias otimizações baseadas em mutações únicas ou múltiplas com efeitos estruturais ou funcionais foram relatadas (Tabela 5).

Tabela 5: Efeitos estruturais e funcionais de mutações em cutinases.

Enzima inicial	Enzima variante	Mutações	Efeitos estruturais das mutações	Efeitos funcionais das mutações	Referências
The_Cut2 (PDB: 5LUJ)	The_Cut2_DM (PDB: 5LUK)	1. R29N/ A30V.	1. A variante não apresentou diferenças conformacionais significativas e mostrou diferenças na carga de superfície.	Aumento na liberação de produtos de degradação de PLLA de 350 µM para 900 µM.	(RIBITSCH et al., 2017)
Cut190* (PDB: 5ZNO)	Cut190* variante	1. D250C/E296C. 2. Q138A. 3. Q123H/N202H.	1. Substituição do sítio de ligação de Ca ²⁺ por uma ponte dissulfeto para aumentar a estabilidade térmica e estrutural. 2. Aumento do espaço disponível para ligação com substrato visando aumento de afinidade e atividade em direção a substratos poliméricos. 3. Modificações de superfície para aumentar a atividade e termoestabilidade.	Aumento na taxa de degradação de PET de 16 para 33%, e aumento no valor da temperatura de melting (T _m) de 68,4 para 85,7 °C.	(ODA et al., 2018)
IsPETase (UniprotKB: A0A0K8P6T7)	DuraPETase (PDB: 6KY5)	1. S214H/Q119Y/L117F. 2. I168R/S188Q. 3. W159H/T140D. 4. R280A/A180I. 5. G165A.	1. Formação de um domínio hidrofóbico bem-organizado. Melhorias no encaixe de PET no sítio catalítico. Aumento da estabilidade da fenda de ligação ao substrato. 2. Inserção de novas interações de pontes salinas. 3. Inserção de novas interações de ligações de hidrogênio. 4. Aumento das interações hidrofóbicas e atividade enzimática.	Aumento da taxa de degradação de PET de 12 µM para 3,1 mM, e aumento do valor de T _m de 46 para 77 °C.	(CUI et al., 2021)

PE-H (PDB: 6SBN)	PE-H/Y250S (PDB: 6SCD)	1. Y250S.	5. Estabilização da hélice α 4. 1. Aumento da abertura e da profundidade da fenda do sítio catalítico.	Aumento na liberação de produtos de degradação de PET de 4,2 mg/L para 5,4 mg/L.	(BOLLING ER et al., 2020)
TfCut2 (ENA: HG939556)	TfCut2 variante	1. S121P/D174S/D204P	1. Redução do número de ligações de hidrogênio com o ambiente externo, aumento da hidrofobicidade e aumento da estabilidade da proteína.	Aumento da taxa de degradação de PET de 0,45 to 20,89%, e aumento do valor de T_m de 71,4 para 80,7 °C).	(LI et al., 2022a)
IsPETase (UniprotKB: A0A0K8P6T7)	FAST-PETase (PDB: 7SH6)	1. N233K 2. R224Q 3. S121E/D186H 4. R280A.	1. Formação de pontes Salinas intramoleculares. 2. Formação de pontes de hidrogênio. 3. Permite uma nova rede de ligação de hidrogênio mediada por água. 4. Melhoria das interações hidrofóbicas e a atividade enzimática.	Aumento da liberação de produtos de degradação de PET de <1 para 30 μ M, e aumento do valor de T_m de 48,8 para 67,1 °C.	(LU et al., 2022)
IsPETase (UniprotKB: A0A0K8P6T7)	ThermoPETase (PDB: 6IJ6)	1. S121E/D186H 2. R280A	1. Formação de ligações de hidrogênio entre os resíduos Glu121 e Asn172, contribuindo para e estabilidade térmica. 2. Aumento das interações hidrofóbicas, contribuindo para atividade enzimática.	Aumento do valor de T_m de 48,8 para 57,61 °C, e aumento da liberação de produtos de degradação de PET de 8,7 para 120,9 μ M.	(SON et al., 2019)
LC-cutinase (PDB: 4EB0)	LC-cutinase variant (PDB: 6THT)	1. F243I/Y127G 2. D238C/S283C	1. Modificação da região de superfície de contato com o substrato. 2. Inserção de uma ligação dissulfeto.	Aumento da taxa de degradação de PET de 52 para 85%, e aumento no valor de T_m de 84,7 para 94 °C).	(TOURNIE R et al., 2020)
TfCut (PDB: 5ZOA)	TfCut-4Mz	1. H184S/Q92G/F209I/I213K	1. Modificação da fenda de ligação ao substrato PET para eliminar o	Aumento da taxa de degradação de PET de 2,5 para 90%.	(CHEN et al., 2022)

PET2 (UniprotKB: C3RYL0)	PET2 7M (PDB: 7ECB)		<ol style="list-style-type: none"> 1. F105R/E110K 2. R47C/G89C 3. G180A 4. S156P/T297P 	<p>impedimento estérico e aumentar o espaço para ligação do substrato.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Inserção de aminoácidos de carga positiva para modificação da carga de superfície. 2. Inserção de uma ponte dissulfeto. 3. Aumento da estabilidade da α-hélice e melhoria da estrutura secundária. 4. Redução da flexibilidade da região de loop. 	<p>Aumento do valor de T_m de 69 para 75,7 °C, e aumento da liberação de produtos de degradação de PET de 2,4 para 7,8 μM.</p>	(NAKAMU RA et al., 2021)
PES-H1 (PDB: 7CUV)	PES-H1 variante 1		<ol style="list-style-type: none"> 1. L92F/Q94Y 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Modificação da fenda de ligação ao substrato PET. 	<p>Aumento da taxa de degradação de PET de 27 para 62,4%, e aumento do valor de T_m de 84,9 para 86,7 °C.</p>	(PFAFF et al., 2022)
PES-H1 (PDB: 7CUV)	PES-H1 variante 2		<ol style="list-style-type: none"> 1. R204C/S250C 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inserção de uma ponte dissulfeto. 	<p>Aumento do valor de T_m de 84,9 para 91,3 °C e aumento da taxa de degradação de PET de 27 para 35%.</p>	(PFAFF et al., 2022)
LC-cutinase variant (PDB: 6THT)	LC-cutinase KIP		<ol style="list-style-type: none"> 1. A59K 2. V63I 3. N248P 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Estabilização da estrutura local por empacotamento. 2. Pode fortalecer as interações hidrofóbicas locais. 3. Estabiliza P248 situado no loop β8–α6 e promove interações adicionais entre o loop e a hélice α1. 	<p>Aumento da liberação de produtos de degradação de PET de 600 para 980 μM, e aumento do valor de T_m de 95,2 para 98,9°C.</p>	(ZENG et al., 2022)
LC-cutinase variant (PDB: 6THT)	LC-cutinase RIP		<ol style="list-style-type: none"> 1. A59R 2. V63I 3. N248P 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Estabilização da estrutura local por empacotamento e formação de ligação de hidrogênio. 	<p>Aumento da liberação de produtos de degradação de PET de 600 para 1070 μM, e</p>	(ZENG et al., 2022)

			<ol style="list-style-type: none"> 2. Pode fortalecer as interações hidrofóbicas locais. 3. Estabiliza P248 situado no loop $\beta 8-\alpha 6$ e promove interações adicionais entre o loop e a hélice $\alpha 1$. 	<p>aumento do valor de T_m de 95,2 para 98 °C.</p>
LC-cutinase variant (PDB: 6THT)	LC-cutinase KRP	<ol style="list-style-type: none"> 1. A59K 2. V75R 3. N248P 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Estabilização da estrutura local por empacotamento. 2. Formação de duas ligações de hidrogênio adicionais. 3. Estabiliza P248 situado no loop $\beta 8-\alpha 6$ e promove interações adicionais entre o loop e a hélice $\alpha 1$. 	<p>Aumento da liberação de produtos de degradação de PET de 600 para 920 μM, e aumento do valor de T_m de 95,2 para 98,6 °C.</p> <p>(ZENG et al., 2022)</p>
Ple629 (PDB: 7VPA)	Ple629 variante	1. D226A/S279A	1. Modificação da fenda de ligação ao substrato para aumentar o espaço para ligação do PET.	<p>Aumento da liberação de produtos de degradação de PET de 0,7 para 4,4 mM, e aumento dos valores de T_m de 42,9 para 46,9°C.</p> <p>(LI et al., 2022b)</p>
HiC (PDB: 4OYY)	HiC variante	1. L66A/I169A	1. Modificação da fenda de ligação ao substrato para eliminar o impedimento estérico e aumentar o espaço para ligação com o substrato.	<p>Aumento da liberação de produtos de degradação de resinas compostas macroporosas de poli(acetate de vinila) de 0,083 mg/mL para 0,11 mg/mL, e aumento da liberação de produtos de degradação de resinas compostas macroporosas de poliacrilatos de 1,1 mg/mL para 2,88 mg/mL.</p> <p>(SU et al., 2020)</p>

Tfu_0883 (NCBI: YP_288944)	Tfu_0883 variante	1. L90A	1. Aumento da acessibilidade da enzima para substratos de cadeia longa e flexibilização do movimento de regiões de loop ao redor do substrato.	Aumento da habilidade relativa de hidrólise de cutina de 100 para 540%. (DONG et al., 2020)
----------------------------------	-------------------	---------	--	---

Fonte: A autora.

As melhorias de eficiência mais cruciais neste grupo de enzimas estão relacionadas ao aumento da termoestabilidade e atividade enzimática. Para este fim, diferentes modificações foram sugeridas, incluindo o redesenho da fenda de ligação ao substrato (TOURNIER et al., 2020), a estabilização das voltas β e α -hélices aumentando a frequência da prolina ou aumentando o número total de resíduos hidrofóbicos (ZENG et al., 2022), adição de pontes dissulfeto (PFAFF et al., 2022), ligações de hidrogênio adicionais (LU et al., 2022), inserção de pontes salinas (CUI et al., 2021), estabilização da α -hélice pela substituição de glicina por alanina (NAKAMURA et al., 2021), e modificações de carga superficial (RIBITSCH et al., 2017).

A arquitetura da fenda de ligação ao substrato é uma característica bem explorada em cutinases. Vários estudos se concentraram na estrutura dessa fenda de ligação e identificaram mutações que facilitam a interação entre o substrato e a enzima (LI et al., 2022b; PFAFF et al., 2022; SU et al., 2020; TOURNIER et al., 2020; ZHANG et al., 2022). O desenho da variante HiC (SU et al., 2020) ocorreu a partir de comparações estruturais com uma cutinase de *T. fusca*. O sítio catalítico da cutinase HiC tem uma estrutura semelhante a um “*gatekeeper*” acima da região ativa. A substituição de L66 e V169 por alanina via mutagênese direcionada ao local resultou em uma lacuna mais ampla entre os resíduos 66 e 169 nos mutantes (L66A, I169A e L66A/I169A) em comparação com o tipo selvagem. Essas mutações impactaram positivamente a atividade catalítica da enzima.

Análises estruturais também apoiaram o redesenho da cutinase variante Tfu_0883 (DONG et al., 2020). Por meio dessas análises, os pesquisadores identificaram resíduos volumosos próximos à tríade catalítica e ao local de ligação do substrato para substituição por alanina por mutagênese direcionada ao local. O objetivo era melhorar a ligação a substratos de poliéster natural e a atividade hidrolítica da cutinase. A mutação L90A aumentou a acessibilidade da enzima a substratos de cadeia longa e variante mostrou atividades mais altas em poliéster natural. Usando um protocolo de simulação MD, os autores concluíram por meio de cálculos de energia livre que a variante L90A era mais favorável do que o tipo selvagem no reconhecimento de substrato. Para construir outra variante, Ple629 (LI et al., 2022b), os autores se basearam principalmente na estrutura de DuraPETase e IsPETase (CUI et al., 2019). Em seguida, eles construíram as enzimas mutantes por mutagênese dirigida ao local e avaliaram a atividade no PET e a estabilidade térmica. As substituições D226A/S279A resultaram nas melhorias mais notáveis. Segundo os autores, a troca de resíduos mais volumosos por outros menos volumosos reduziu consideravelmente o impedimento estérico para interação com substratos de poliéster, resultando em maior eficiência de degradação do PET.

Na variante da LC-cutinase, o objetivo das mutações era melhorar o encaixe do substrato PET. Para tanto, os pesquisadores selecionaram os aminoácidos da primeira camada de contato do sítio ativo para mutagênese de saturação sítio-específica. Em seguida identificaram mutações de ponto único capazes de aumentar a atividade enzimática da cutinase. Posteriormente, realizaram as análises de superfície de contato da enzima e da dinâmica molecular. Esta estratégia permitiu melhorar a atividade de hidrólise com a mutação F243I e aumentar o valor de T_m sem interferir na atividade enzimática com a mutação Y127G (TOURNIER et al., 2020). Para a variante Cut190* (ODA et al., 2018), as simulações de dinâmica molecular com o substrato PET indicaram que a mutação Q138A aumentou a área de superfície para ligação ao PET e diminuiu a energia de ligação. Para confirmar o efeito, após a inserção da mutação única por mutagênese sítio-dirigida, os autores realizaram uma avaliação funcional da enzima mutante Q138A, indicando aumento da capacidade de degradação do PET. Para a projeção de TfCut-4MzA aplicou-se uma estratégia semelhante (CHEN et al., 2022). A partir de simulações de dinâmica molecular, os locais de subligação do PET foram identificados e classificados. Em seguida, os pesquisadores remodelaram os locais vitais inserindo aminoácidos neutros de cadeia lateral curta para eliminar o impedimento estérico ou substituindo aminoácidos positivos rígidos de alto impedimento estérico por aminoácidos positivos de cadeia lateral curta. Finalmente, a combinação das melhores mutações de ponto único resultou em uma variante mais eficiente. As mutações H184S/Q92G/F209I/I213K combinadas ao longo da via direcional causaram um encurtamento da distância para um ataque nucleofílico, levando a uma melhor eficiência de degradação do PET.

Para a enzima PE-H (BOLLINGER et al., 2020), os autores focaram na abertura e profundidade do sítio catalítico e algumas outras regiões essenciais em cutinases que hidrolisam plásticos. A partir disso, eles fizeram várias mutações de ponto único, e apenas o Y250S aumentou a capacidade de degradação do PET de PE-H; no entanto, diminuiu o valor de T_m . Análises estruturais da variante mostraram que a mutação Y250S causou um rearranjo da alça que conecta a folha β_3 e a hélice α_2 e criou mais espaço no sítio catalítico da enzima, o que pode explicar o aumento da atividade em relação ao PET. Por outro lado, a variante DuraPETase (CUI et al., 2021) foi projetada usando uma estratégia computacional chamada estratégia acumulada gulosa para engenharia de proteínas (GRAPE). Os pesquisadores procuraram por mutações de ponto único potencialmente estabilizadoras ao longo de toda a sequência da proteína na primeira etapa da projeção. Eles identificaram mutações de ponto único e as construíram comercialmente. Em seguida, avaliaram as variantes em busca de aumento da T_m e manutenção da atividade catalítica. Posteriormente, as mutações foram

classificadas em grupos e acumuladas para a melhor combinação de estabilidade térmica e capacidade de degradação do PET. As substituições S214H, L117F e Q119Y forneceram um ajuste fino na abertura do sítio ativo adequado para a cadeia PET. L117F e Q119Y, localizados próximos ao sítio ativo, promoveram maior estabilidade da fenda de ligação, enquanto S214H preveniu a oscilação de W185. Simulações da estrutura cristalina e MD sugeriram um domínio hidrofóbico bem-organizado adequado para ligação de PET e um arranjo de "ajuste induzido" da lacuna do sítio ativo. As substituições L117F/Q119Y da DuraPETase forneceram a base para as mutações L92F e Q94Y de PES-H1 (PFAFF et al., 2022), que aumentaram a atividade enzimática da variante projetada. Segundo os autores, esse efeito decorre da natureza hidrofóbica das mutações que aumentam as interações não covalentes com o substrato e melhoram o empacotamento hidrofóbico geral e a estabilidade da enzima, como ocorreu com a DuraPETase. O efeito estabilizador das substituições hidrofóbicas está relacionado à ligação mais eficiente da enzima a substratos de natureza hidrofóbica, facilitando a adsorção efetiva das enzimas à superfície do polímero para a reação hidrolítica (WEI; ZIMMERMANN, 2017; ZIMMERMANN; BILLIG, 2011).

Outros estudos também focaram na inserção de resíduos hidrofóbicos para estabilização de proteínas, focando em regiões específicas de β -turns e α -hélices. Essas substituições visam aumentar a frequência de ocorrência de prolina em voltas β ou aumentar o número total de resíduos hidrofóbicos para aumentar a termoestabilidade da proteína. Este efeito é particularmente verdadeiro para dois locais específicos: as segundas posições nas voltas β e as posições N1 nas hélices α . Esses locais são considerados os mais críticos para a termoestabilização de proteínas. No entanto, as substituições de prolina dependem dos pré-requisitos estruturais da proteína (WATANABE; SUZUKI, 1998). Mutações deste tipo foram introduzidas em PET2 7M (NAKAMURA et al., 2021) e nas LC-cutinases KIP, RIP e KRP (ZENG et al., 2022). Para a inserção das mutações S156P/T297P em PET2 7M, os autores utilizaram a estrutura obtida através da modelagem por homologia e identificaram resíduos de aminoácidos que se ajustam ao ângulo diedro da prolina para introduzir as mutações. As análises funcionais dessas inserções indicaram um aumento no valor de T_m , enquanto a atividade de hidrólise do PET foi apenas levemente afetada em comparação com a enzima do tipo selvagem. Por outro lado, a mutação única N248P, projetada para estabilizar uma região de loop introduzindo interações de prolina nas LC-cutinases KIP, RIP e KRP, aumentou a capacidade de hidrólise de PET dessas variantes em altas temperaturas (90 °C) em comparação com a enzima parental.

Inserções de pontes dissulfeto foram aplicadas em quatro cutinases mutantes: variante Cut190* (ODA et al., 2018), variante LC-cutinase (TOURNIER et al., 2020), PET2 7M (NAKAMURA et al., 2021), e variante 2 de PES-H1 (PFAFF et al., 2022). O objetivo geral dessa estratégia também é aumentar a estabilidade térmica das enzimas, algo bem descrito na literatura (YAMAGUCHI et al., 1996; ZABETAKIS et al., 2014). Portanto, PET2 7M foi construído, incluindo o par de mutação R47C e G89C, responsável por um aumento de 3 °C na T_m . Além disso, a adição de íons em reações enzimáticas pode contribuir para aumentar a termoestabilidade de algumas enzimas (TOURNIER et al., 2020), e a substituição dos sítios de ligação desses íons por pontes dissulfeto pode resultar no mesmo efeito (THEN et al., 2016). Com base nisso, as ligações dissulfeto substituíram os sítios de ligação de metal para as variantes Cut190* (ODA et al., 2018), LC-cutinase (TOURNIER et al., 2020) e variante 2 de PES-H1. Para Cut190*, o par de mutação D250C/E296C mostrou um aumento no valor de T_m de 23,1 °C no estado livre de íons de cálcio, sugerindo que a ponte dissulfeto projetada contribuiu para a estabilização térmica. Por outro lado, os pares de mutações R204C/S250C na PES-H1 variante 2 e D238C/S283C na variante LC-cutinase resultaram em contribuições menores para a termoestabilidade, aumentando T_m em 6,4 e 9,8 °C, respectivamente.

A adição de ligações de hidrogênio está associada a uma melhor estabilidade térmica e estrutural, e as interações entre diferentes mutações podem maximizar esses efeitos positivos. Em DuraPETase (CUI et al., 2021), obtida através da estratégia GRAPE, uma análise estrutural sugeriu duas mutações relacionadas à formação de pontes de hidrogênio: W159H e T140D. De acordo com os autores, a mutação W159H formou novas interações de ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio da espinha dorsal de H237, por análise da estrutura cristalina. Por outro lado, em análises de simulação, W159H formou uma nova ligação de hidrogênio com S160 que aparentemente pode reconstruir o sítio ativo de DuraPETase. A estrutura cristalina da enzima mutante também sugere que T140D resultou em uma nova ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila de S142. Outra enzima mutante, FAST-PETase (LU et al., 2022), foi projetada usando um algoritmo de aprendizado de máquina baseado em estrutura. O algoritmo fez previsões de mutações potencialmente estabilizadoras ao longo de toda a sequência da proteína. Os autores realizaram uma varredura abrangente de mutagênese *in silico*, classificaram as previsões por probabilidades previstas (mudança de ajuste) e geraram mutações únicas e combinadas usando uma estratégia de combinação passo a passo. Posteriormente, as variantes foram obtidas por mutagênese sítio-dirigida e caracterizadas. Aqueles que apresentaram melhor atividade catalítica em direção ao plástico e melhores valores de T_m foram usados para construir novas combinações. A melhor combinação obtida inclui as mutações

R224Q/S121E/D186H, que adicionam novas ligações de hidrogênio. Quando mutado para glutamina, a cadeia lateral de R224 forma uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila de S192, e a mutação S121E permite uma nova rede de ligações de hidrogênio mediadas por água com H186 e N172. As mutações S121E e R224Q, em cenários isolados e combinados, aumentaram a temperatura de fusão e a capacidade de hidrolisar o PET nas enzimas mutantes.

Por outro lado, a construção das variantes LC-cutinase KRP e LC-cutinase RIP teve como objetivo aumentar a termoestabilidade da LC-cutinase. Uma das estratégias utilizadas foi aumentar as interações hidrofóbicas internas. Nesse sentido, as mutações V75R e A59R formaram novas pontes de hidrogênio, e a avaliação funcional das mutações individuais indicou que essas substituições aumentaram a termoestabilidade da LC-cutinase e facilitaram a hidrólise do PET a 90 °C. Além de adicionar uma nova ponte de hidrogênio, a mutação A59R, localizada na cadeia β mais externa da enzima, estabiliza a estrutura local empacotando-se contra o Y78 adjacente da LC-cutinase RIP. O mesmo efeito de estabilização da estrutura local ocorreu para a mutação A59K nas LC-cutinases KRP e KIP.

As mutantes DuraPETase(CUI et al., 2019) e FAST-PETase (LU et al., 2022) também mostraram novas interações de pontes salinas. Em DuraPETase, a mutação I168R estabeleceu uma outra interação de ponte salina entre os resíduos I168R e D186. As simulações de estrutura cristalina e dinâmica molecular sugerem que o I168R sozinho pode conferir maior estabilidade à enzima variante. Na FAST-PETase, a mutação N233K introduziu uma lisina carregada positivamente adjacente a E204, formando uma ponte salina intramolecular. Além disso, a mutação N233K aumentou significativamente a termoestabilidade e a atividade da enzima variante. Para avaliar a portabilidade do N233K, os pesquisadores introduziram essa mutação de lisina correspondente em outras cutinases (LC-cutinase e Cut190) (LU et al., 2022) e observaram um aumento substancial na termoestabilidade e na atividade hidrolítica do PET nas variantes resultantes.

A estratégia de estabilizar α -hélices pela substituição de glicina por alanina foi empregada em DuraPETase (CUI et al., 2019) e PET2 7M (NAKAMURA et al., 2021). A presença de resíduos de glicina em estruturas α -helicoidais geralmente está associada à instabilidade. Em contraste, a presença de alanina é considerada mais estável devido ao seu efeito hidrofóbico e entropia de dobramento (LÓPEZ-LLANO et al., 2006). A enzima PET2 (NAKAMURA et al., 2021) contém uma α -hélice com resíduos de glicina próximos ao resíduo de serina da tríade catalítica. Consequentemente, os autores substituíram G177 até G180 por alanina, uma de cada vez. A mutação G180A foi uma das mais eficazes, melhorando a estrutura secundária da enzima variante e aumentando significativamente sua temperatura de fusão e

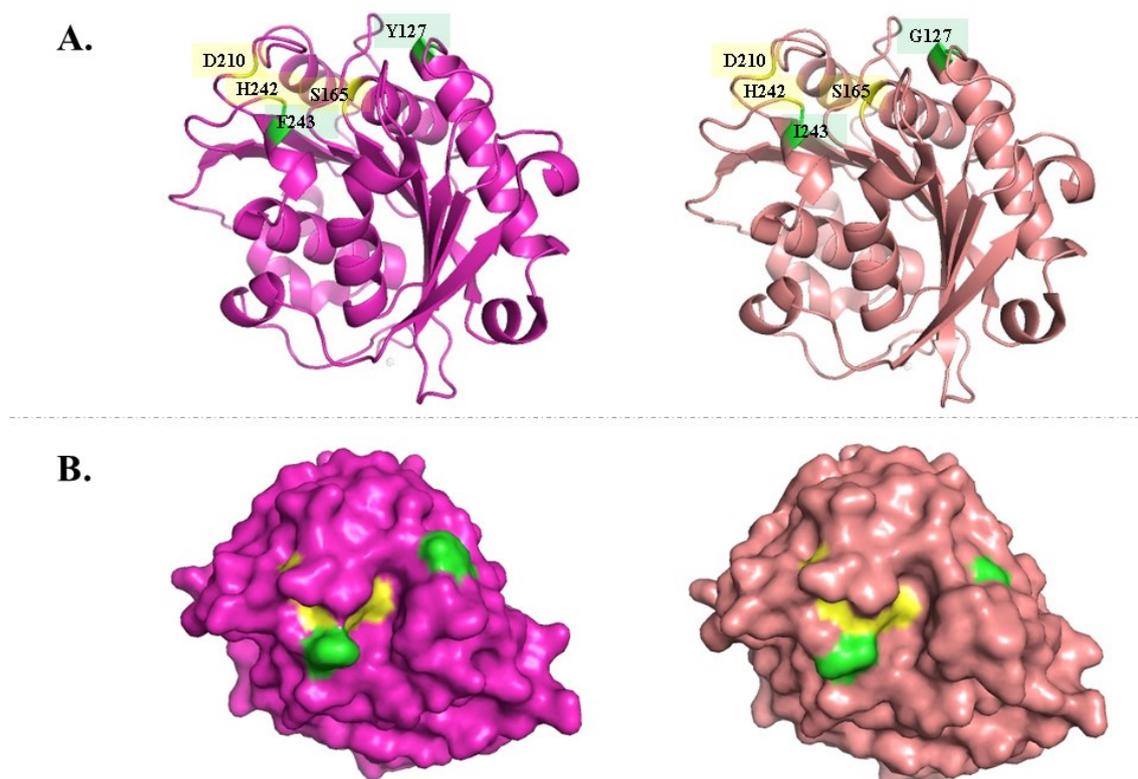
atividade enzimática em PET. A DuraPETase (CUI et al., 2019) apresentou resultados similares com a mutação G165A, que aumentou tanto a atividade de degradação do PET quanto a estabilidade térmica da enzima devido à estabilização da hélice $\alpha 4$ e a consequente estabilização da tríade catalítica.

Finalmente, a estratégia de modificação de carga superficial foi usada para projetar Thc_Cut2_DM (RIBITSCH et al., 2017) e PET2 7M (NAKAMURA et al., 2021). As mutações N29R/V30A projetadas nas regiões de superfície de Thc_Cut2_DM influenciaram significativamente a hidrólise de PET (HERRERO ACERO et al., 2011) e PLLA (RIBITSCH et al., 2017). As estruturas das enzimas mutantes e do tipo selvagem foram resolvidas e analisadas. No entanto, os autores não observaram mudanças estruturais significativas entre as enzimas. Para explicar o aumento da atividade da enzima variante em relação ao PLLA, os autores usaram estudos de dispersão de raios X de pequeno ângulo (SAXS) e descobriram que a variante Thc_Cut2_DM parece mais compacta e exibe mudanças na interface proteína-água. Já as mutações F105R/E110K em PET2 7M (NAKAMURA et al., 2021) foram baseadas em resíduos de aminoácidos característicos da IsPETase, para aumentar a atividade enzimática e a estabilidade térmica. Quando avaliadas individualmente, ambas as mutações aumentaram a T_m e a atividade enzimática. As cargas de superfície das enzimas selvagens e mutantes foram calculadas pelo software Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) e comparadas. A enzima PET2 de tipo selvagem mostrou cargas neutras a negativas em torno de F105 e E110. Por outro lado, em PET2 7M, a área com cargas positivas foi mais proeminente do que a enzima selvagem e semelhante às cargas positivas na superfície da IsPETase.

De modo geral, as variantes de cutinases com melhorias notáveis envolvem o uso de estratégias combinadas para melhoria da atividade e termoestabilidade. A variante LC-cutinase (TOURNIER et al., 2020), por exemplo, exibiu melhorias significativas na atividade de hidrólise de PET (aumento na taxa de degradação de 52 para 85%) e nos valores de T_m (aumento de 9,3 °C). Para isso, duas estratégias distintas de modificação foram combinadas: remodelação do sítio catalítico (Figura 6) e substituição de sítios de ligação de metais divalentes por pontes dissulfeto. Uma combinação de estratégias semelhantes resultou em uma taxa aumentada de degradação de PET (de 16 para 33%) e valores de T_m (aumento de 17,3 °C) para a variante Cut190*(ODA et al., 2018).

Figura 6: Estrutura tridimensional da LC-cutinase do tipo selvagem (magenta) (PDB: 4EB0) e LC-cutinase variante (rosa claro) (PDB: 6THT). (A) A estrutura é representada em forma de desenho com destaque para os aminoácidos da tríade catalítica (amarelo) e aminoácidos

mutantes (verde). (B) Representação da superfície de contato da enzima com o solvente, destacando os aminoácidos da tríade catalítica (amarelo) e aminoácidos mutados (verde).



Fonte: Figura gerada pela autora, com base na estrutura cristalina resolvida e depositada no banco de dados PDB.

Apesar dos excelentes resultados da estratégia colaborativa, algumas projeções focadas em uma única estratégia também alcançaram resultados animadores. O ajuste da fenda de ligação ao substrato, por exemplo, parece ser uma modificação significativa e consideravelmente eficiente para algumas cutinases como PES-H1 variante 1 (PFAFF et al., 2022) que aumentou a taxa de degradação do PET de 27 para 62,4% após mutações para remodelar a abertura do sítio catalítico e a cutinase TfCut-4Mz (CHEN et al., 2022) que aumentou a taxa de degradação do PET de 2,5 para 90%. Além disso, duas outras cutinases (LCC, GenBank AEV21261.1 e BhrPETase, GenBank A0A2H5Z9R5) projetadas com mutações correspondentes às mutações TfCut-4Mz aumentaram as taxas de degradação de PET em 26% (LCC-SGIK) e 73% (BhrPETase-SGIK) (CHEN et al., 2022).

Outro aspecto relevante na projeção das cutinases são os dois grandes grupos de abordagens aplicadas na identificação de mutações potencialmente positivas. A maioria dos

estudos revisados usou uma abordagem racional para obter variantes mais eficientes (BOLLINGER et al., 2020; ODA et al., 2018; TOURNIER et al., 2020). Estratégias racionais são baseadas em mutações pontuais específicas, ou seja, conhecimento prévio ou previsão da relação entre os aminoácidos mutados e a funcionalidade a ser otimizada (MARTÍNEZ; SCHWANEBERG, 2013). Além do conhecimento da estrutura terciária da enzima, bioinformática, modelagem molecular e técnicas de química computacional são necessárias para prever a relação estrutura-função de proteínas otimizadas por meio desse tipo de estratégia (KUMAR; SINGH, 2013).

Alguns estudos recentes aplicaram métodos computacionais mais robustos para redesenhar cutinases com fluxos de trabalho complexos que prometem melhorar a qualidade das previsões de estabilidade de proteínas (CUI et al., 2021; LI et al., 2022a; LU et al., 2022). A variante TfCut2, por exemplo, foi obtida combinando os métodos modelagem Dinâmica Molecular (MD) e *Machine Learning* (ML). As características estruturais foram obtidas pelo método MD e usadas como entrada para o método ML (LI et al., 2022a). Para a projeção da FAST-PETase, os autores usaram uma rede neural convolucional auto-supervisionada (CNN) tridimensional (3D), e as previsões foram feitas com base em estruturas cristalinas resolvidas. Além das mutações previstas pelo aprendizado de máquina, duas outras mutações, também presentes em outros mutantes de IsPETase, foram inseridas na FAST-PETase (LU et al., 2022). Outra variante de IsPETase, DuraPETase, foi obtida pela combinação de métodos computacionais. As mutações foram previstas com base na função estatística de energia, função de energia baseada em campo de força e um método baseado em filogenia (CUI et al., 2019).

Ambas as abordagens de projeção de mutações apresentam vantagens e desvantagens. As abordagens racionais para redesenho de proteínas podem limitar a exploração dos efeitos de múltiplas mutações. Projetar enzimas mais eficientes pode exigir variações complexas de sequência. E quanto maior o número de mutações ou intervenções, maior a possibilidade de efeitos não intencionais, como dobramento incorreto de proteínas. Com avanços em métodos computacionais baseados em cálculos de energia, aprendizado de máquina e análise filogenética, é possível fornecer maneiras de evitar isso (BOMMARIUS; BLUM; ABRAHAMSON, 2011; KUMAR; SINGH, 2013; MARTÍNEZ; SCHWANEBERG, 2013). No entanto, apesar dos avanços, os métodos computacionais ainda apresentam limitações. Algumas técnicas envolvem altos custos computacionais. Além disso, as previsões podem ser limitadas devido à quantidade e qualidade dos dados experimentais disponíveis (CUI et al., 2021; MUSIL et al., 2019).

Por fim, outro aspecto crítico observado é que os estudos mais recentes de engenharia de cutinases focam em enzimas derivadas de organismos procarióticos. A LC-cutinase é uma das enzimas mais exploradas, juntamente com a IsPETase. No entanto, existe uma diversidade de microrganismos produtores de cutinases. Organismos eucarióticos, como fungos fitopatogênicos, podem conter vários genes de cutinase no genoma que codificam proteínas com ampla funcionalidade e baixa similaridade de sequência. Portanto, várias enzimas podem ser exploradas para projetar sequências otimizadas para aplicações biotecnológicas específicas (ARYA; COHEN, 2022; NOVY et al., 2021). A exploração dessa diversidade de cutinases pode contribuir para o aumento de dados experimentais robustos e, juntamente com a evolução dos métodos computacionais, levar ao desenvolvimento de enzimas altamente ativas e estáveis. Este cenário facilitará o redesenho de cutinases para aplicações específicas, reduzindo o esforço experimental e permitindo o uso eficiente de métodos com custos computacionais razoáveis.

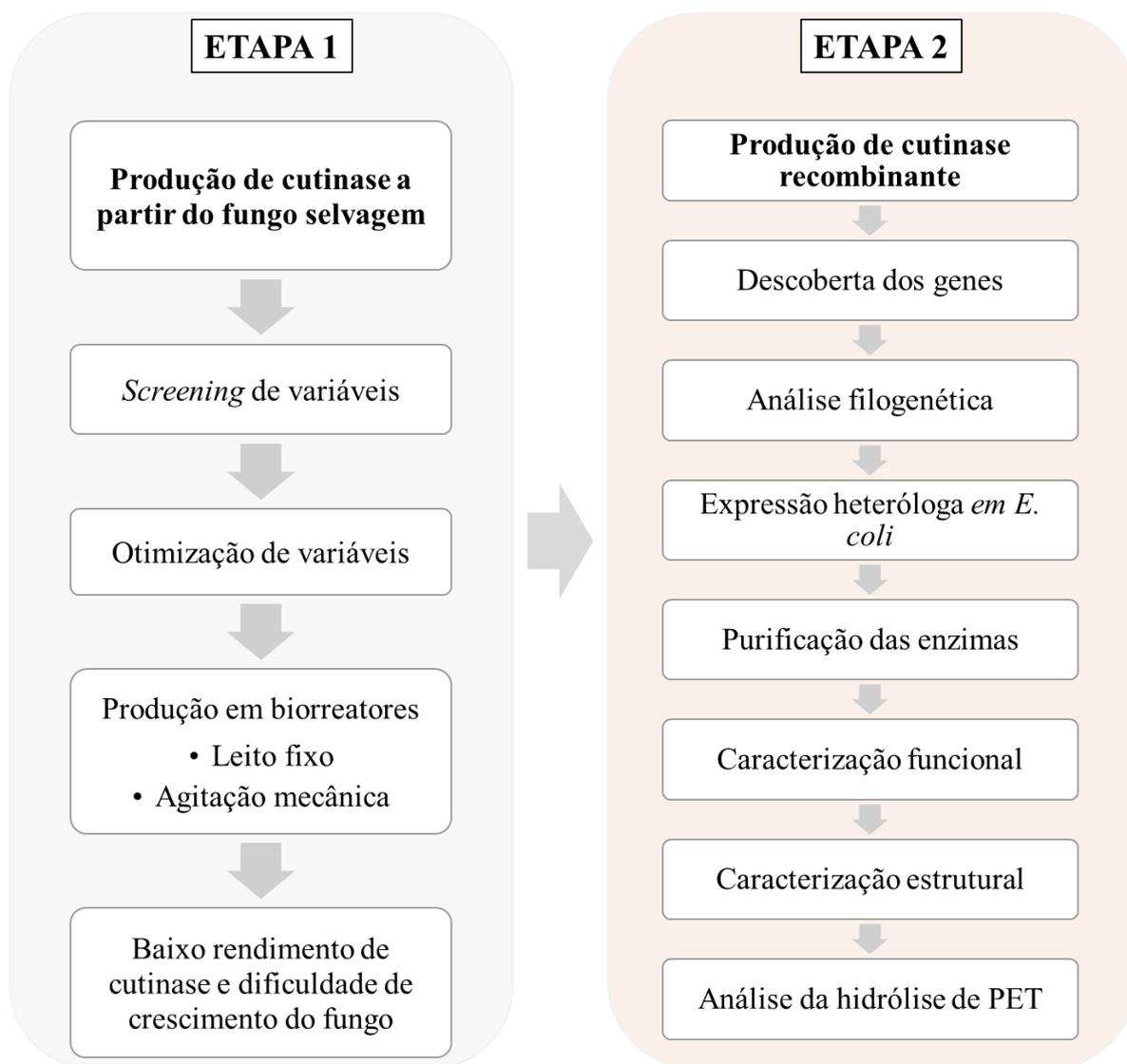
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Com base na revisão de literatura apresentada neste capítulo, a produção de cutinases de *F. verticillioides* é pouco explorada na literatura. As cutinases são uma classe de enzimas com ampla gama de aplicações, recentemente o interesse em aplicá-las na hidrólise de polímeros tem ganhado destaque. No entanto, explorar o potencial dessas enzimas exige o uso de estratégias de produção que proporcionem um aumento de rendimento. Além disso, é necessário explorar características funcionais e estruturais dessas enzimas para inferir suas possíveis aplicações com maior precisão. Muitas cutinases podem apresentar dificuldades para hidrolisar alguns tipos de compostos, especialmente plásticos. Nesse sentido, análises de estrutura in silico da enzima combinadas com análises funcionais podem fornecer um panorama geral sobre as enzimas e nortear as propostas de aplicação. Sendo assim, o presente trabalho contribui para a ampliação do conhecimento sobre cutinases de *F. verticillioides*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este tópico é composto por duas etapas experimentais (Figura 7). A primeira fase envolve a produção de cutinase por *F. verticillioides* selvagem. Em seguida apresenta-se a metodologia aplicada na produção das cutinases recombinantes.

Figura 7: Fluxograma das etapas experimentais desenvolvidas. A etapa 1 refere-se à produção de cutinase pelo fungo selvagem e resultou em baixos rendimentos enzimáticos. A etapa 2 refere-se à produção das cutinases de *F. verticillioides* em um sistema de expressão



3.1 PRODUÇÃO DE CUTINASE PELO MICRORGANISMO NATIVO

3.1.1 Substratos e outros químicos

Todos os produtos químicos utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich e Neon Reagentes Analíticos. Os substratos utilizados neste estudo foram subprodutos agroindustriais obtidos nas agroindústrias da região de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os substratos foram: farelo de arroz e casca de arroz. Ambos foram usados como recebidos. O farelo de arroz foi mantido a -12 °C até o momento da fermentação.

3.1.2 Microrganismo e inóculo

No presente estudo foi utilizado o microrganismo *F. verticillioides*. A cepa foi obtida no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O microrganismo foi cultivado em placas de Petri contendo batata-dextrose- ágar (BDA) a 28 °C por 7 dias e mantido a 4 °C.

Para inoculação do substrato sólido utilizou-se uma estratégia que consistiu na inoculação de uma suspensão líquida contendo micélios fúngicos. Três discos de 6 mm de micélio fúngico foram transferidos para um frasco de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de batata-dextrose e mantidos a 28 °C por 3 dias sob agitação a 120 rpm. Utilizou-se uma incubadora refrigerada com agitação TE-424 (Tecnal).

3.1.3 Fermentação em estado sólido

As fermentações foram realizadas em frascos cônicos (500 mL) contendo 30 g de substrato seco. O teor de umidade e a proporção dos substratos foram ajustados de acordo com o planejamento experimental. Posteriormente, o material sólido foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Após o resfriamento até a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), o inóculo foi adicionado e as fermentações foram conduzidas em uma incubadora BOD TE-371 (Tecnal) por tempo especificado. No final da fermentação, o material sólido fermentado foi utilizado para a extração da enzima produzida. Foi realizada uma triagem inicial que consistiu no uso de um planejamento Plackett-Burmann com 12 experimentos (PB12) mais cinco pontos centrais para identificar as variáveis significativas no processo. As variáveis estudadas foram a porcentagem, em peso, de farelo de arroz no meio (30 g de meio composto por farelo de arroz + casca de arroz), densidade de inóculo, solução de micronutrientes com proporção em peso de

cada componente 1:1 (K_2HPO_4 , $MgSO_4$, KCl e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e $NaCl$), temperatura e teor de umidade do meio. A Tabela 6 apresenta o intervalo de variáveis investigadas. As fermentações foram realizadas utilizando o fungo *F. verticillioides* e diferentes proporções de farelo de arroz e casca de arroz como substrato por 10 dias.

Tabela 6: Matriz do planejamento Plackett-Burmann para seleção de variáveis significativas no processo de fermentação. Planejamento consistiu em 12 experimentos variando os valores de cada variável em torno dos pontos centrais. Foram realizados cinco ensaios com os valores médios das variáveis (pontos centrais). Todos os valores reais e codificados utilizados para os cálculos estatísticos são fornecidos na tabela.

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5
1	75,0 (+1)	10,0 (-1)	5,0 (+1)	25,0 (-1)	40,0 (-1)
2	75,0 (+1)	20,0 (+1)	0,0 (-1)	35,0 (+1)	40,0 (-1)
3	25,0 (-1)	20,0 (+1)	5,0 (+1)	25,0 (-1)	80,0 (+1)
4	75,0 (+1)	10,0 (-1)	5,0 (+1)	35,0 (+1)	40,0 (-1)
5	75,0 (+1)	20,0 (+1)	0,0 (-1)	35,0 (+1)	80,0 (+1)
6	75,0 (+1)	20,0 (+1)	5,0 (+1)	25,0 (-1)	80,0 (+1)
7	25,0 (-1)	20,0 (+1)	5,0 (+1)	35,0 (+1)	40,0 (-1)
8	25,0 (-1)	10,0 (-1)	5,0 (+1)	35,0 (+1)	80,0 (+1)
9	25,0 (-1)	10,0 (-1)	0,0 (-1)	35,0 (+1)	80,0 (+1)
10	75,0 (+1)	10,0 (-1)	0,0 (-1)	25,0 (-1)	80,0 (+1)
11	25,0 (-1)	20,0 (+1)	0,0 (-1)	25,0 (-1)	40,0 (-1)
12	25,0 (-1)	10,0 (-1)	0,0 (-1)	25,0 (-1)	40,0 (-1)
13	50,0 (0)	15,0 (0)	2,5 (0)	30,0 (0)	60,0 (0)
14	50,0 (0)	15,0 (0)	2,5 (0)	30,0 (0)	60,0 (0)
15	50,0 (0)	15,0 (0)	2,5 (0)	30,0 (0)	60,0 (0)
16	50,0 (0)	15,0 (0)	2,5 (0)	30,0 (0)	60,0 (0)
17	50,0 (0)	15,0 (0)	2,5 (0)	30,0 (0)	60,0 (0)

Onde: X1 Porcentagem de farelo de arroz (%); X2 Densidade de inóculo (%); X3 Solução de micronutrientes (%); X4 Temperatura (°C); X5 Umidade (%).

A etapa seguinte consistiu na maximização da produção de cutinase por *Fusarium verticillioides* aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR) para três variáveis independentes (temperatura, umidade e a porcentagem de farelo de arroz). A densidade de inóculo foi fixada em 20% em peso. A Tabela 7 apresenta o intervalo de variáveis investigadas.

Fermentações adicionais foram realizadas, nas condições ótimas obtidas através do DCCR, com o intuito de avaliar a influência da espessura do meio na produção de cutinase.

Para tanto, foram preparadas fermentações com 2, 4, 6 e 8 cm de espessura de substrato seco. Em seguida avaliou-se a produção de cutinase em diferentes tempos de fermentação. Os tempos de fermentação avaliados foram 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias.

Tabela 7: Matriz do planejamento DCCR para otimização das variáveis significativas no processo de fermentação. Planejamento consistiu na avaliação de três variáveis independentes (temperatura, umidade e a porcentagem de farelo de arroz). Todos os valores reais e codificados das variáveis, utilizados para os cálculos estatísticos, são fornecidos na tabela.

Ensaio	Porcentagem de farelo de arroz (%)	Temperatura (°C)	Umidade (%)
1	60,0 (-1)	22,4 (-1)	60,0 (-1)
2	80,0 (+1)	22,4 (-1)	60,0 (-1)
3	60,0 (-1)	29,6 (+1)	60,0 (-1)
4	80,0 (+1)	29,6 (+1)	60,0 (-1)
5	60,0 (-1)	22,4 (-1)	80,0 (+1)
6	80,0 (+1)	22,4 (-1)	80,0 (+1)
7	60,0 (-1)	29,6 (+1)	80,0 (+1)
8	80,0 (+1)	29,6 (+1)	80,0 (+1)
9	53,2 (-1,68)	26,0 (0)	70,0 (0)
10	86,8 (+1,68)	26,0 (0)	70,0 (0)
11	70,0 (0)	20,0 (-1,68)	70,0 (0)
12	70,0 (0)	32,0 (+1,68)	70,0 (0)
13	70,0 (0)	26,0 (0)	53,2 (-1,68)
14	70,0 (0)	26,0 (0)	86,8 (+1,68)
15	70,0 (0)	26,0 (0)	70,0 (0)
16	70,0 (0)	26,0 (0)	70,0 (0)
17	70,0 (0)	26,0 (0)	70,0 (0)
18	70,0 (0)	26,0 (0)	70,0 (0)

3.1.4 Composição centesimal do substrato

O farelo e a casca de arroz utilizados como substrato foram submetidos a análises de composição centesimal. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Análises LABCAL, no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), conforme os certificados de ensaio do ANEXO I. Foram analisados resíduo mineral fixo, teor de gordura e umidade e voláteis, ambos

pelo Método IAL. O teor de proteína e fibra alimentar total, ambos pelo Método AOAC, e carboidratos totais pelo Método RDC n° 360.

3.1.5 Scale up da produção de cutinase

A produção de cutinase foi testada em duas configurações de reatores. Foram utilizadas 750 g de substrato (farelo e casca de arroz), preenchendo aproximadamente 50% do volume total do reator. As fermentações foram mantidas a temperatura ambiente, de aproximadamente 28 °C durante 7 dias. A temperatura de 28 °C está dentro da faixa de temperatura otimizada no DCCR e 7 dias são suficientes para visualizar o crescimento do microrganismo e a consequente atividade de cutinase.

A primeira configuração consistiu em um reator com agitação mecânica e injeção de ar na parte inferior do reator, conforme Figura 8. Com essa configuração foram realizadas duas fermentações. Na primeira fermentação utilizou-se a umidade inicial de 80%, injeção de ar úmido no reator e agitação durante 5 minutos a cada 12 horas. Na segunda fermentação utilizou-se umidade de 60%, intercalou-se a injeção de ar seco e úmido a cada 24 horas e agitação durante 2 minutos a cada 24 horas.

A segunda configuração consistiu em um reator de leito fixo com injeção de ar na parte inferior do reator, conforme Figura 9. Também foram conduzidas duas fermentações nesta configuração de reator. A primeira em condição de umidade inicial de 80%, e injeção de ar úmido. A segunda com condição de umidade inicial de 60% e intercalando a injeção de ar seco e úmido a cada 24 horas.

Figura 8: Configuração do biorreator com agitação mecânica utilizado nos testes de aumento de escala da produção de cutinase de *F. verticillioides*.

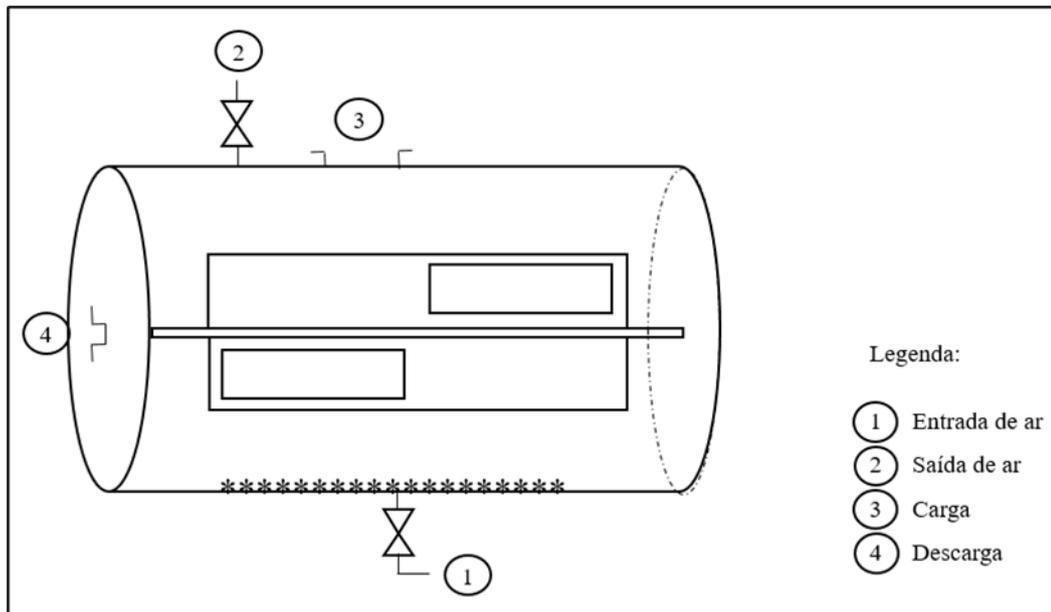
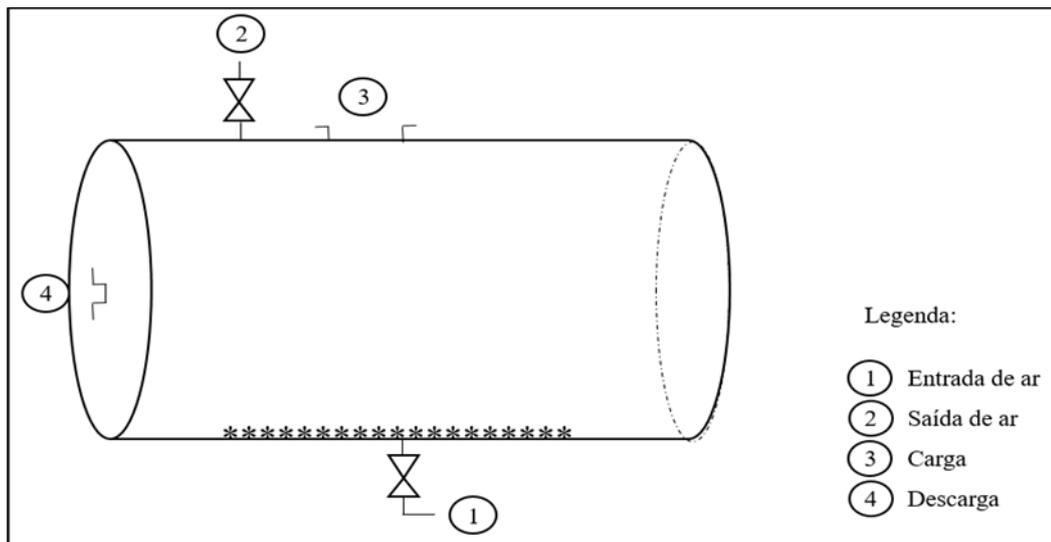


Figura 9: Configuração do biorreator de leito fixo utilizado nos testes de aumento de escala da produção de cutinase de *F. verticillioides*.



3.1.6 Extração da enzima

O material sólido fermentado foi usado para extração da enzima. Para tanto adicionou-se água destilada ao material sólido, em uma proporção de massa sólida/ massa líquida de 1:10, condição semelhante às encontradas na literatura (DE OLIVEIRA et al., 2019a; FRAGA;

CARVALHO; MACEDO, 2012). O material + água destilada foi mantido sob agitação a 30 °C, 120 rpm por 30 minutos. Utilizou-se uma incubadora refrigerada com agitação TE – 424 (Tecnal). Posteriormente, o material foi filtrado usando papel filtro e o sobrenadante utilizado na determinação da atividade enzimática.

3.1.7 Determinação da atividade de cutinase

Para determinação da atividade da enzima foi aplicado o método espectrofotométrico após a hidrólise de p-NPB a 405 nm (GIGLI et al., 2019). O volume total da reação foi de 4 mL. Seguiu-se uma metodologia relatada na literatura (PIO; MACEDO, 2008). Uma mistura reacional contendo 1,12 mM de p-NPB dissolvido em solução de tampão fosfato 50 mM, pH 6,8, composta por 0,2% de Tween 80 e 0,43 M de tetrahidrofurano (THF). Alíquotas de 0,07 mL de sobrenadante obtido na extração foram adicionadas a 3,43 mL da mistura reacional. Durante 15 minutos a reação acompanhou-se a reação e em seguida comparou-se com o branco. A mistura reacional foi utilizada no preparo do branco, neste caso adicionou-se 0,07 mL de tampão fosfato a 3,43 mL da mistura. Uma unidade de atividade cutinolítica foi definida como a quantidade de cutinase necessária para liberar um micromol de p-nitrofenil em 1 minuto nas condições determinadas.

3.1.8 Análise estatística dos resultados

Todos os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considerando um nível de significância de 95 %.

3.2 PRODUÇÃO DE CUTINASE RECOMBINANTE DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

3.2.1 Análise das sequências de cutinases

O banco de dados EnsemblFungi foi usado para pesquisar genes de cutinase no genoma de *F. verticillioides*. As sequências dos genes resultantes da pesquisa foram avaliadas quanto a

presença de sítio catalítico e de domínios conservados de cutinases. As previsões de domínio conservado e sítios catalíticos ativos foi realizada no InterPro Scan (QUEVILLON et al., 2005; ZDOBNOV; APWEILER, 2001). As pesquisas por genes homólogos foram realizadas usando o servidor NCBI BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). A plataforma SignalP 5.0 foi utilizada para prever a existência de peptídeo sinal nativo nos genes (ARMENTEROS et al., 2019). Para expressão do gene em um sistema procarioto o peptídeo sinal nativo do fungo precisa ser removido para correta expressão da proteína. A presença de ligações dissulfeto foi prevista no servidor web DiANNA (FERRÈ; CLOTE, 2005). Os sítios de N-glicosilação e O-glicosilação foram previstos nos servidores NetNglyc (GUPTA; BRUNAK, 2002) e NetOglyc (STEENTOFT et al., 2013), respectivamente. A ferramenta ExpASy foi utilizada para calcular o ponto isoelétrico (pI) teórico das proteínas (GASTEIGER et al., 2005). O peso molecular teórico foi calculado com a ferramenta Protein Molecular Weight (https://bioinformatics.org/sms/prot_mw.html).

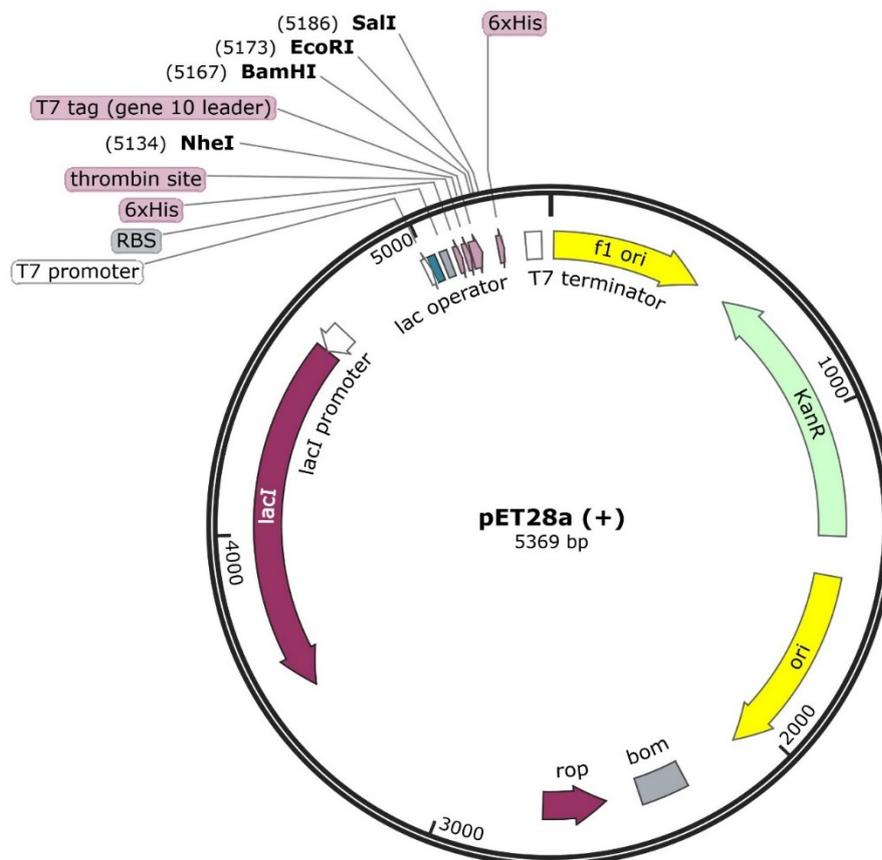
3.2.2 Análise filogenética das cutinases

Para a análise de filogenia, as sequências de todas as cutinases de *F. verticillioides* foram recuperadas da base de dados do EnsemblFungi. Um alinhamento múltiplo foi realizado considerando estas sequências, todas as enzimas CE5 caracterizadas na base CAZy, além de todas as sequências revisadas de Sordariomycetes contidas no banco de dados Uniprot. O alinhamento foi realizado com a plataforma T-COFFEE (análise por homologia) com parâmetros pré-definidos pelo servidor e a análise de máxima verossimilhança foi executada no modo “a la carte”. O alinhamento obtido após a análise no T-COFFEE foi utilizado como input para a construção da árvore filogenética usando PhyML. Approximate Likelihood-Ratio Test (aLRT) foi o teste estatístico para definição dos ramos tendo modelo SH-like com substituição como parâmetro. A figura da árvore final foi obtida usando a plataforma online iTOL.

3.2.3 Produção da proteína recombinante

As seqüências CDS de três cutinases precursoras de *Fusarium verticillioides* FvCut1, FvCut2 e FvCut3, obtidas do EnsemblFungi com os números de acesso FVEG_12346T0, FVEG_03395 e FVEG_13638, respectivamente, foram inseridas no plasmídeo pET28a (+) (Figura 10). As seqüências de nucleotídeos dos genes foram otimizadas para *E. coli* sem alterar a seqüência de aminoácidos codificada e os peptídeos de sinal nativos foram removidos. O relatório de otimização está disponível no ANEXO II. Os genes foram clonados nos sítios de restrição únicos no pET28a (+) e marcados com 6xHis-tag em N-terminal. A marcação da proteína com 6xHis-tag possibilita a purificação por afinidade. Os sítios de restrição usados para FvCut1 foram BamHI e XhoI e no caso de FvCut2 e FvCut3 os sítios de restrição foram EcoRI e SalI. Os genes otimizados, inseridos nos respectivos sítios de restrição foram sintetizadas pela FastBio Ltda (Ribeirão Preto, Brasil).

Figura 10: Mapa do vetor de expressão pET28a (+) utilizado para produção das cutinases de *F. verticillioides* nas cepas de *E. coli* BL21 (DE3) e Arctic Express (DE3) antes da clonagem dos genes de cutinase.



Fonte: Imagem gerada no SnapGene a partir da seqüência do vetor comercial.

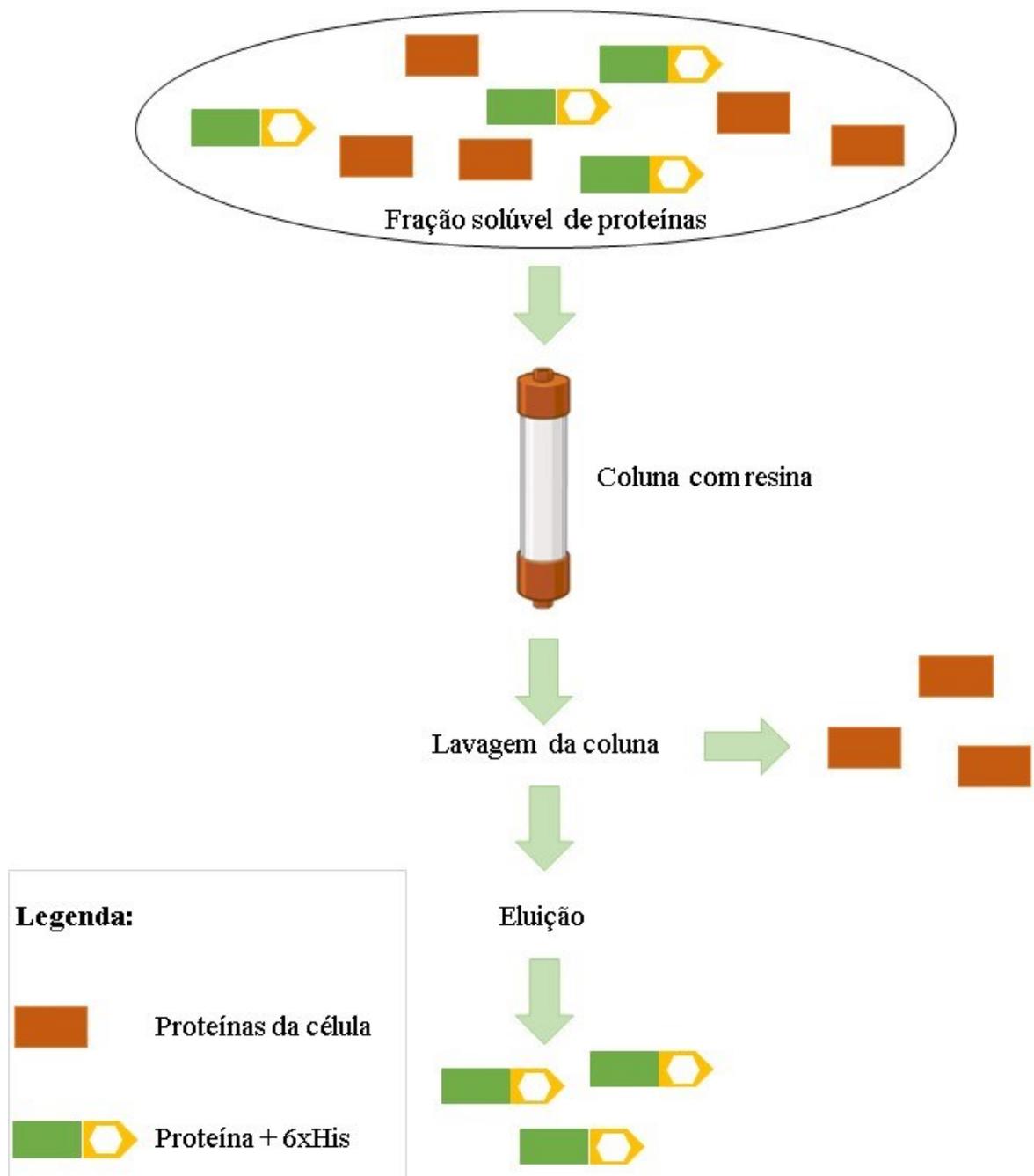
Células competentes das cepas *E. coli* DH5- α , BL21(DE3) e Arctic Express (DE3) foram preparadas. As construções sintéticas pET28a(+)*FvCut1*, pET28a(+)*FvCut2* e pET28a(+)*FvCut3* foram transformadas em *E. coli* DH5- α para replicação vetorial. Os plasmídeos foram extraídos da cepa DH5- α e usados para transformação das cepas de expressão. As proteínas foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) e Arctic Express (DE3). Todas as transformações foram realizadas por eletroporação e selecionadas em placas de ágar com meio Luria-Bertani (LB) contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina para seleção de cepas BL21(DE3) e 35 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina para seleção de cepas Arctic Express (DE3). Os transformantes positivos foram selecionados por PCR de colônia usando iniciadores T7. As colônias de BL21(DE3) e Arctic Express (DE3) selecionadas foram avaliadas para produção de cutinases em volume de 50 mL. A cepa Arctic Express (DE3) foi selecionada e cultivada por 12 horas a 37 °C, 250 rpm com os respectivos antibióticos, depois diluída (1:50) em um volume final de 800 mL. Após, as células foram cultivadas a 30 °C, 250 rpm por 4 horas e a indução realizada pela adição de 1 mM de Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e outra incubação a 12 °C por 24 horas. A cultura induzida foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de tampão de lise contendo lisozima, PMSF, DNase e Tris-HCl (50 mM, pH 7,5 para *FvCut1* e *FvCut2* e pH 8,5 para *FvCut3*) e foi sonificado (Sonicator QR500 W) com amplitude de 30% em 5 ciclos de pulsos de 20 segundos com um intervalo de 30 segundos. A fração insolúvel foi separada por centrifugação (10.000 rpm por 20 minutos) a 4 °C. As proteínas solúveis do sobrenadante foram utilizadas na etapa de purificação.

3.2.4 Purificação da proteína

FvCut1, *FvCut2* e *FvCut3* foram purificados por cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC) usando resina TALON carregada com Co^{2+} (Takara Bio®). O fluxo geral de purificação da proteína com etiqueta 6xHis está representado na Figura 11. A resina foi equilibrada com 50 mM Tris-HCl (pH 7,5 para *FvCut1* e *FvCut2* e pH 8,5 para *FvCut3*). Foi feita a lavagem da coluna com tampão e as cutinases foram eluídas da resina com um gradiente linear de imidazol (0-500 mM). Uma segunda etapa de purificação foi realizada por SEC usando um Superdex 200 16/600 HiLoad (GE Healthcare - 124 mL) no sistema AKTA automatizado equipado com detector de UV (280 nm). A coluna SEC foi equilibrada com 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 para *FvCut1* e *FvCut2*, e 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 para *FvCut3*. As

frações contendo a proteína alvo foram concentradas usando um Vivaspin Turbo 15 3K (Sartorius, Gottingen, Alemanha). A concentração de proteína foi estimada no fluorômetro Qubit 3.0 (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) com base na absorbância de UV a 280 nm. A pureza das cutinases foi determinada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE).

Figura 11: Fluxo de trabalho geral para purificação de proteína com etiqueta 6xHis por IMAC usando resina TALON carregada com Co^{2+} . A coluna é carregada com a fração solúvel de cutinase, em seguida são realizadas etapas de lavagem para eliminar compostos indesejáveis, inclusive outras proteínas, por fim a cutinase marcada com a etiqueta 6xHis é eluída em tampão com imidazol.



Fonte: A autora.

3.2.5 Atividade enzimática

A atividade da esterase foi medida à temperatura ambiente usando p-NPB como substrato de acordo com (GIGLI et al., 2019). A reação foi realizada com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,7), p-NPB 1 mM e 10 ng de proteína em um volume final de 200 μ L. Após 2 minutos

de reação, a enzima foi inativada em nitrogênio líquido (CAUSSETTE et al., 1998) e foi medida a absorvância a 405 nm por espectrofotometria em placa de 96 poços. Nas amostras de controle foram adicionados 4 µL do tampão ao invés da solução enzimática e este valor foi descontado das condições testadas. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de substrato por minuto nas condições testadas.

3.2.6 Caracterização das cutinases

3.2.6.1 Efeitos da temperatura e do pH na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado incubando a reação em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,7) e avaliando as temperaturas de 10 a 65 °C. O efeito do pH foi determinado incubando a reação com a temperatura ideal em tampão HCl-glicina 50 mM (pH 2,0 - 3,0), tampão acetato de sódio (pH 3,0 - 6,0), tampão fosfato de sódio (pH 6,0 - 7,0), Tris-HCl tampão (pH 7,0 - 9,0) e tampão NaOH-glicina (pH 9,0 - 10,0). Para definir os efeitos da temperatura e do pH na atividade enzimática, a atividade máxima obtida foi definida como 100%.

3.2.6.2 Efeitos de solventes orgânicos, íons metálicos, inibidores e detergentes na atividade enzimática

O efeito dos solventes orgânicos foi investigado adicionando separadamente 15 e 30% (v/v) de metanol, etanol, isopropanol, butanol, acetona e dimetil sulfóxido (DMSO) na reação. O efeito de íons metálicos, inibidores e detergentes no sistema de reação também foi avaliado separadamente. Os íons, inibidores e detergentes usados foram (1 ou 5 mM) MgSO₄, MnSO₄, CaCl₂, CoCl₂, NaCl, KCl, NiSO₄, ZnSO₄, Tween 80, Triton-X100, dodecil sulfato de sódio (SDS), PMSF, e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As reações foram realizadas em condições ótimas de temperatura e pH. A atividade da amostra controle, sem aditivos, foi considerada 100%.

3.2.6.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os ensaios enzimáticos para determinação dos parâmetros bioquímicos das cutinases (K_m e V_{max}) foram realizados com diferentes concentrações de p-NPB (0,03-2,50 mM) sob temperatura e pH ótimos previamente determinados. Com base nas medidas de absorbância, os valores aparentes de K_m e V_{max} foram calculados usando gráficos de Lineweaver-Burk após medir as velocidades iniciais de reação em várias concentrações de substrato. K_{cat} e K_{cat}/K_m também foram calculados.

3.2.7 Modelagem por homologia

Os modelos enzimáticos tridimensionais foram estabelecidos usando o servidor online SWISS MODEL (sem as sequências de peptídeo sinal e tag) (BERTONI et al., 2017; BIENERT et al., 2017; GUEX; PEITSCH; SCHWEDE, 2009; WATERHOUSE et al., 2018). As estruturas de referência (templates) foram selecionadas de acordo com a identidade de sequência com *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*. Os templates com maior identidade de sequência foram utilizados. A referência para *FvCut1* foi a cutinase de *H. insolens* (PDB id: 4OYY.1.A), para *FvCut2* foi a cutinase de *F. solani* (PDB id: 1XZM.1.A) e para *FvCut3* foi a cutinase de *F. oxysporum* (PDB: 5AJH.2.A). As visualizações dos arquivos PDB gerados foram realizadas usando o software PyMOL™ viewer (2.5) para fins acadêmicos.

3.2.8 Análises de hidrólise de PET

FvCut1, *FvCut2* e *FvCut3* foram testados quanto à capacidade de degradação do PET. As garrafas PET pós-consumo foram moídas em moinho de martelos até um tamanho de partícula inferior a 0,5 mm. Os testes de hidrólise foram realizados em triplicata por 96 h, 300 rpm, sob 2 condições de temperatura diferentes (30 e 50 °C). Em cada reação foram adicionados 10 mg de PET, 10 µg da enzima e tampão Tris-HCl pH 8 até um volume final de 250 µL. Uma reação de controle foi preparada usando 10 mg de PET e tampão Tris-HCl pH 8 para um volume final de 250 µL. Após a hidrólise, as amostras foram preparadas para detecção UV com HPLC

(ARNLING BÅÅTH; BORCH; WESTH, 2020). O HPLC foi um Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific) com um detector de arranjo de diodos, equipado com uma coluna Acclaim™ 120 C18 (4,6 x 150 mm) empacotada com partículas C18, com 3 µm de diâmetro. O volume de injeção foi de 10 µL e as amostras foram eluídas com acetonitrila durante 25 min a uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min e 25 °C. TPA e BHET foram usados como padrão para determinar o tempo de retenção e identificar a presença desses monômeros de PET nas amostras hidrolisadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este tópico está dividido em duas seções principais. A primeira envolve a otimização da produção de cutinase por *F. verticillioides* selvagem via FES e testes de escalonamento. A segunda seção abrange a descoberta dos genes de cutinases no genoma de *F. verticillioides*, a produção heteróloga dessas enzimas em sistema procarioto, análises estruturais in silico, caracterização funcional e testes de hidrólise de PET.

4.1 PRODUÇÃO DE CUTINASE PELO MICRORGANISMO NATIVO

Nesta seção são apresentados os resultados de otimização da produção de cutinase via FES. A enzima produzida nessa etapa foi obtida através do microrganismo nativo. Não foi aplicada nenhuma etapa de purificação de proteína. Todas as atividades enzimáticas foram obtidas a partir do extrato bruto que pode conter mais de uma cutinase, além de outras enzimas que podem ser produzidas e secretadas pelo fungo. Nos tópicos a seguir serão abordadas as etapas de screening de variáveis e scale up para produção de cutinase por FES. Os resultados obtidos nessa etapa foram publicados nos Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos (XXIII SINAIFERM, XIV SHEB, ENZITEC) em 2022, com o título “Optimization of solid-state fermentation for the production of cutinase from *Fusarium verticillioides*”.

4.1.1 *Screening* de variáveis para o processo de fermentação

Inicialmente foi realizado um processo de screening das principais variáveis que poderiam influenciar na produção de cutinase via FES, utilizando o microrganismo selvagem. Em um estudo anterior a produção de cutinase via FES foi realizada utilizando um único substrato sólido (farelo de arroz) (DE OLIVEIRA et al., 2019a). Nessas condições percebeu-se algumas limitações no crescimento do fungo. Portanto, optou-se por avaliar a utilização da casca de arroz na composição do meio sólido, com o intuito de tornar o meio mais poroso e, conseqüentemente, melhorar a produção de cutinase pelo fungo selvagem. O screening inicial das variáveis foi realizado através de um planejamento experimental PB12. A Tabela 8 apresenta as variáveis avaliadas e os resultados em termos de atividade enzimática obtidos no

PB12. Observa-se que os melhores resultados foram para os ensaios 6 e 10, com atividades de 4,76 U/g_{substrato} e 4,85 U/g_{substrato}, respectivamente. O tempo de fermentação para cada ensaio foi de 10 dias (DE OLIVEIRA et al., 2019a).

Os ensaios 6 e 10 diferem quanto a densidade de inóculo e a presença de solução de micronutrientes. Essas duas variáveis não foram significativas, conforme os efeitos de variáveis calculados e apresentados na Tabela 8. Já as variáveis proporção de farelo de arroz e casca de arroz, temperatura e umidade apresentam influência significativa na atividade enzimática ($p < 0,05$). Os efeitos de todas as variáveis sobre a atividade enzimática apresentam-se na Tabela 9.

Tabela 8: Matriz do planejamento Plackett-Burmann para seleção de variáveis significativas no processo de fermentação. Planejamento consistiu em 12 experimentos variando os valores de cada variável em torno dos pontos centrais. Foram realizados cinco ensaios com os valores médios das variáveis (pontos centrais). Todos os valores reais e codificados utilizados para os cálculos estatísticos são fornecidos na tabela, assim como os resultados em termos de atividade enzimática.

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	X6
1	75,0 (+1)	10,0 (-1)	5,0 (+1)	25,0 (-1)	40,0 (-1)	3,06
2	75,0 (+1)	20,0 (+1)	0,0 (-1)	35,0 (+1)	40,0 (-1)	1,45
3	25,0 (-1)	20,0 (+1)	5,0 (+1)	25,0 (-1)	80,0 (+1)	2,82
4	75,0 (+1)	10,0 (-1)	5,0 (+1)	35,0 (+1)	40,0 (-1)	1,87
5	75,0 (+1)	20,0 (+1)	0,0 (-1)	35,0 (+1)	80,0 (+1)	2,23
6	75,0 (+1)	20,0 (+1)	5,0 (+1)	25,0 (-1)	80,0 (+1)	4,76
7	25,0 (-1)	20,0 (+1)	5,0 (+1)	35,0 (+1)	40,0 (-1)	0,96
8	25,0 (-1)	10,0 (-1)	5,0 (+1)	35,0 (+1)	80,0 (+1)	2,10
9	25,0 (-1)	10,0 (-1)	0,0 (-1)	35,0 (+1)	80,0 (+1)	2,17
10	75,0 (+1)	10,0 (-1)	0,0 (-1)	25,0 (-1)	80,0 (+1)	4,85
11	25,0 (-1)	20,0 (+1)	0,0 (-1)	25,0 (-1)	40,0 (-1)	1,17
12	25,0 (-1)	10,0 (-1)	0,0 (-1)	25,0 (-1)	40,0 (-1)	1,54
13	50,0 (0)	15,0 (0)	2,5 (0)	30,0 (0)	60,0 (0)	4,00
14	50,0 (0)	15,0 (0)	2,5 (0)	30,0 (0)	60,0 (0)	3,52
15	50,0 (0)	15,0 (0)	2,5 (0)	30,0 (0)	60,0 (0)	3,88
16	50,0 (0)	15,0 (0)	2,5 (0)	30,0 (0)	60,0 (0)	4,14
17	50,0 (0)	15,0 (0)	2,5 (0)	30,0 (0)	60,0 (0)	3,74

Legenda: X1 Porcentagem de farelo de arroz (%); X2 Densidade de inóculo (%); X3 Solução de micronutrientes (%); X4 Temperatura (°C); X5 Umidade (%); X6 Atividade (U/g_{substrato}).

Tabela 9: Efeitos individual e médio das variáveis analisadas no planejamento Plackett-Burman sobre a atividade de cutinase produzida via FES.

Variáveis	Efeitos	Erro padrão	P-Valor
Média	2,84	0,22	< 0,0001
Proporção farelo de arroz/ casca de arroz	1,24	0,52	0,0348
Densidade de inóculo	-0,37	0,52	0,4890
Solução de micronutrientes	0,36	0,52	0,5028
Temperatura	-1,24	0,52	0,0358
Umidade	1,48	0,52	0,0155

A influência da temperatura e umidade já haviam sido avaliadas em trabalho anterior (DE OLIVEIRA et al., 2019a), uma vez que são variáveis críticas nos processos de FES (BELLON-MAUREL; ORLIAC; CHRISTEN, 2003; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Nesse outro estudo foi utilizado apenas o farelo de arroz como substrato e observou-se que a umidade teve um efeito negativo e prejudicou o crescimento do microrganismo, provavelmente, devido à baixa distribuição de oxigênio no meio (DE OLIVEIRA et al., 2019a). Esse fato provavelmente ocorreu devido à porosidade baixa do meio sólido. A porosidade pode ser influenciada pelo teor de umidade, bem como pelo tamanho de partículas (SCHMIDELL et al., 2001). Diante disso, no presente estudo, optou-se por modificar a composição do substrato sólido, adicionando casca de arroz juntamente com o farelo de arroz, a fim de melhorar a porosidade do meio. Adicionando a casca de arroz ao meio, a umidade inicial passou a ter efeito positivo (Tabela 9). No entanto, a atividade enzimática (Tabela 8) obtida com a adição da casca de arroz foi menor (atividade máxima 4,85 U/g_{substrato}) se comparada aos resultados obtidos por (DE OLIVEIRA et al., 2019a) (atividade máxima 13,45 U/g_{substrato}). A temperatura apresentou efeito negativo nos dois casos.

Com base nos resultados anteriores, um novo planejamento foi elaborado para melhor avaliação das variáveis significativas (relação farelo/ casca de arroz, temperatura e umidade). As respostas do DCCR, em termos de atividade enzimática, são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10: Matriz do planejamento DCCR para otimização das variáveis significativas no processo de fermentação. Planejamento consistiu na avaliação de três variáveis independentes (temperatura, umidade e a porcentagem de farelo de arroz). Todos os valores reais e codificados

das variáveis, utilizados para os cálculos estatísticos, são fornecidos na tabela, assim como os resultados em termos de atividade enzimática.

Ensaio	Porcentagem de farelo de arroz (%)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Atividade (U/g_{substrato})
1	60,0 (-1)	22,4 (-1)	60,0 (-1)	2,77
2	80,0 (+1)	22,4 (-1)	60,0 (-1)	3,01
3	60,0 (-1)	29,6 (+1)	60,0 (-1)	3,17
4	80,0 (+1)	29,6 (+1)	60,0 (-1)	3,44
5	60,0 (-1)	22,4 (-1)	80,0 (+1)	3,29
6	80,0 (+1)	22,4 (-1)	80,0 (+1)	3,06
7	60,0 (-1)	29,6 (+1)	80,0 (+1)	4,61
8	80,0 (+1)	29,6 (+1)	80,0 (+1)	4,09
9	53,2 (-1,68)	26,0 (0)	70,0 (0)	3,53
10	86,8 (+1,68)	26,0 (0)	70,0 (0)	3,36
11	70,0 (0)	20,0 (-1,68)	70,0 (0)	1,76
12	70,0 (0)	32,0 (+1,68)	70,0 (0)	1,53
13	70,0 (0)	26,0 (0)	53,2 (-1,68)	3,13
14	70,0 (0)	26,0 (0)	86,8 (+1,68)	5,09
15	70,0 (0)	26,0 (0)	70,0 (0)	4,40
16	70,0 (0)	26,0 (0)	70,0 (0)	4,75
17	70,0 (0)	26,0 (0)	70,0 (0)	4,54
18	70,0 (0)	26,0 (0)	70,0 (0)	4,47

A análise dos resultados demonstra que a maior atividade de cutinase (5,09 U/g_{substrato}) ocorreu no ensaio 14, cujas condições foram: meio contendo 70% de farelo de arroz, temperatura de 26 °C e umidade de 86,8%. A temperatura é semelhante a utilizada em outros processos fermentativos (CHAUDHARI; SINGHAL, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2019a; PIO; MACEDO, 2008). É percebida uma diferença no teor de umidade inicial do meio na condição otimizada do presente estudo em relação ao estudo prévio (DE OLIVEIRA et al., 2019a). Os dados anteriores indicaram melhor atividade com umidade inicial de 50%. As diferenças encontradas no presente trabalho podem estar relacionadas a adição do substrato casca de arroz. Esse substrato adicional aumentou a porosidade do meio e possivelmente absorveu mais umidade em comparação ao farelo de arroz puro. Conforme (SOARES JÚNIOR et al., 2009), materiais com alta porcentagem de fibras em sua composição apresentam maior capacidade de absorção de água. Isso justificaria o atual resultado, já que a casca de arroz apresenta quase três vezes mais fibras em sua composição do que o farelo de arroz (Tabela 11).

Tabela 11: Composição centesimal dos substratos farelo e casca de arroz, utilizados na FES para produção de cutinase.

Análise	Casca de arroz (g/100g)	Farelo de arroz (g/100g)
Carboidratos totais	10,20	25,90
Gordura (lipídeos)	< 0,10	19,84
Proteína	1,56	12,33
Resíduo mineral fixo	17,40	10,84
Umidade e voláteis	8,62	8,50
Fibra alimentar total	61,70	22,6

Além das diferenças notáveis no parâmetro umidade inicial do meio, também se observou que a atividade de cutinase foi menor quando o meio sólido continha uma mistura de substratos (casca de arroz e farelo de arroz) em comparação ao processo fermentação contendo farelo de arroz puro. A atividade máxima obtida para a mistura de substratos foi de 5,09 U/g_{substrato} (Tabela 10), enquanto no estudo anterior, após otimização, a atividade foi de 13,24 U/g_{substrato}. Essa queda na atividade de cutinase aparentemente também está relacionada à mistura de substratos utilizada. As análises de composição centesimal (Tabela 11) indicam que a casca de arroz é composta por uma quantidade menor de carboidrato, gordura e proteína se relação ao farelo de arroz.

Conforme BORZANI et al. (2001) os fungos, por serem microrganismos heterotróficos, precisam de uma fonte orgânica de carbono para seu desenvolvimento. A fonte mais comum é o carboidrato. Portanto o uso da casca de arroz (com menor teor de carboidrato) na formulação do substrato para fermentação fornece uma quantidade menos desse nutriente e pode estar relacionada a diminuição da atividade de cutinase. Outros fatores importantes para o crescimento microbiano são compostos como aminoácidos e ácidos graxos (BORZANI et al., 2001). Os aminoácidos podem ser encontrados em proteínas, enquanto os ácidos graxos podem ser obtidos a partir de gorduras. Os teores desses compostos também são mais baixos na casca de arroz em relação ao farelo de arroz. Além disso, a casca de arroz possui lignina em sua composição (JULIANO; TUAÑO, 2019). A lignina é uma molécula complexa que confere rigidez a camada protetora da planta e atua como barreira física contra o ataque dos microrganismos sobre a parede celular vegetal. Essa molécula é capaz de retardar, ou mesmo impedir completamente a atuação microbiana sobre o substrato (DE CASTRO; PEREIRA, 2010). Esse conjunto de fatores pode estar relacionado ao decréscimo nos valores de atividade

de cutinase no presente estudo.

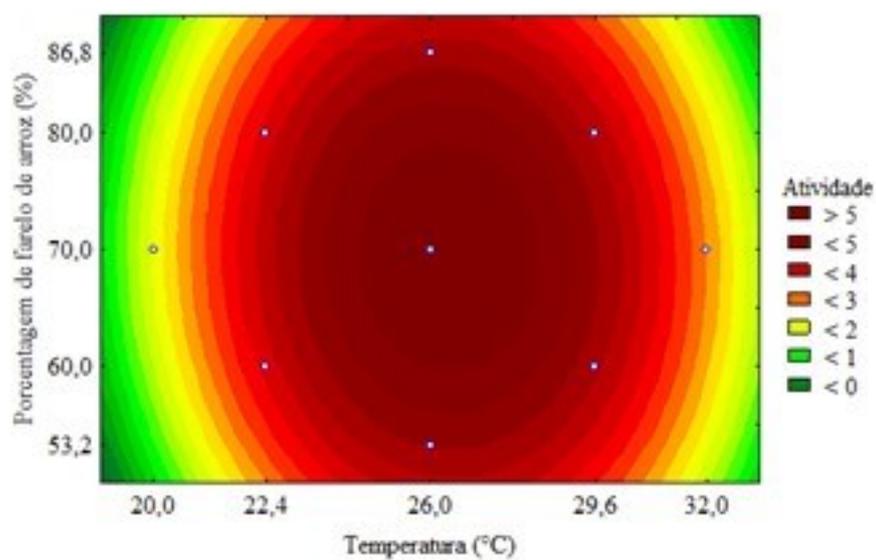
Apesar dos menores valores de atividade enzimática, buscou-se compreender os efeitos individuais das variáveis otimizadas, bem como as interações desses efeitos sobre a atividade de cutinase. Os dados da Tabela 10 foram utilizados para calcular os efeitos lineares, quadráticos e interações entre variáveis, que são apresentados na Tabela 12. Os resultados indicam que a temperatura quadrática e umidade linear, juntamente com a média das variáveis foram significantes para a produção de cutinase. Com base nesses dados foi gerada a superfície de contorno para atividade da cutinase (Figura 12).

Tabela 12: Efeitos lineares (L), quadráticos (Q) e de interação entre variáveis do DCCR na produção enzimática. ($R^2 = 0,89957$).

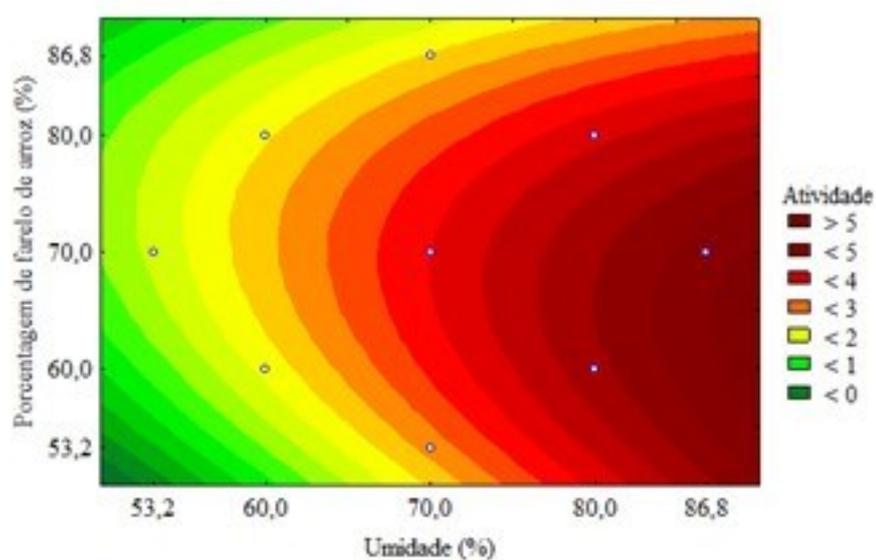
Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	P-Valor
Média	4,52	0,23	<0,0001
Proporção farelo de arroz/ casca de arroz(L)	-0,08	0,25	0,7657
Proporção farelo de arroz/ casca de arroz(Q)	-0,57	0,26	0,0557
Temperatura (L)	0,41	0,26	0,1346
Temperatura (Q)	-1,85	0,26	<0,0001
Umidade (L)	0,87	0,25	0,0077
Umidade (Q)	-0,11	0,26	0,6858
Interação entre Proporção farelo de arroz/ casca de arroz (L) e Temperatura (L)	-0,06	0,32	0,8457
Interação entre proporção farelo de arroz/ casca de arroz (L) e Umidade (L)	-0,31	0,32	0,3587
Interação entre Temperatura (L) e Umidade (L)	0,38	0,32	0,2694

Figura 12: Superfície de contorno para atividade de cutinase otimizada através do planejamento DCCR para três variáveis independentes (umidade, temperatura, composição do meio). A) Região de atividade ótima (vermelho escuro) quando a umidade foi fixada em 86,8%. B) Região de atividade ótima (vermelho escuro) quando a temperatura foi fixada em 26 °C. C) Região de atividade ótima (vermelho escuro) quando a composição do meio foi fixada em 70% farelo de arroz e 30% casca de arroz.

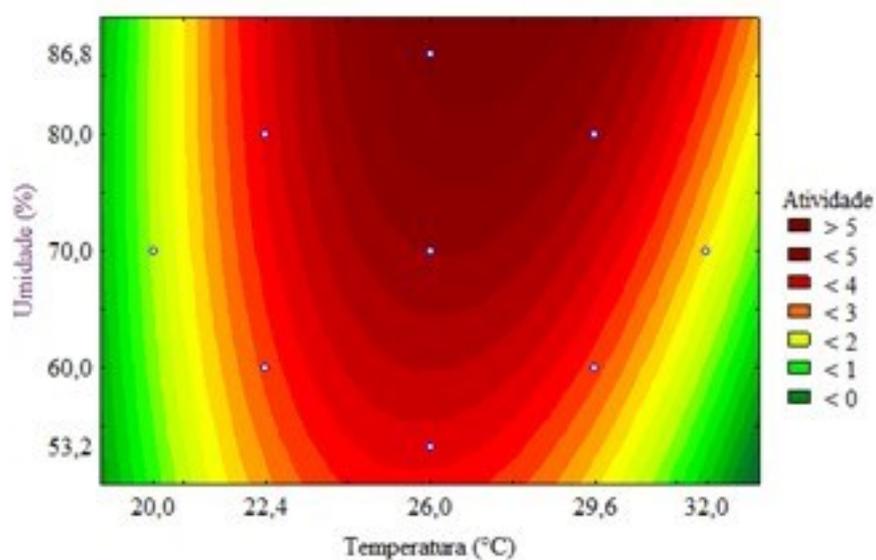
A.



B.

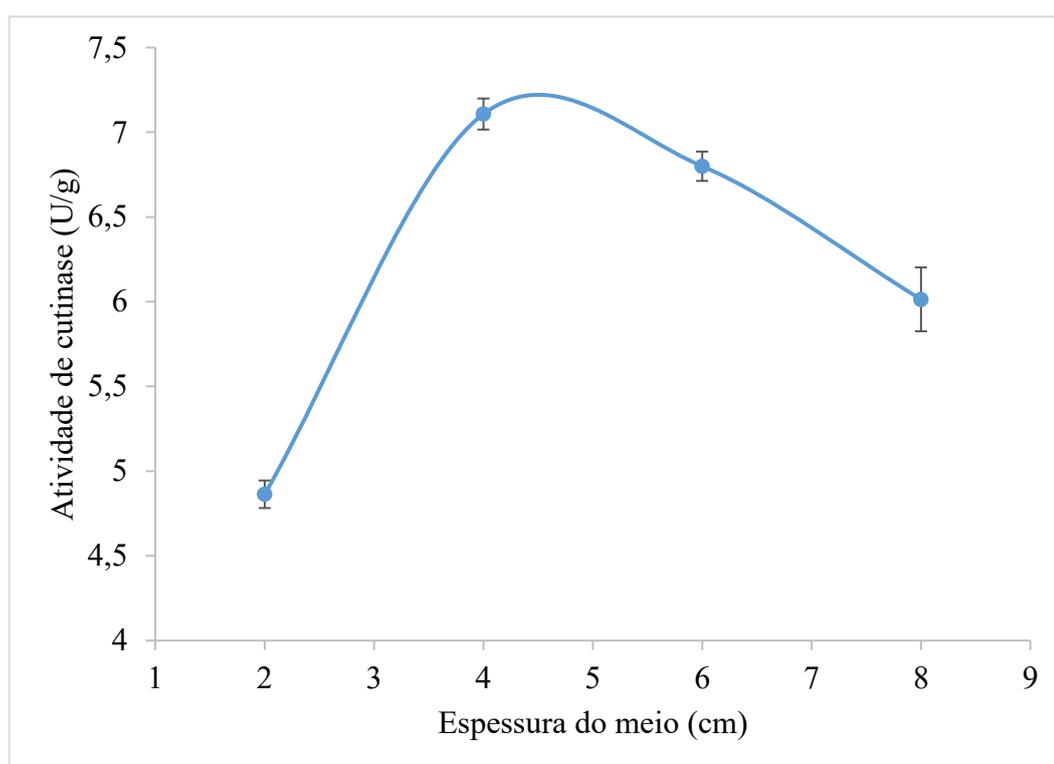


C.



Além das variáveis otimizadas via planejamento DCCR, outro parâmetro de grande importância no processo estático de fermentação em estados sólido é a espessura da camada de substrato (DEMIR; TARI, 2016; STREDANSKY; CONTI, 1999), pois é uma variável relacionada ao teor de umidade durante a fermentação (DEMIR; TARI, 2016; ZHANG et al., 2013). Para investigar o efeito da espessura da camada de substrato na produção de cutinase por *F. verticillioides* foram realizados ensaios em frascos cilíndricos variando a espessura de meio seco de 2 a 8 cm. Os resultados são apresentados na Figura 13.

Figura 13: Efeito de diferentes espessuras do substrato na atividade de cutinase para processo de produção via FES em frascos cilíndricos.

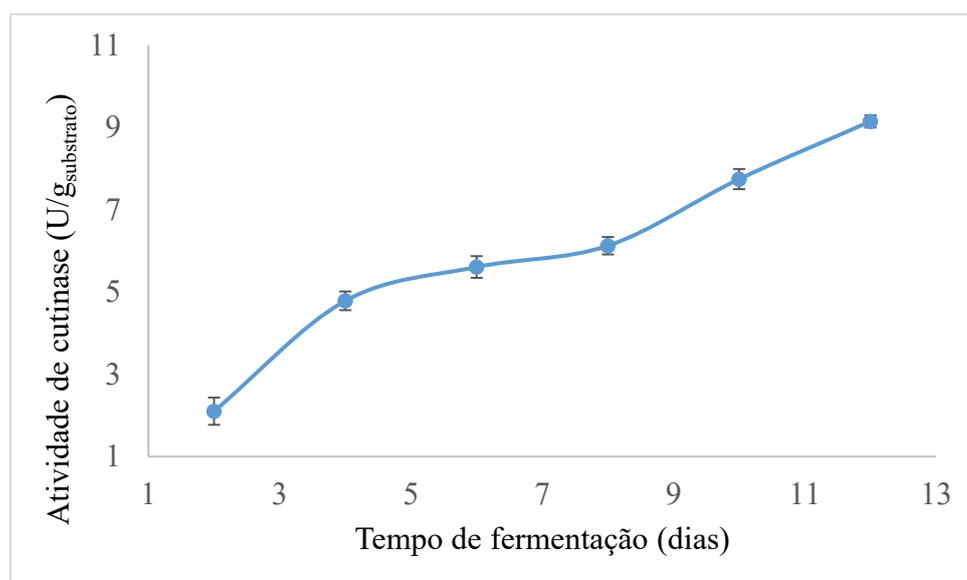


As melhores atividades de cutinase foram obtidas para espessuras de substrato de 4 e 6 cm; sendo que para a altura de meio de 6 cm foi possível observar uma queda leve na produção de cutinase. Esse resultado possivelmente está relacionado à quantidade de oxigênio disponível no meio. A espessura da camada de substrato é relacionada com a formação de gradientes de temperatura e oxigênio no leito (DEMIR; TARI, 2016). Para espessuras maiores a tendência é possuir uma quantidade menor de oxigênio no meio (STREDANSKY; CONTI, 1999). Essa característica pode influenciar as condições de transferência de calor e massa. O processo de FES envolve o transporte de oxigênio e água para a biomassa microbiana, dessa forma é gerado

calor metabólico devido à respiração e ao transporte de calor e dióxido de carbono do interior do substrato para a fase gasosa (DEMIR; TARI, 2016). A resistência a esses processos de transferência leva a formação de gradientes de concentração e temperatura, que podem ser minimizados a partir do parâmetro de espessura do leito (DEMIR; TARI, 2016).

Além da espessura do meio, a produção de cutinase também foi avaliada em função do tempo de fermentação. Um aumento relevante na produção da enzima foi observado em todos os pontos amostrados. A atividade de cutinase foi de 7,74 e 9,14 U/g_{substrato}, em 10 e 12 dias de fermentação, respectivamente (Figura 13). Esses tempos de fermentação podem variar e dependem de diversos parâmetros de processo. Na literatura encontram-se dados de produção máxima de cutinase por *F. oxysporum* em 72 horas (FRAGA; CARVALHO; MACEDO, 2012), por outro lado, tempos de 10 dias de cultivo também foram observados para produção dessa enzima pelo mesmo microrganismo (DEGANI, 2015). Da mesma forma, tempos de fermentação de 10 dias foram observados para produção de cutinase por *F. verticillioides* (DE OLIVEIRA et al., 2019). Neste estudo optou-se por utilizar 7 dias de fermentação para uma avaliação inicial de scale up. Esse tempo de fermentação é suficiente para observar o crescimento do microrganismo no meio, e permite uma comparação com a produção de cutinase em pequena escala durante o mesmo período.

Figura 14: Efeito de diferentes tempos de fermentação na atividade enzimática de cutinase via FES em frascos cilíndricos.



4.1.2 Escalonamento da produção de cutinase

A produção de cutinase foi avaliada em um biorreator para FES com capacidade para 750 g de substrato sólido seco, o qual possui um sistema de aeração forçada na parte inferior e permite a realização de análises com dois tipos de configurações de processo.

A primeira configuração consiste em um processo com agitação mecânica. No presente, estudo para essa configuração de biorreator utilizou-se os seguintes parâmetros de processo: umidade inicial de 80%, injeção de ar úmido no reator e agitação durante 5 minutos a cada 12 horas. O resultado obtido em termos de atividade enzimática foi de 0,20 U/g_{substrato}, valores inferiores aos alcançados em menor escala e sem agitação. Visualmente observou-se que ao final da fermentação o substrato apresentava um teor de umidade elevado e o microrganismo apresentou dificuldades para o crescimento. Realmente o excesso de água pode diminuir o rendimento da esporulação, pois os poros do meio são ocupados pela água, reduzindo os espaços livres para o desenvolvimento de formas de reprodução fúngica (QUIROZ et al., 2015). Diante disso, optou-se por realizar um ensaio com umidade inicial mais baixa (60%), intercalar a injeção de ar entre ar úmido e seco, ligando a agitação durante menos tempo (2 minutos) a cada 24 h. Esse ensaio resultou em uma atividade de 0,40 U/g_{substrato}. Observou-se novamente que o crescimento do microrganismo não foi semelhante ao crescimento em frascos. Possivelmente, a agitação mecânica não foi um fator positivo para produção de cutinase por *F. verticillioides* via FES. Condições de agitação contínua de meio sólido usualmente resultam em quebra da região responsável pela reprodução do fungo, levando a rendimentos de esporulação inferiores aos obtidos em meios sólidos sem agitação (QUIROZ et al., 2015). Nesse caso, aparentemente, a agitação intermitente já foi capaz de limitar o crescimento do microrganismo. Sendo assim optou-se por analisar outra configuração de biorreator, desta vez sem agitação.

A segunda configuração consiste em um reator de leito fixo com injeção de ar na parte inferior. O primeiro ensaio foi realizado em condição de umidade inicial de 80% e injeção de ar úmido durante os 7 dias de fermentação. Nessa condição obteve-se uma atividade de cutinase de 1,29 U/g_{substrato}, acima do valor máximo encontrado para o reator com agitação mecânica (0,40 U/g_{substrato}). Um segundo ensaio foi feito em condição de umidade inicial de 60% e intercalando a injeção de ar seco e úmido a cada 24 horas, que resultou em uma atividade de 1,02 U/g_{substrato}. Esses resultados sugerem que a produção de cutinase por *Fusarium verticillioides* via FES, utilizando casca de arroz e farelo de arroz, é mais efetiva quando se

utiliza o reator de leito fixo. A injeção intercalada de ar seco e úmido juntamente com a condição de umidade inicial parece exercer uma pequena influência na produção de cutinase.

Os resultados encontrados para o biorreator de leito fixo foram visivelmente melhores em relação àqueles obtidos para o reator com agitação mecânica. As diferenças na atividade de cutinase encontradas na literatura (DE OLIVEIRA et al., 2019) e os obtidos no presente estudo parecem estar ligados à adição do substrato casca de arroz e ao aumento na escala de produção. A fermentação no biorreator em maior escala difere, em alguns aspectos, da fermentação realizada em frascos menores, principalmente no que se refere ao aumento da área da superfície de contato do meio de fermentação com o ar. Isso significa dizer que o fungo é exposto a mais oxigênio, o que pode resultar em diferença na síntese de metabólitos (DEMIR; TARI, 2016).

Outras estratégias de aumento de escala para produção de cutinase podem ser estudadas futuramente, incluindo novas configurações de reator. Também é possível avaliar diferentes parâmetros do processo visando aumentar a produção da enzima. Um estudo mais aprofundado sobre a variável aeração forçada, por exemplo, pode contribuir na remoção de calor do processo e melhorar o desempenho da FES (DEMIR; TARI, 2016; RUIZ et al., 2012). Além disso, é interessante avaliar a umidade relativa do meio durante o processo. Estudos anteriores mostram que esse parâmetro também desempenha um papel importante na FES, auxiliando no controle da umidade do meio e no rendimento do produto (DEMIR; TARI, 2016; MADEIRA; MACEDO; MACEDO, 2011). Para realização de um estudo mais aprofundado dessas variáveis a aplicação de biorreatores miniaturizados com controle da umidade relativa e aeração pode ser uma alternativa.

4.2 PRODUÇÃO DE CUTINASE RECOMBINANTE

Esta etapa da pesquisa resultou no artigo intitulado “Functional characterization and structural insights of three cutinases from the ascomycete *Fusarium verticillioides*”, que foi submetido a revista *Process Biochemistry* em maio de 2023.

Diante das limitações de produção da enzima pelo microrganismo selvagem utilizando FES, nesta etapa as cutinases de *F. verticillioides* foram produzidas por expressão heteróloga e estudadas individualmente. As enzimas foram selecionadas a partir da análise das sequências de cutinases presentes no genoma de *F. verticillioides*. Um sistema de expressão procaríoto foi selecionado para estudos iniciais de caracterização das enzimas. As três cutinases selecionadas

foram expressas e caracterizadas funcionalmente e estruturalmente pela primeira vez. O sistema procarioto foi escolhido devido a sua simplicidade e por apresentar ferramentas genéticas bem descritas. Além disso, usualmente os estudos iniciais de expressão de proteínas são realizados nesse tipo de sistema. Nos tópicos a seguir são apresentados os resultados da produção e caracterização das cutinases recombinantes.

4.2.1 Análise das sequências e otimização de codon dos três genes de cutinases de *Fusarium verticillioides*

Os genes que codificam três cutinases de *F. verticillioides*, *FvCut1* (FVEG_12346), *FvCut2* (FVEG_03395) e *FvCut3* (FVEG_13638) foram analisados revelando a presença do domínio conservado da cutinase (pfam01083). A região codificadora do gene *FvCut1* tinha 696 pb, codificando 232 aminoácidos. O gene *FvCut2* tem 702 pb que codificam 234 aminoácidos. *FvCut3* possui uma região codificante de 690 pb, codificando 230 aminoácidos. Todos os três genes contêm um peptídeo sinal de 16 aminoácidos previsto na região N-terminal. *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* têm duas ligações dissulfeto previstas e não têm locais de N-glicosilação previstos. *FvCut1* e *FvCut3* têm 2 sítios de O-glicosilação previstos, e *FvCut2* tem 4 sítios de O-glicosilação previstos.

As sequências que codificam as proteínas foram otimizadas com base no uso de códons de *E. coli*, o peptídeo sinal nativo foi removido e um códon de parada foi adicionado no C-terminal. As sequências originais e otimizadas estão disponíveis no relatório de otimização de genes no ANEXO II. Os mapas dos vetores de expressão após inserção dos genes otimizados estão disponíveis nas Figuras 15, 16 e 17.

As proteínas recombinantes *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* têm uma massa molecular prevista de 21,81, 22,71 e 21,81 kDa, respectivamente. O pI teórico de *FvCut1* é 4,35, de *FvCut2* é 8,75 e de *FvCut3* é 7,82. As três proteínas foram expressas inicialmente em *E. coli* BL21 (DE3), porém a maior parte da proteína produzida nessa cepa era inativa. Para aumentar a quantidade de proteína funcional as enzimas foram expressas em *E. coli* ArcticExpress (DE3). A quantidade de proteína obtida na fração solúvel aumentou e as enzimas foram purificadas em duas etapas (IMAC e SEC). Análises SDS-PAGE das cutinases purificadas podem ser visualizadas nas Figuras 18 e 19.

Figura 15: Mapa do vetor de expressão pET28a contendo o gene de *FvCut1*.

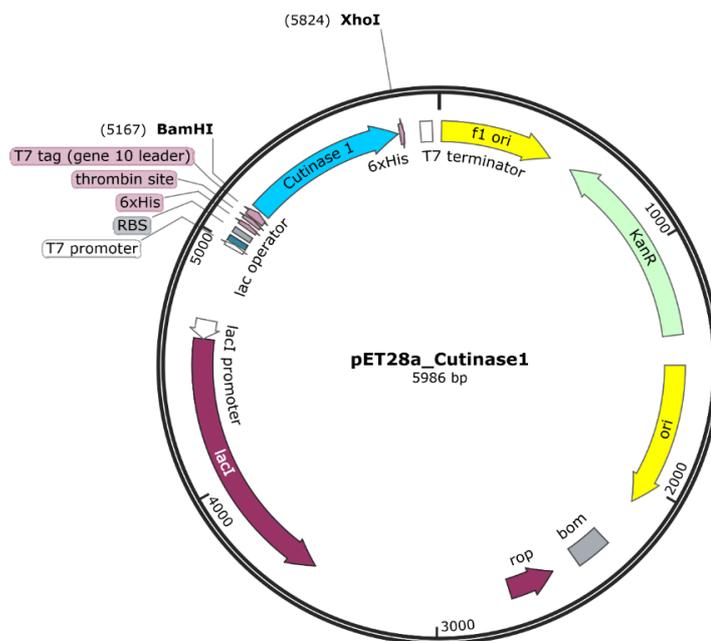


Figura 16: Mapa do vetor de expressão pET28a contendo o gene de *FvCut2*.

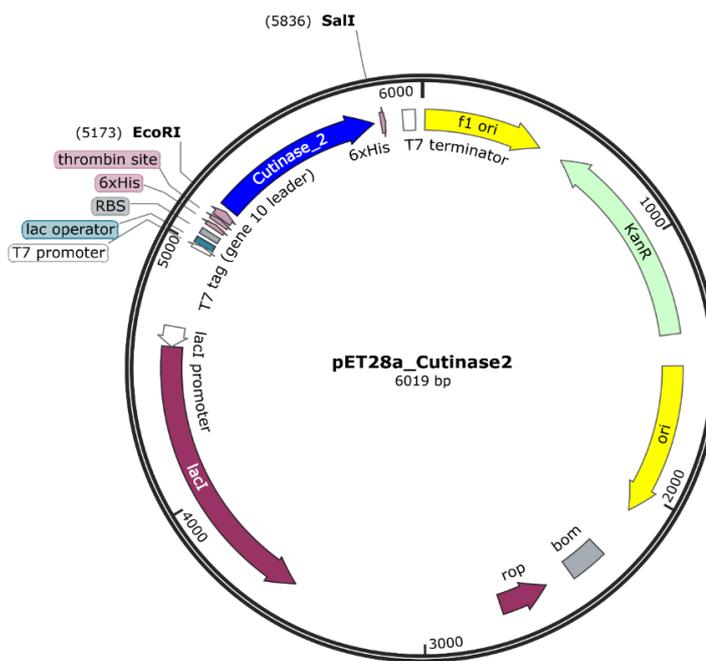


Figura 17: Mapa do vetor de expressão pET28a contendo o gene de *FvCut3*.

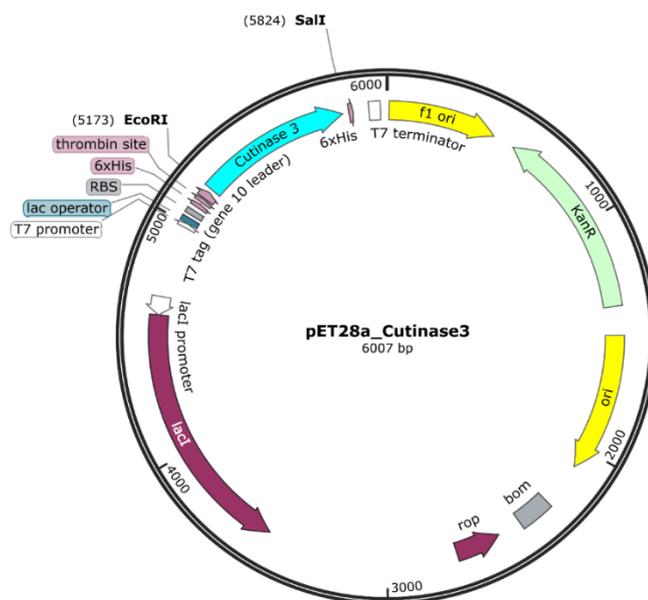


Figura 18: Análise de SDS-PAGE de *FvCut1*, *FvCut2*, e *FvCut3* após a primeira etapa de purificação por IMAC. A primeira coluna corresponde ao marcador molecular (kDa). O tamanho esperado das cutinases é aproximadamente 25 kDa. As colunas *FvCut1*, *FvCut2*, e *FvCut3* correspondem as amostras purificadas contendo as respectivas cutinases.

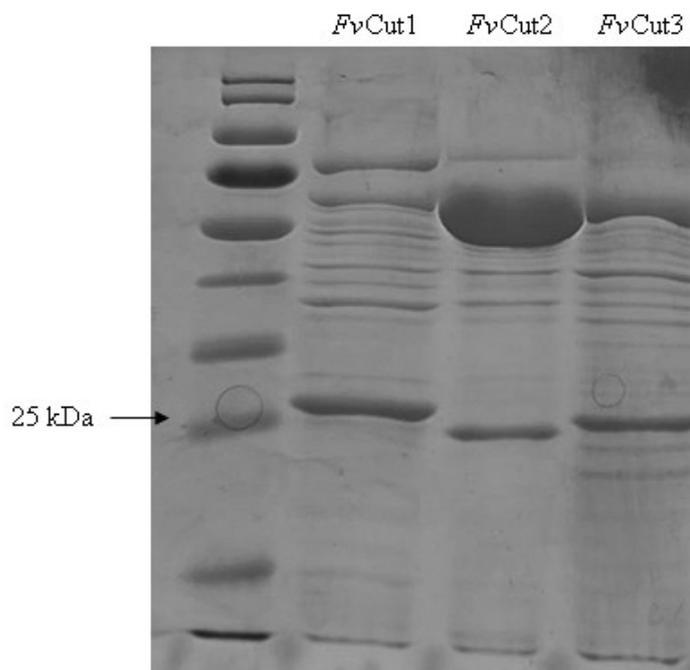
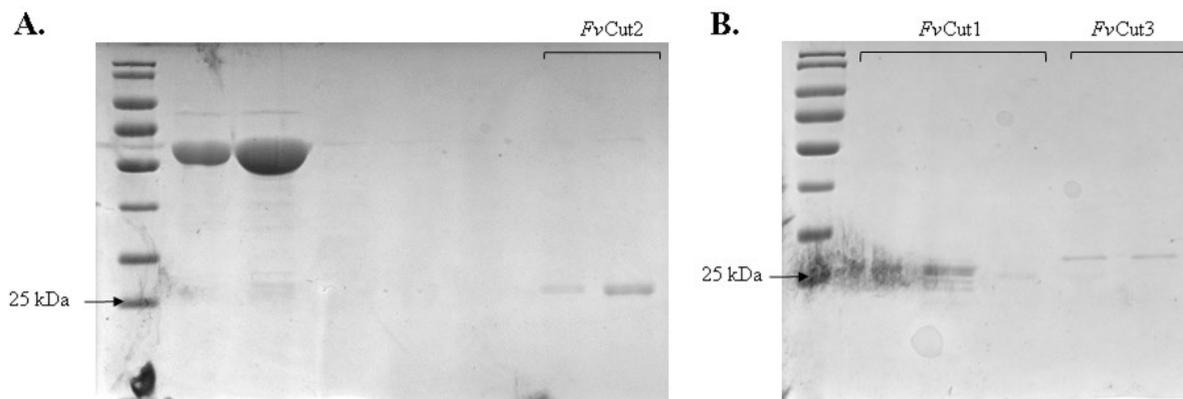


Figura 19: Análise de SDS-PAGE após segunda etapa de purificação por SEC de A) *FvCut2*, B) *FvCut1* e *FvCut3*. A primeira coluna corresponde ao marcador molecular (kDa). O tamanho esperado das cutinases é aproximadamente 25 kDa.



4.2.2 Análise filogenética das cutinases

FvCut1, *FvCut2* e *FvCut3* estão localizados no mesmo clado na árvore filogenética (Figura 19), juntamente com as cutinases de *H. insolens*, *F. solani* e *A. oryzae*. *FvCut1* é filogeneticamente mais distante de *FvCut2* e *FvCut3*. Cutinases de *H. insolens*, *F. solani*, *A. oryzae* já demonstraram atividade de hidrólise em polímeros sintéticos (ARAÚJO et al., 2007; CASTRO et al., 2019; RONKVIST et al., 2009; ZHIQIANG et al., 2009). *FvCut2* e *FvCut3* são filogeneticamente mais próximos da cutinase de *F. solani*. Apesar da capacidade de hidrolisar substratos volumosos, como plásticos, as cutinases de *H. insolens*, *F. solani* e *A. oryzae* preferem substratos de cadeia curta. Estudos de caracterização dessas enzimas demonstram a preferência por ésteres de ácidos graxos com comprimentos de cadeia C2 a C6 (KAZENWADEL et al., 2012; NOVY et al., 2021; ZHIQIANG et al., 2009). A LC-cutinase é uma enzima que apresenta alta capacidade para hidrolisar polímeros sintéticos, e na sua forma selvagem também tem maior afinidade por substratos de cadeia curta (C4) (SULAIMAN et al., 2012). Na árvore filogenética, a LC-cutinase forma um clado com as cutinases bacterianas, filogeneticamente distante das cutinases de *F. verticillioides* (Figura 20). A sequência de aminoácidos de LC-cutinase foi alinhada com as sequências das cutinases de *F. verticillioides*. A Figura 21 fornece o alinhamento de sequência dessas enzimas e destaca as porcentagens de identidade entre elas.

Figura 20: Análise filogenética de sequências de cutinase caracterizadas recuperadas do banco de dados CAZy, banco de dados Uniprot (dentro do grupo Sordariomycetes) e as três sequências previstas encontradas no genoma de *F. verticillioides* (banco de dados Ensembl Fungi). A análise de máxima verossimilhança foi realizada no modo “*a la carte*” para classificar as sequências de CE5 CDSs em acetil xilana esterases (clado vermelho) ou cutinases (clado roxo) e PETases (clado verde).

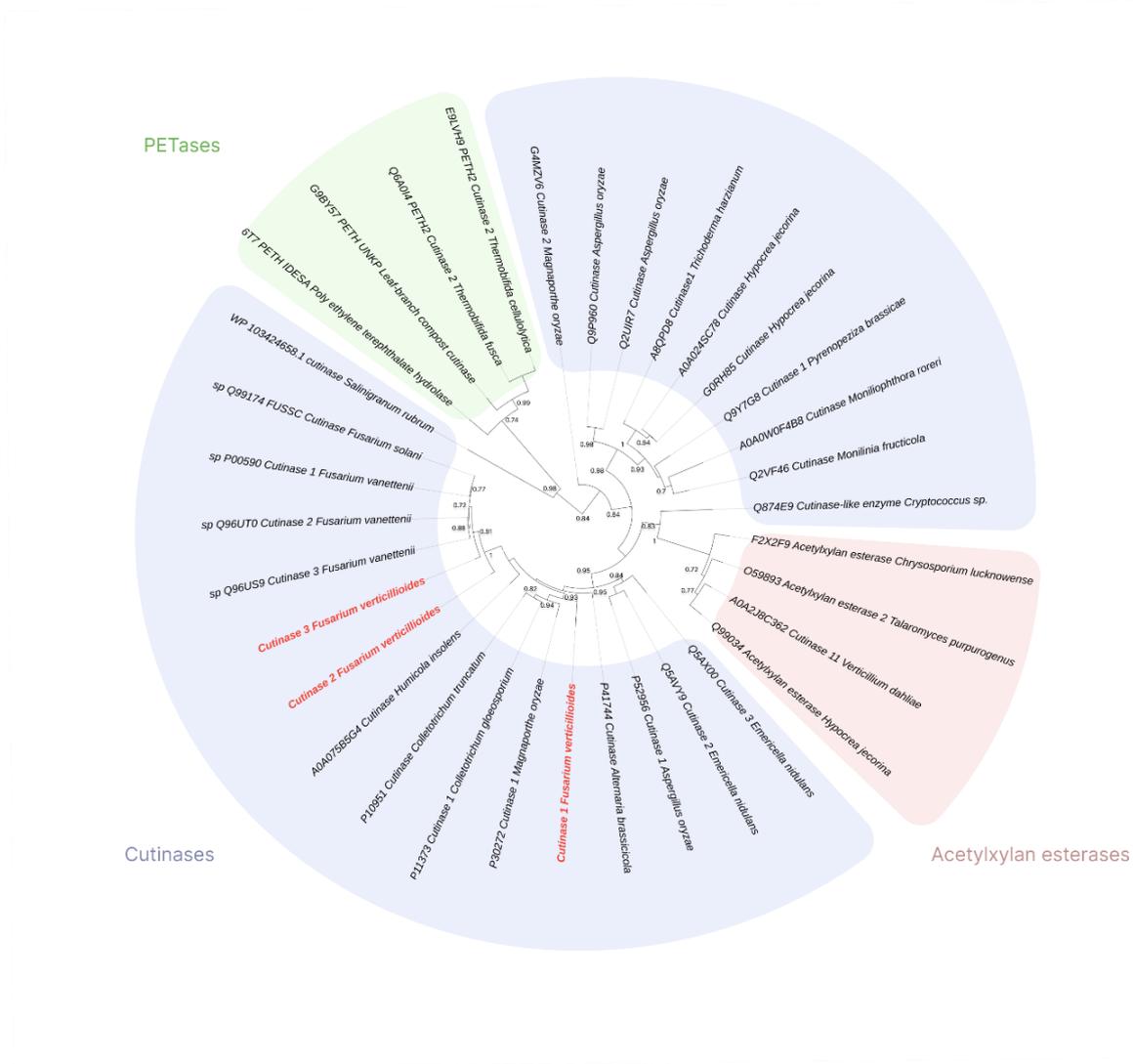


Figura 21: Alinhamento das sequências de aminoácidos das cutinases de *F. verticillioides* (*FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*) e LC-cutinase, conhecida pelo potencial para hidrólise de PET. Na parte inferior da figura são apresentados os percentuais de identidade das quatro enzimas

```

LC-cutinase  1 MDGVLWRVRTAALMAALLALAAWALVWASPSVEAQ-----SNPYQRGNPTRRSALTADGPF SVATYTVSRLSVSGFGGGV 75
FvCut2      1 .....FPTASSNKKRAVAQAQDVNLLLEARDLLNRNDIEDG.....DSSSCPPAI 43
FvCut1      1 .....LPTSSPLSEREVL-AEL-EKRQSGSITRDDLSN-G.....ASSACPPVI 41
FvCut3      1 .....LP.....AGQDA-AALEARQLGGSITRNDLAN-G.....NSGSCPVI 36

LC-cutinase  76 IYPTGTSLTFGG--IAMSPGYTA-----DASSLAWLGR-----RLASHGFVVLVINT-NSRFDY.....PDSR 131
FvCut2      44 LIYARGSTEPGNLGITVGPILAEAM--QLAIPDIWIQGVGGPYTADLAPNFLPEGTTDASIDEAKRLFQ MAYDKCPDTP 120
FvCut1      42 FIYARGSTELGNLGT-LGPRVASVLESNYGSNGVWIQGVGGAYRATLGDNALPRGTSSAAIREMIGLFNLANSKCP SAK 119
FvCut3      37 FIYARGSTEAGNLGT-LGPRVASKLEAKYGKNGVWIQGVGGAYRATLGDNALPRGTSSAAIREMLGHFN DANQKCPDAV 114

LC-cutinase  132 A.....SOLSAALNYLRTSSPSAVRRARLDANRLAVAGHSMGGGGTLRIAEQNPSLKAAVFLTPWHTDKTFNTSVPVLIVG 206
FvCut2      121 VVTAGYSQGTVVVGYALSELQIAVQNQ-----VVGA-----ALFGYTKNEQLGGRIPNYPTDKTKIFCLPTDLVCDG 187
FvCut1      120 IVAGGYSQGAALAAASIEDLSTSVRNK-----VVG-----VLFGYTKNLQNLGRIPNYPRERTL VFCNFGDLVCTG 186
FvCut3      115 LLAGGYSQGAALAAASVTDVDAIREK-----IAGV-----VLFGYTKNLQNRGKIPSYREDRTKVF CNTGDLVCTG 181

LC-cutinase  207 AEADTVAPVSQHAIPFYQNLPTSTPKVYVELDNASHFAPNSNNAASVYTI SWMKLWVDNDTRYRQFLCNVNDPALSDFR 286
FvCut2      188 TL--FILP---AHFLYGADAAGPGPEFLVGQINE----- 216
FvCut1      187 SL--IVAA---PHLAYQSDASGPAQFLIQRVAATSI----- 218
FvCut3      182 SL--IVAA---PHLAYQSDASNGAPEFLIQKADAAGAA----- 214

LC-cutinase  287 TNNRHCC 293
FvCut2      .....
FvCut1      .....
FvCut3      .....

```

Percentual de identidade

	LC-cutinase	FvCut1	FvCut2	FvCut3
1: LC-cutinase	100,00	20,11	19,46	20,99
2: FvCut1	20,11	100,00	46,01	42,31
3: FvCut2	19,46	46,01	100,00	73,11
4: FvCut3	20,99	42,31	73,11	100,00

4.2.3 Efeitos da temperatura e do pH na atividade enzimática de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*

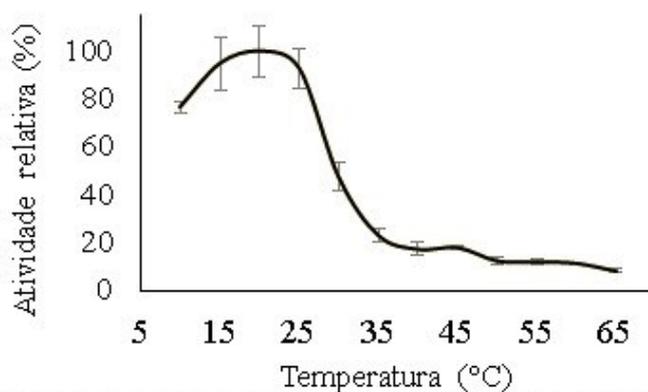
Os ensaios de caracterização das cutinases foram realizados utilizando p-NPB como substrato. *FvCut1* apresentou uma temperatura ótima de 20 °C (Figura 22). Temperaturas acima de 30 °C diminuíram mais de 50% da atividade de *FvCut1*. Até onde se sabe, cutinases de outros *Fusarium* sp. apresentaram uma temperatura ótima diferente (DIMAROGONA et al., 2015b; HU et al., 2016; NIKOLAIVITS et al., 2016; PING et al., 2017). Foram encontrados alguns relatos de outras cutinases fúngicas com temperaturas ótimas entre 20 -25 °C. Por exemplo, a cutinase de *G. cingulata* expressa em *P. pastoris* X-33 (SEMAN et al., 2014) e a cutinase de *P. pseudoalcaligenes* expressa em *E. coli* BL21-Gold (DE3) (HAERNVALL et al., 2018), ambas com temperatura ótima de 25 °C. Cutinase de *A. adenivorans* expressa em *A. adenivorans* G1212 exibiu maior atividade enzimática a 20 °C (BISCHOFF et al., 2015).

As temperaturas ideais para *FvCut2* e *FvCut3* foram 40 e 35 °C (Figura 22), respectivamente. *FvCut2* parece ser mais ativa em uma faixa de temperatura mais ampla, pois manteve mais de 80% da atividade enzimática a 35 e 45 °C. *FvCut3* foi mais sensível à variação de temperatura e manteve menos de 40% de atividade quando a reação ocorreu a 30 e 40 °C. A temperatura ótima de *FvCut2* foi a mesma relatada para as cutinases de *F. oxysporum* expressa em *E. coli* BL21 (DE3) (DIMAROGONA et al., 2015b) e *F. solani* expressa em *P. pastoris* X-33 (PING et al., 2017). Além disso, o *FvCut2* já foi expresso em *P. pastoris* X-33 e previamente caracterizado funcionalmente (GU et al., 2021), apresentando uma temperatura ótima de 50 °C, o que difere do resultado encontrado no presente estudo. Essa diferença pode estar relacionada ao sistema de expressão diferente. Sistemas de expressão eucarióticos, como leveduras, são capazes de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação e metilação (KANGWA; SALGADO; FERNANDEZ-LAHOURE, 2018; SHIRKE et al., 2018; SPADIUT; HERWIG, 2015). A glicosilação é uma ligação covalente de um oligossacarídeo com a proteína. Este tipo de modificação pós-traducional pode melhorar a estabilidade da proteína e prevenir a formação de agregados. O número de sítios de glicosilação e a localização desses sítios está diretamente relacionado com a estabilização da proteína pela glicosilação (DEKOSTER; ROBERTSON, 1997; SHENTAL-BECHOR; LEVY, 2008, 2009; SHIRKE et al., 2018; WANG et al., 1996). As cutinases de *F. verticillioides* não têm sítios de N-glicosilação previstos, no entanto, elas têm sítios de O-glicosilação. O mesmo ocorre com a cutinase de *F. solani pisi*, por exemplo (SAGT et al., 2000). Assim, a expressão dessas enzimas em

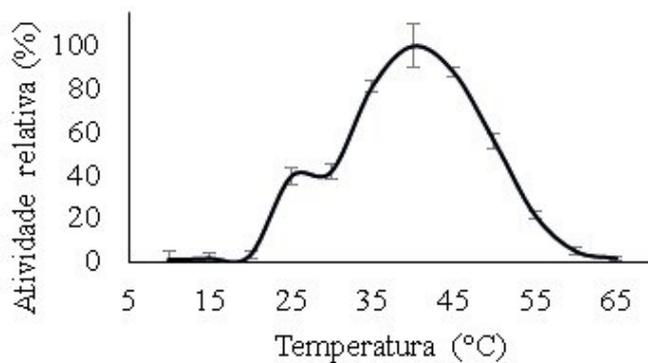
hospedeiros eucarióticos pode resultar em proteínas O-glicosiladas que, conseqüentemente, podem ser mais estáveis. Isso pode estar relacionado às diferenças de temperatura entre a cutinase de *F. verticilloides* expressa em *E. coli* e a cutinase expressa em *P. pastoris*.

Figura 22: Efeito da temperatura na atividade enzimática de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*. As reações ocorreram por 2 min em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,7, utilizando p-NPB (1 mM) como substrato.

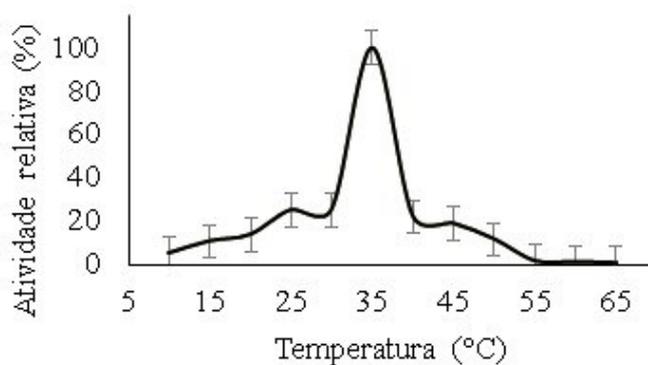
FvCut 1



FvCut 2



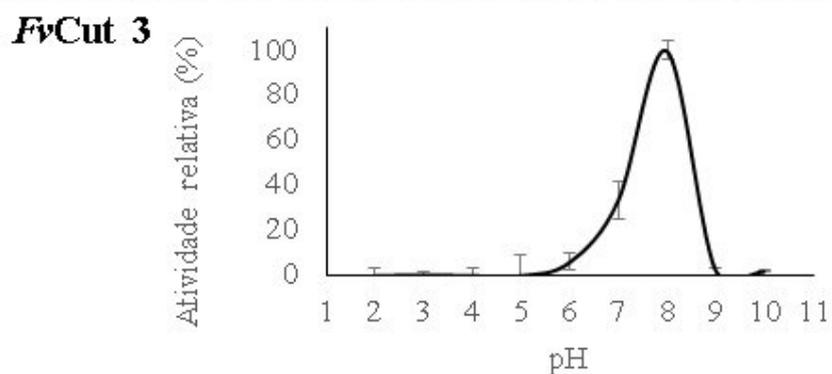
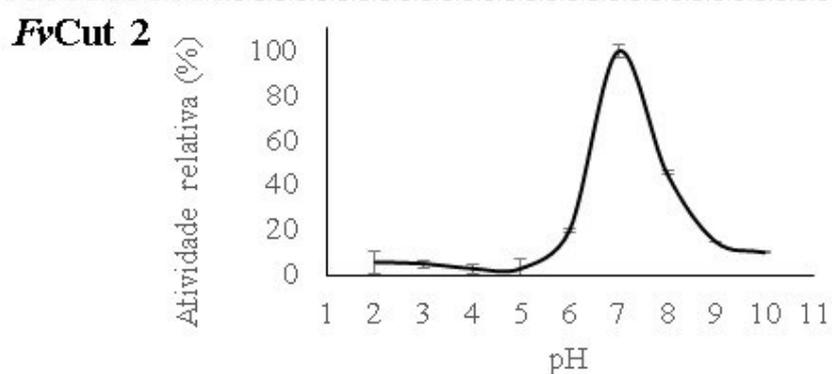
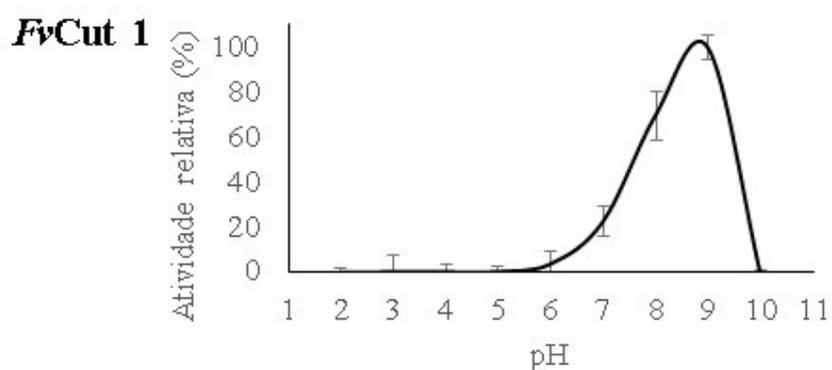
FvCut 3



Em termos de aplicação, o *FvCut3* seria uma opção interessante para aplicações em formulações de bioherbicidas. A maioria das aplicações de bioherbicida ocorre em temperaturas próximas à temperatura ótima de *FvCut3* (DE OLIVEIRA et al., 2019b; LIMA; MACHADO-NETO, 2001). *FvCut2* pode ser explorado para a hidrólise de poliésteres como PBS, polibutileno adipato (PBA) e polibutileno suberato (PBSub). A hidrólise desses poliésteres pode ocorrer em temperaturas próximas a 37 °C (BAI et al., 2018). Outra aplicação de cutinases bastante explorada é a hidrólise de PET. Entretanto, a hidrólise eficiente do PET é facilitada quando a reação ocorre próximo à temperatura de transição vítrea do polímero, que é de 70 °C. A cutinase de composto de ramo de folha (LCC) foi a mais eficiente na hidrólise desse polímero até o momento e foi necessário construir uma enzima mutante estável em temperaturas elevadas (TOURNIER et al., 2020).

A dependência do pH também foi investigada. As três enzimas apresentaram melhor atividade em pH neutro a alcalino. É comum que as cutinases tolerem bem uma faixa de pH neutro a alcalino (NIKOLAIIVITS et al., 2018). *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* tiveram um pH ótimo de 9, 7 e 8, respectivamente (Figura 23). pH menor que 7 diminuiu mais de 70% da atividade de *FvCut1*, assim como um pH alcalino (>10). No caso do *FvCut2*, as reações com pH acima de 8 diminuíram 50% da atividade enzimática e o pH ácido resultou em uma redução de 80%. *FvCut3* apresentou redução de atividade superior a 90% para pH acima de 9 e abaixo de 6. Os resultados foram semelhantes aos valores de pH ótimo obtidos para outras cutinases. *FvCut2* expresso em *P. pastoris* apresentou atividade ótima em pH 8 (GU et al., 2021). Cutinases de *Thielavia terrestris* e *P. pseudoalcaligenes* apresentaram pH ótimo de 7. Cutinases de *F. solani* e *A. fumigatus* apresentaram maior atividade enzimática em pH 7,5 e 8, respectivamente (PING et al., 2017). Cutinases de *F. oxysporum* (DIMAROGONA et al., 2015b), *T. terrestres* (LIU et al., 2018) e *F. solani* (HU et al., 2016) também apresentaram um pH ótimo de 8.

Figura 23: Efeito do pH na atividade enzimática de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*. As reações ocorreram por 2 min na temperatura ótima de cada enzima, tampão 50 mM, usando p-NPB (1 mM) como substrato.



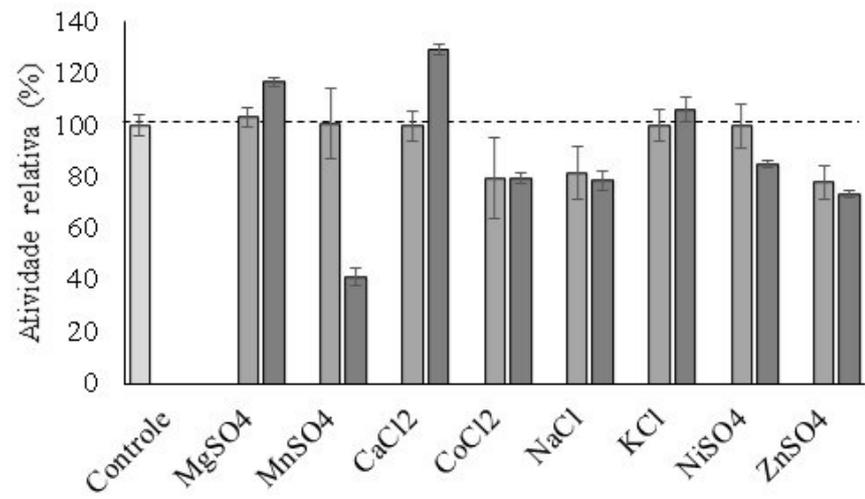
4.2.4 Efeitos de solventes orgânicos, íons metálicos, inibidores e detergentes na atividade enzimática

Prever o comportamento de enzimas na presença de íons metálicos pode ajudar a entender o desempenho desses biocatalisadores em misturas complexas. Diferentes compostos podem estar presentes em misturas complexas, incluindo íons metálicos. Além disso, algumas enzimas

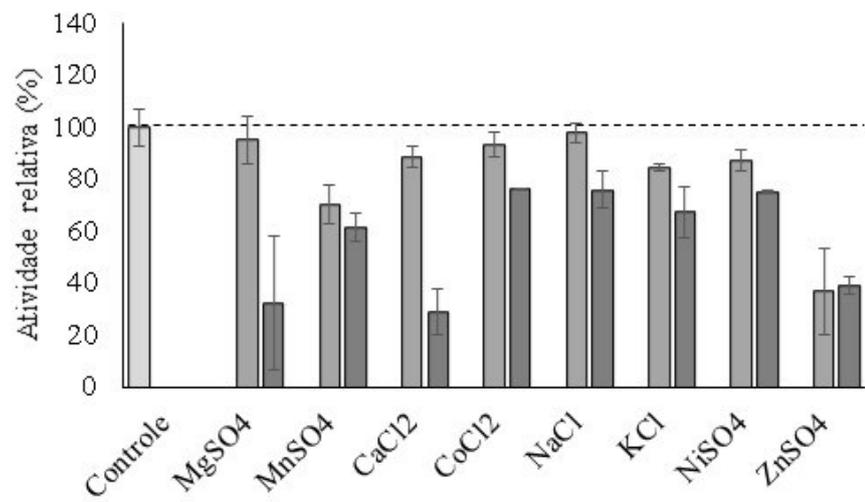
requerem cofatores para manter a conformação do sítio ativo e até mesmo para aumentar a estabilidade térmica. A LC-cutinase, por exemplo, tem maior estabilidade térmica na presença de Ca^{2+} (TOURNIER et al., 2020). Portanto, é fundamental avaliar os efeitos dos íons na atividade enzimática (SPERANZA; MACEDO, 2013). Por esta razão, o impacto dos íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , K^+ , Ni^{2+} and Zn^{2+} foram investigados nas concentrações de 1 e 5 mM (Figura 24).

Figura 24: Efeito de 1 mM (cinza claro) e 5 mM (cinza escuro) de íons metálicos na atividade enzimática de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*. As reações ocorreram por 2 min em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9, 20 °C para *FvCut1*, pH 7, 40 °C para *FvCut2* e pH 8, 35 °C para *FvCut3*, usando p-NPB (1 mM) como substrato.

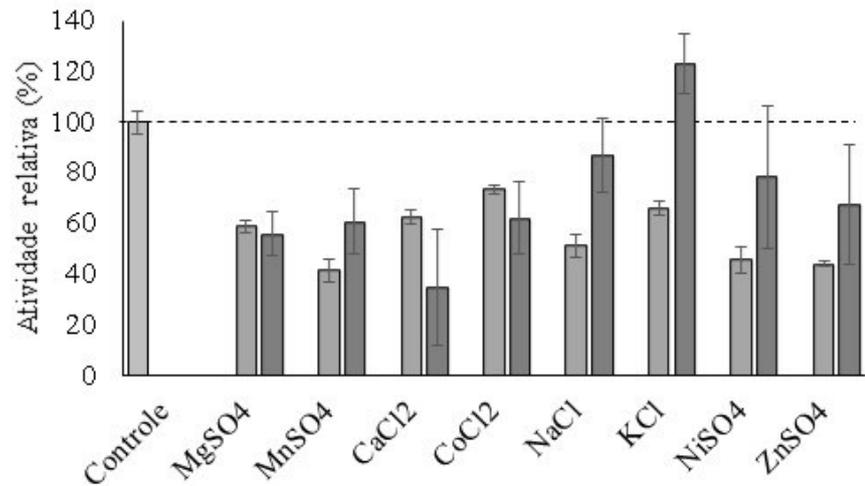
FvCut 1



FvCut 2



FvCut 3



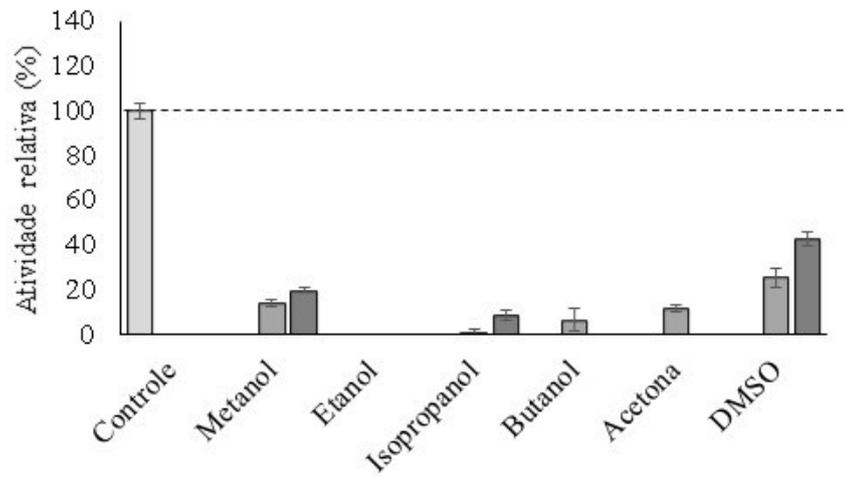
Mg²⁺ teve um efeito positivo na atividade de *FvCut1* em ambas as concentrações testadas, e a atividade enzimática atingiu 116%. Os íons Ca²⁺ (5 mM) e K⁺ (5 mM) também aumentaram a atividade de *FvCut1* para 129 e 106%, respectivamente, enquanto Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ e Na⁺ foram responsáveis por uma redução. Todos os íons testados diminuíram a atividade de *FvCut2*, sendo o Zn²⁺ o íon que mais afetou a atividade enzimática, reduzindo-a para menos de 50%. No caso de *FvCut3*, a atividade da enzima aumentou para 123% na presença de 5 mM K⁺.

A cutinase *FvCut2* expressa em *P. pastoris* exibiu atividade aumentada na presença de K⁺ (GU et al., 2021), diferente do resultado obtido no presente estudo. Segundo os autores, dentre todos os íons avaliados como Ni²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ e Cu²⁺, o íon K⁺ foi o único que afetou positivamente a atividade enzimática. Zn²⁺ e Co²⁺ também inibiram a atividade de uma cutinase de *F. oxysporum*. Possíveis explicações para a inibição das cutinases na presença desses íons são uma inibição diretamente no sítio catalítico, ou a formação de complexos entre íons metálicos e resíduos de aminoácidos carregados negativamente (SPERANZA; MACEDO, 2013). Semelhante aos resultados obtidos para *FvCut1* e *FvCut3* no presente estudo, uma cutinase de *F. solani* foi reprimida na presença de 1 mM de Co²⁺, Zn²⁺ e Mn²⁺ enquanto concentrações de 1 e 10 mM de K⁺ aumentaram a atividade da enzima (HU et al., 2016).

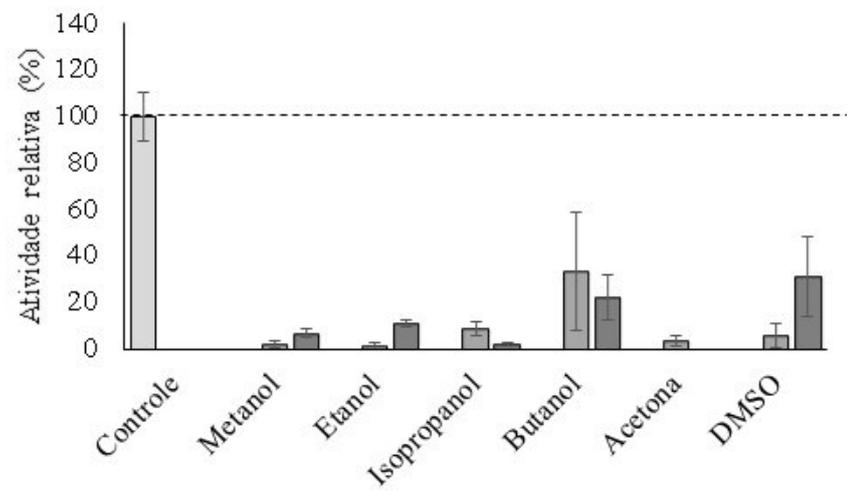
A análise dos efeitos dos solventes orgânicos sobre a atividade das cutinases também é importante porque, em geral, as reações enzimáticas podem envolver a solubilização de substratos hidrofóbicos em solventes orgânicos (GU et al., 2021). Aplicações de cutinases em reações de esterificação e transesterificação, por exemplo, ocorrem na presença de solventes orgânicos (DUTTA; DASU, 2011; SPERANZA; CARVALHO; MACEDO, 2011; SPERANZA; MACEDO, 2013). Portanto, foram investigados os efeitos de metanol, etanol, isopropanol, butanol, acetona e DMSO sobre a atividade enzimática de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*, nas concentrações finais de 15 e 30% (v/v). A maioria dos solventes apresentou efeito negativo sobre a atividade de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* em ambas as concentrações testadas (Figura 25).

Figura 25: Efeito de 15% v/v (cinza claro) e 30% v/v (cinza escuro) de solventes orgânicos na atividade enzimática de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*. As reações ocorreram por 2 min em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9, 20 °C para *FvCut1*, pH 7, 40 °C para *FvCut2* e pH 8, 35 °C para *FvCut3*, usando p-NPB (1 mM) como substrato.

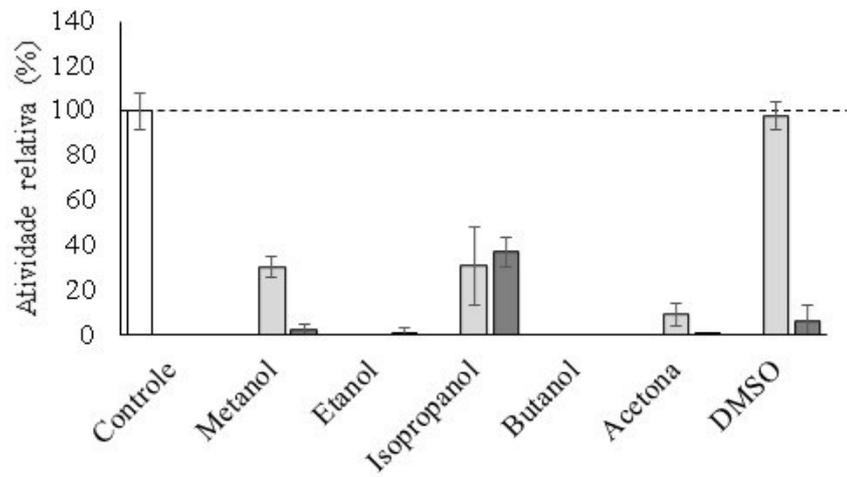
FvCut 1



FvCut 2



FvCut 3



Para *FvCut1* e *FvCut2* a presença de DMSO na reação reduziu a atividade enzimática para menos de 50%. *FvCut3* manteve 97% da atividade enzimática na presença de 15% v/v de DMSO, mas em uma concentração maior a atividade reduziu drasticamente. Da mesma forma, nota-se que para as reações contendo etanol, butanol e acetona, todas as enzimas testadas apresentaram menor ou nenhuma atividade em ambas as concentrações. Além disso, *FvCut1* foi menos tolerante à presença de isopropanol do que metanol, *FvCut2* teve sua atividade reduzida para menos de 10% em ambos, e *FvCut3* manteve em torno de 30% de atividade nas menores concentrações de metanol e isopropanol.

Um efeito redução de atividade de uma cutinase de *F. oxysporum* na presença dos solventes acetona, metanol, etanol, propanol e butanol já foi relatado na literatura. O isopropanol e o etanol também afetaram negativamente a atividade de três cutinases de *A. adenivorans*. A atividade residual das três enzimas de *A. adenivorans* foi inferior a 50% na presença de isopropanol. Nesse caso, o etanol teve um efeito negativo menor em relação ao isopropanol (BISCHOFF et al., 2015). *FvCut2* expresso em *P. pastoris* também exibiu menor atividade na presença de etanol e acetona (GU et al., 2021). Por outro lado, DMSO e metanol não afetaram a atividade da enzima, padrão diferente do observado no presente estudo.

Os efeitos negativos da acetona, metanol, etanol, isopropanol e butanol na atividade das cutinases podem estar relacionados à polaridade do solvente. A superfície das moléculas de proteína é revestida com uma camada de moléculas de água, que mantém a proteína hidratada. Alguns solventes orgânicos podem mover as moléculas de água da superfície da proteína. Os solventes também podem causar alterações na organização das moléculas de água dentro da proteína. Essas alterações podem causar distorções na conformação da enzima (GU et al., 2021; SPERANZA; MACEDO, 2013; ZHANG et al., 2020b). O DMSO, que parece ser o solvente que menos afeta a atividade das três cutinases, é o solvente com polaridade mais semelhante à água, o que pode ser uma explicação para o efeito observado (GU et al., 2021).

Outros compostos que podem estar presentes nas formulações enzimáticas são os surfactantes. Esses compostos podem ser usados em etapas de purificação de enzimas e em emulsões para evitar agregação e precipitação de enzimas. Por outro lado, o uso de surfactantes pode afetar a estrutura terciária da enzima causando desnaturação. Portanto, é importante avaliar a influência de diferentes tensoativos na atividade enzimática (BUSSAMARA et al., 2010; SPERANZA; MACEDO, 2013). Os efeitos dos tensoativos Tween 80, Triton X-100 e SDS foram avaliados nas concentrações de 1 e 5 mM (Figura 26). Todos os surfactantes afetaram negativamente a atividade de *FvCut1*. Enquanto isso, para *FvCut2*, 5 mM Tween 80

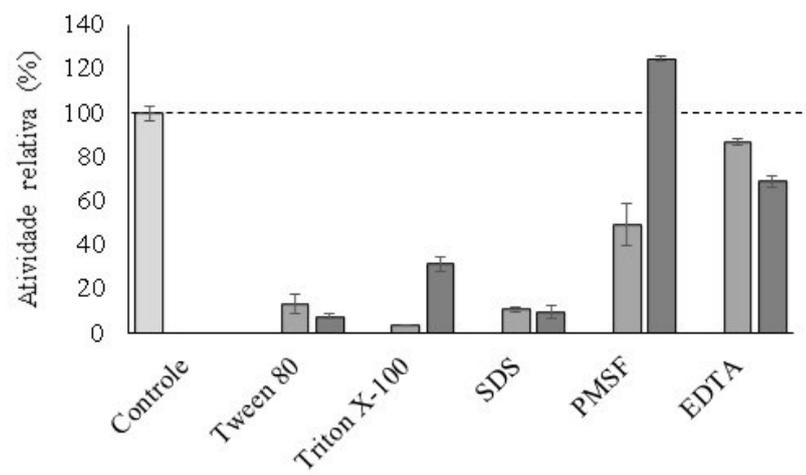
e Triton X-100 aumentaram a atividade para 224 e 379% em comparação com o controle. *FvCut3* teve um aumento para 231 e 330% na atividade enzimática em 1 mM. Em outro estudo, a cutinase de *G. cingulata* foi inibida por Tween 20 e Triton X-100 (SEMAN et al., 2014), enquanto uma cutinase de *T. terrestris* teve um aumento significativo de atividade na presença de Tween 20 e Triton X-100 (DUAN et al., 2019).

O SDS resultou em um efeito negativo na atividade enzimática das três enzimas, o que corrobora com os resultados obtidos para *FvCut2* expressa em *P. pastoris* (GU et al., 2021) e para a cutinase de *G. cingulata* (SEMAN et al., 2014). No entanto, esse resultado é diferente do observado para a cutinase de *F. oxysporum* que apresentou aumento da atividade enzimática na presença de 1 mM de SDS (SPERANZA; MACEDO, 2013).

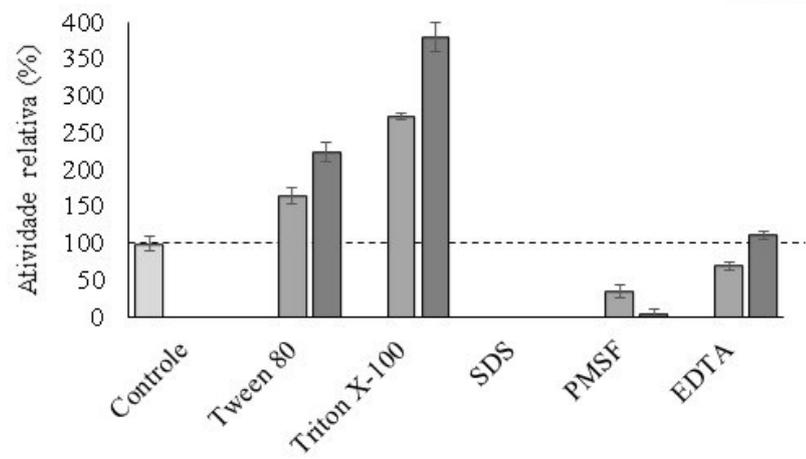
Também foi avaliada a atividade das cutinases na presença do inibidor de protease PMSF e do agente quelante EDTA, ambos nas concentrações de 1 e 5 mM. PMSF (5 mM) aumentou a atividade de *FvCut1* para 124%, enquanto para *FvCut3*, usando 1 mM de PMSF a atividade aumentou para 210%. A presença de EDTA, um quelante de íons metálicos inibiu a atividade de *FvCut1* e *FvCut3*, embora tenha aumentado a atividade de *FvCut2* em 111%. Os resultados relacionados ao efeito do EDTA na atividade do *FvCut2* são consistentes com a redução da atividade da enzima na presença de íons (BUSSAMARA et al., 2010) o que sugere que o EDTA pode atuar como um quelante, ligando-se aos íons presentes no meio e favorecendo a atividade de *FvCut2*. No entanto, o efeito positivo do EDTA na atividade do *FvCut2* é diferente do observado (GU et al., 2021).

Figura 26: Efeitos de 1 mM (cinza claro) e 5 mM (cinza escuro) de inibidores e detergentes na atividade enzimática de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*.

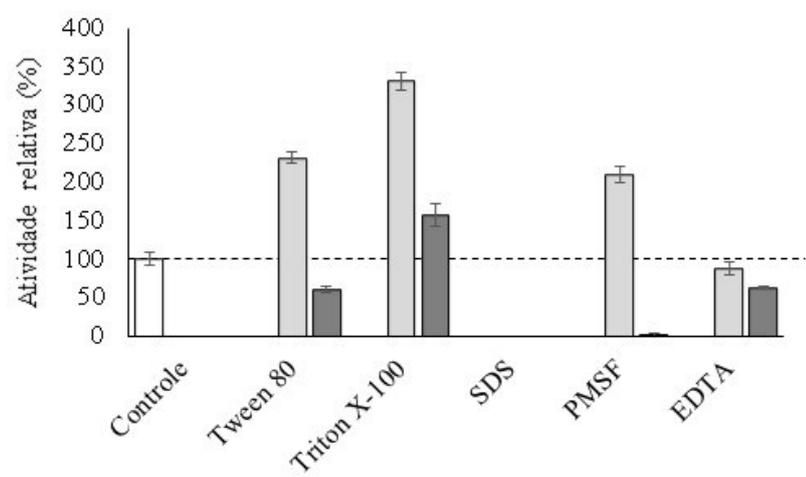
FvCut 1



FvCut 2



FvCut 3



4.2.5 Parâmetros cinéticos de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*

Os parâmetros cinéticos de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* foram calculados em temperatura e pH ótimos, usando p-NPB como substrato (Tabela 13). *FvCut1* exibiu maior eficiência enzimática (K_{cat}/K_m) em p-NPB em comparação com *FvCut2* e *FvCut3*. Uma cutinase de *F. solani* apresentou um K_m de 1,37 mM em p-NPB (SPERANZA; MACEDO, 2013), diferente das cutinases de *F. verticillioides*. Outra cutinase nativa do mesmo microrganismo apresentou K_m de 0,27 mM em p-NPB e alta eficiência catalítica (K_{cat}/K_m of $3.214 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) (CHEN et al., 2010). A cutinase de *G. cingulata* apresentou valor de K_m de 20 mM e eficiência catalítica $2,2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ no mesmo substrato.

Tabela 13: Parâmetros cinéticos de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*.

Parâmetros cinéticos	<i>FvCut1</i>	<i>FvCut2</i>	<i>FvCut3</i>
K_m (mM)	0,05	0,11	0,22
V_{max} (mmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	175,44	80,00	169,49
K_{cat} (s ⁻¹)	64,98	30,30	62,77
K_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	1299,00	302,72	285,31

4.2.6 Estrutura tridimensional das cutinases de *Fusarium verticillioides*

Os modelos estruturais de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* foram obtidos por modelagem de homologia, utilizando o servidor SWISS-MODEL. Estruturas resolvidas de outras cutinases foram usadas como moldes. Os parâmetros globais GMQE e QMEANDisCo, calculados pelo servidor SWISS-MODEL, fornecem uma medida da qualidade do modelo gerado. GMQE e QMEANDisCo global variam de 0 a 1, com números mais altos indicando maior qualidade. Além dos parâmetros globais GMQE e QMEANDisCo, a validação complementar dos modelos gerados foi realizada usando o gráfico Ramachandran (<https://zlab.umassmed.edu/bu/rama/>). Os gráficos de Ramachandran estão disponíveis no ANEXO C.

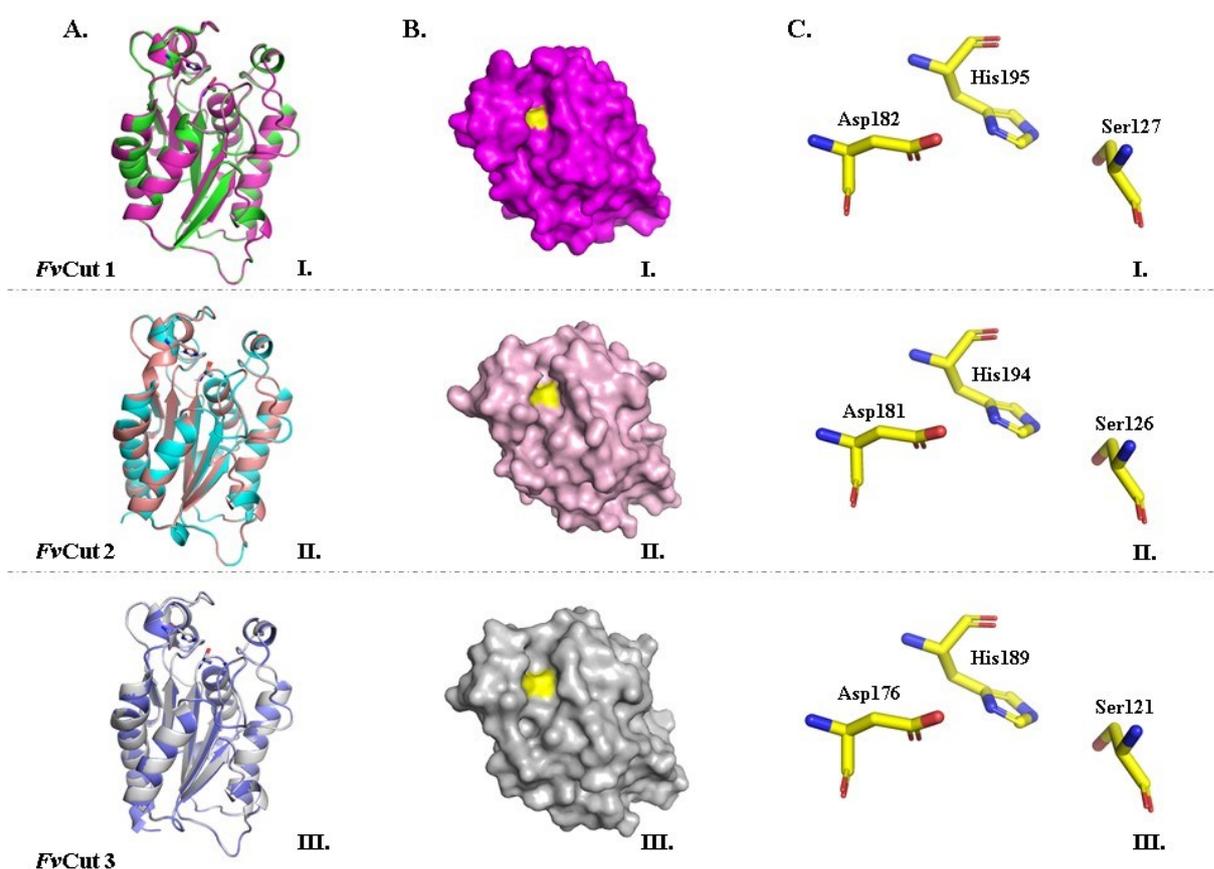
A cutinase de *H. insolens* (PDB: 4OYY.1) foi usada como modelo para *FvCut1*, a identidade de sequência entre as duas enzimas é de 58%. Os parâmetros GMQE e QMEANDisCo globais calculados foram 0,78 e $0,81 \pm 0,06$, respectivamente. Na plotagem de Ramachandran, 97% dos resíduos foram plotados em regiões de alta preferência. Para modelar

FvCut2, a cutinase de *F. solani* (PDB: 1XZM.1.A) foi usada como modelo, ambas apresentam 76% de identidade. Os parâmetros GMQE e QMEANDisCo globais calculados foram 0,86 e $0,88 \pm 0,06$, respectivamente. Na plotagem de Ramachandran, 99% dos resíduos foram plotados em regiões de alta preferência. Por fim, a modelagem *FvCut3* foi baseada na cutinase de *F. oxysporum* (PDB: 5AJH.2.A), a identidade de sequência entre elas é de 97%. Os parâmetros GMQE e QMEANDisCo globais calculados foram 0,91 e $0,89 \pm 0,06$, respectivamente. Na plotagem de Ramachandran, 99% dos resíduos foram plotados em regiões de alta preferência.

A análise visual das estruturas de *FvCut1*, *FvCut2*, *FvCut3* e seus respectivos modelos sobrepostos revelam uma dobra geral quase idêntica entre as cutinases de *F. verticillioides* e os modelos usados para modelagem por homologia (Figura 27A I-III). Um modelo de superfície de acesso ao solvente foi gerado para as três cutinases e diferenças na abertura do sítio catalítico podem ser observadas (Figura 27B I-III). *FvCut1* possui um sítio ativo mais estreito, o que pode estar relacionado à maior eficiência enzimática de *FvCut1* com o substrato p-NPB, que possui uma cadeia de carbono curta (C 4) e, portanto, é um substrato não volumoso. Já *FvCut2* apresenta uma abertura do sítio catalítico maior e eficiência enzimática menor em relação a *FvCut1*. *FvCut3*, que possui a maior abertura de sítio catalítico também é a enzima com menor eficiência em p-NPB. Apesar da variação na arquitetura ao redor do sítio catalítico, a tríade catalítica e o orifício de oxianion são conservados entre as cutinases. O orifício oxianion de *FvCut1* é composto por Thr157 e Gly155, *FvCut2* é composto por Thr156 e Gly15 e *FvCut3* é composto por Thr151 e Gly149. Detalhes da tríade catalítica das três enzimas podem ser vistos na Figura 27C I-III. A tríade catalítica está localizada em uma fenda rasa com os resíduos de aminoácidos da tríade expostos ao solvente. Essa característica é considerada exclusiva das cutinases e diferencia cutinase de lipase (CHEN et al., 2010; NOVY et al., 2021).

As três cutinases apresentam um único domínio e são proteínas $\alpha\beta$ com uma folha β central de 5 fitas circundada por hélices, um enrolamento típico de α/β hidrolases (KOLD et al., 2014; NARDINI; DIJKSTRA, 1999). A folha β central é conservada em toda a família lipase-cutinase. Variações significativas nas estruturas de lipases e cutinases geralmente ocorrem nas estruturas de hélice e loop (KOLD et al., 2014). Comparando as estruturas de hélice e loop de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* algumas diferenças podem ser observadas na Figura 28A I-III e Figura 28B I-III. É possível visualizar uma pequena hélice em *FvCut1* (Figura 28A I) que está ausente em *FvCut2* (Figura 28A II) e *FvCut3* (Figura 28A III). Há também uma diferença na hélice onde as histidinas da tríade catalítica de *FvCut1* (Figura 28B I) e *FvCut3* (Figura 28B III) estão localizadas em comparação com *FvCut2* (Figura 28B II). *FvCut2* apresenta uma hélice mais longa em comparação com *FvCut1* e *FvCut3*.

Figura 27: Detalhes estruturais de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*. A). Modelo geral da estrutura de *FvCut1* sobreposta com o template HiC (PDB: 4OYY.1) (I), *FvCut2* e FsC (PDB: 1XZM.1) (II), *FvCut3* e FoC (PDB: 5AJH.2) (III). B) Modelo da superfície de acesso ao solvente com o sítio catalítico destacado em amarelo para *FvCut1* (I), *FvCut2* (II) e *FvCut3* (III). C) Detalhes do sítio catalítico mostrando a tríade catalítica (Asp, His, e Ser) para *FvCut1* (I), *FvCut2* (II) e *FvCut3* (III).



A folha β de *FvCut1* é formada por 5 fitas paralelas, circundadas por 11 α -hélices. Cada uma das fitas que compõem a folha β é formada por Ala42-Ala47, Trp76-Gly79, Val121-Tyr126, Gly150-Phe154 e Thr174-Phe177. As α -hélices são formadas por Asp30-Asp33, Thr59-Ala71, Leu88-Phe92, Asp99-Lys115, Gln128-Glu139, Ala143-Gln147, Asn159-Leu162, Thr171-Lys173, Leu183-Asp186, Pro193-1948-I e Tyr2. A enzima tem 2 pontes dissulfeto. Uma das pontes dissulfeto liga os resíduos Cys178 e Cys185, a outra liga Cys31 e Cys109 (Figura 29A).

FvCut2 também possui em sua estrutura 5 fitas paralelas que formam a folha β . Diferente de *FvCut1*, *FvCut2* tem 9 α hélices. As fitas que compõem a folha β são formadas por Val40-

Ala45, Val74-Gly78, Lys119-Tyr125, Gly149-Phe153 e Thr173-Phe176. As α -hélices são formadas por Asp28-Asn31, Leu57-Tyr69, Leu87-Ala91, Ser98-Lys114, Gln127-Asp138, Thr141-Lys146, Arg170-Arg172, Leu182-Ser187 e Ala192-Ala215. Como *FvCut1*, *FvCut2* também possui 2 pontes dissulfeto. Uma das pontes dissulfeto liga os resíduos Cys177 e Cys184, a outra liga Cys37 e Cys115 (Figura 29B).

As 5 fitas que compõem a folha β de *FvCut3* são formadas por Val40-Ala45, Val74-Gly78, Lys119-Tyr125, Gly149-Phe153 e Thr173-Phe176. Diferente das outras duas cutinases de *F. verticillioides*, a folha β de *FvCut3* é cercada por 10 hélices α . As hélices são compostas por Asp23-Asn26, Leu52-Tyr64, Leu82-Ala86, Ser93-Lys109, Gln122-Asp133, Ala136-Lys141, Glu165-Arg167, Leu177-Thr180, Ala187-Ala190 e Tyr192-Ala211. *FvCut3* também possui 2 pontes dissulfeto. Uma das pontes liga os resíduos Cys172 e Cys179, a outra liga Cys32 e Cys110 (Figura 29C).

A ponte dissulfeto de *FvCut1*, que liga Cys178 e Cys185, pode ser responsável por estabilizar a alça β - α onde está localizado o aspartato, um dos resíduos do sítio catalítico da enzima. A mesma hipótese pode ser aplicável para a ponte dissulfeto de *FvCut2* que liga Cys177 e Cys184 e a ponte dissulfeto de *FvCut3* que liga Cys172 e Cys179 (DIMAROGONA et al., 2015b; WON; YIM; KIM, 2022).

Figura 28: Diferenças estruturais de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* são destacadas com um círculo preto. O sítio ativo de cada enzima está destacado em amarelo.

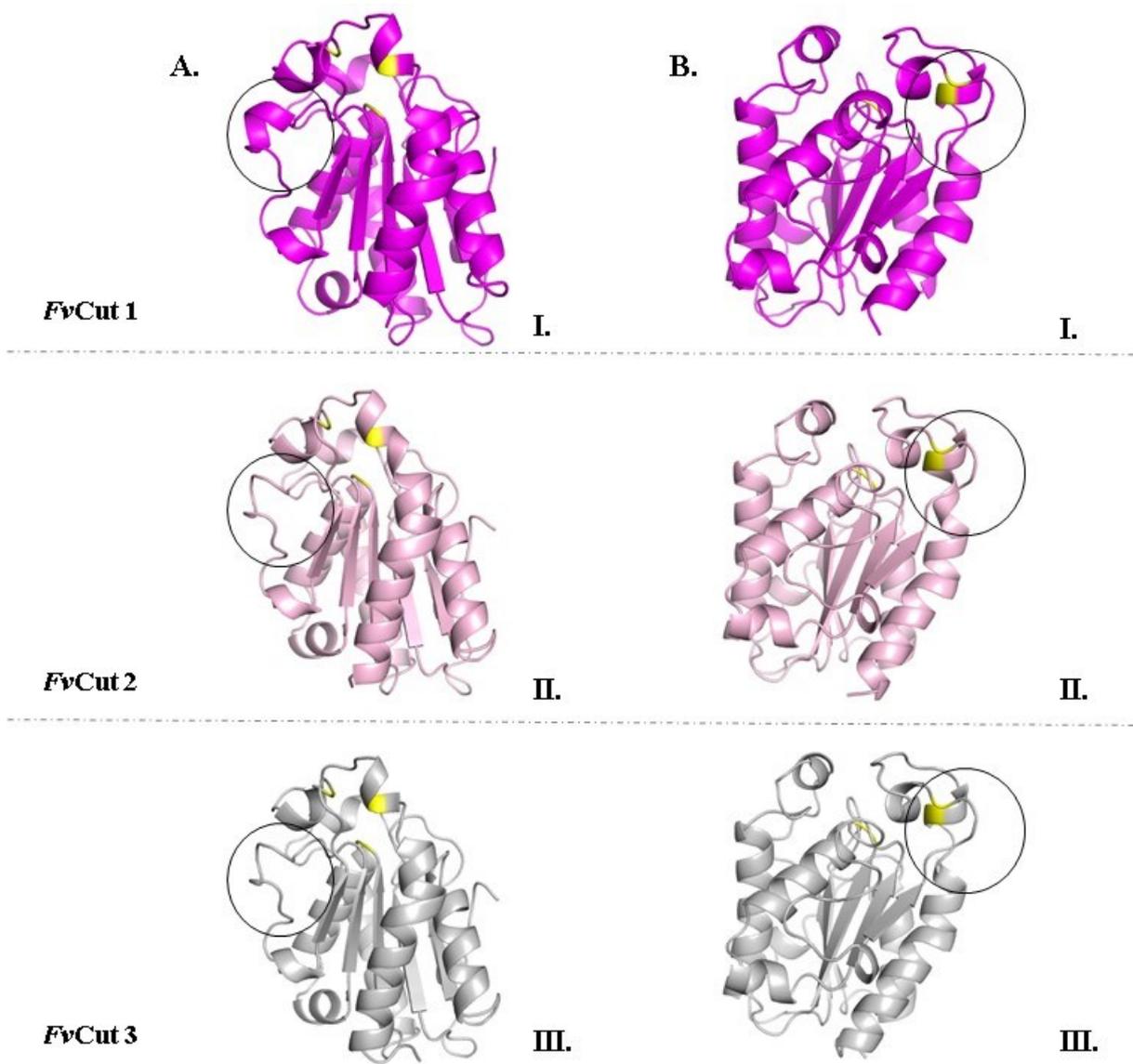
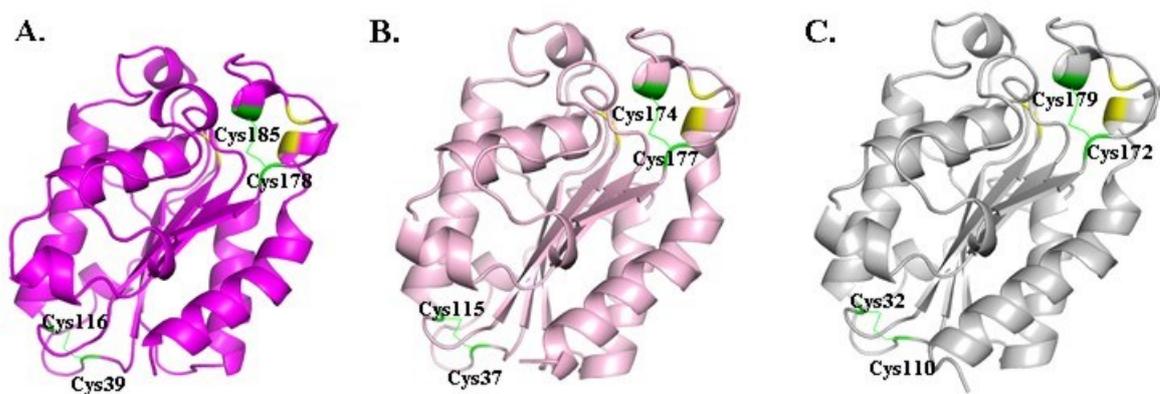


Figura 29: Estrutura das cutinases com identificação das ligações dissulfeto (verde) de *FvCut1* (A), *FvCut2* (B) e *FvCut3* (C). Os sítios ativos das enzimas estão destacados em amarelo.



Com base nas características estruturais das três cutinases, pode-se esperar que *FvCut1* apresente as maiores limitações para aplicação em processos de hidrólise de substratos volumosos, devido à estreita abertura do sítio ativo da enzima. Além do tamanho do substrato, outros fatores podem interferir nas reações de hidrólise. A degradação de alguns poliésteres, por exemplo, pode depender da relação CH₂/CO, morfologia do polímero e características térmicas (BAI et al., 2018; CUI; QIU, 2015; LIU et al., 2019; ZUMSTEIN et al., 2016). Para entender melhor o potencial de aplicação de *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*, é necessária uma análise aprofundada do mecanismo de degradação de substratos específicos.

A localização da tríade catalítica das cutinases de *F. verticillioides*, em uma fenda rasa exposta ao solvente, é semelhante ao observado para as cutinases dos ascomicetos *F. solani* e *A. nidulans* e dos basidiomicetos *Cryptococcus* sp. e *C. cinerea*. Todas essas cutinases pertencem à família CE5 (NOVY et al., 2021). A cutinase de *F. solani* já foi avaliada quanto ao potencial de degradação do PET. Para melhorar o encaixe de substratos volumosos no sítio catalítico dessa enzima, foram feitas mutações na fenda onde se localiza a tríade catalítica. Um aminoácido volumoso (leucina 182) foi substituído por um aminoácido menor (alanina). Essa mutação melhorou o ajuste do substrato modelo e aumentou a atividade da enzima em 5 vezes no PET (ARAÚJO et al., 2007). A variante LC-cutinase (TOURNIER et al., 2020), uma das enzimas mais eficientes na hidrólise do PET atualmente e que não pertence à família CE5, também possui um sítio catalítico do tipo fenda rasa exposto ao solvente. Essa cutinase, como a citada acima, foi construída para melhorar o encaixe de substratos volumosos no sítio catalítico e, adicionalmente, aumentar a estabilidade térmica (TOURNIER et al., 2020; ZENG et al., 2022).

Um diferencial da LC-cutinase é sua atividade em altas temperaturas. Enzimas estáveis em temperaturas elevadas são interessantes para a hidrólise do PET, pois a temperatura de transição vítrea desse polímero varia de 65 a 70 °C. Nessa temperatura, o plástico fica mais flexível e facilita o acesso da enzima ao substrato (MARTEN; MÜLLER; DECKWER, 2005; ZENG et al., 2022). A LC-cutinase é uma enzima termofílica. A enzima selvagem tem uma temperatura ótima de 50 °C e uma temperatura de fusão de 85 °C (SULAIMAN et al., 2012). As variantes de LC-cutinase (TOURNIER et al., 2020; ZENG et al., 2022) têm uma temperatura ótima de 72 e 74 °C e temperaturas de fusão de 94 e 99 °C.

Apesar da maior eficiência das enzimas termofílicas na degradação do PET, há esforços para construir enzimas capazes de hidrolisar plásticos em temperaturas moderadas

(ALTAMMAR et al., 2022; CUI et al., 2019; JOO et al., 2018; LU et al., 2022), pois isso reduziria os custos operacionais do processo. Além disso, uma parte considerável dos plásticos é descartada de forma inadequada em ambientes naturais e enzimas capazes de atuar em temperatura ambiente possibilitariam o desenvolvimento de processos de degradação in situ (LU et al., 2022; WORM et al., 2017). Considerando que as cutinases de *F. verticillioides* apresentam atividade ótima em temperaturas amenas e possuem sítio catalítico semelhante ao de outras cutinases com potencial para hidrólise de plásticos, realizou-se um teste de hidrólise de PET com *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*. Os resultados são apresentados no próximo tópico.

4.2.7 Análises de hidrólise de PET

As reações de hidrólise foram realizadas em duas temperaturas diferentes (30 e 50 °C). Analisando o cromatograma das amostras de PET após hidrólise com *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3*, não foi possível observar picos correspondentes aos produtos da hidrólise de PET (TPA e BHET). Os tempos de retenção aproximados para os padrões TPA e BHET são de 9 e 11 min, respectivamente. Nas condições de hidrólise avaliadas, não foram observados picos nesses tempos de retenção (Figuras 30 e 31). Portanto, não é possível afirmar que as cutinases de *F. verticillioides* sejam capazes de degradar o PET nas condições avaliadas.

Figura 30: Cromatograma A.) dos produtos padrão da hidrólise de PET (TPA e BHET), B.) da reação controle (sem enzima) e as amostras de PET após hidrólise enzimática com *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* a 30 °C.

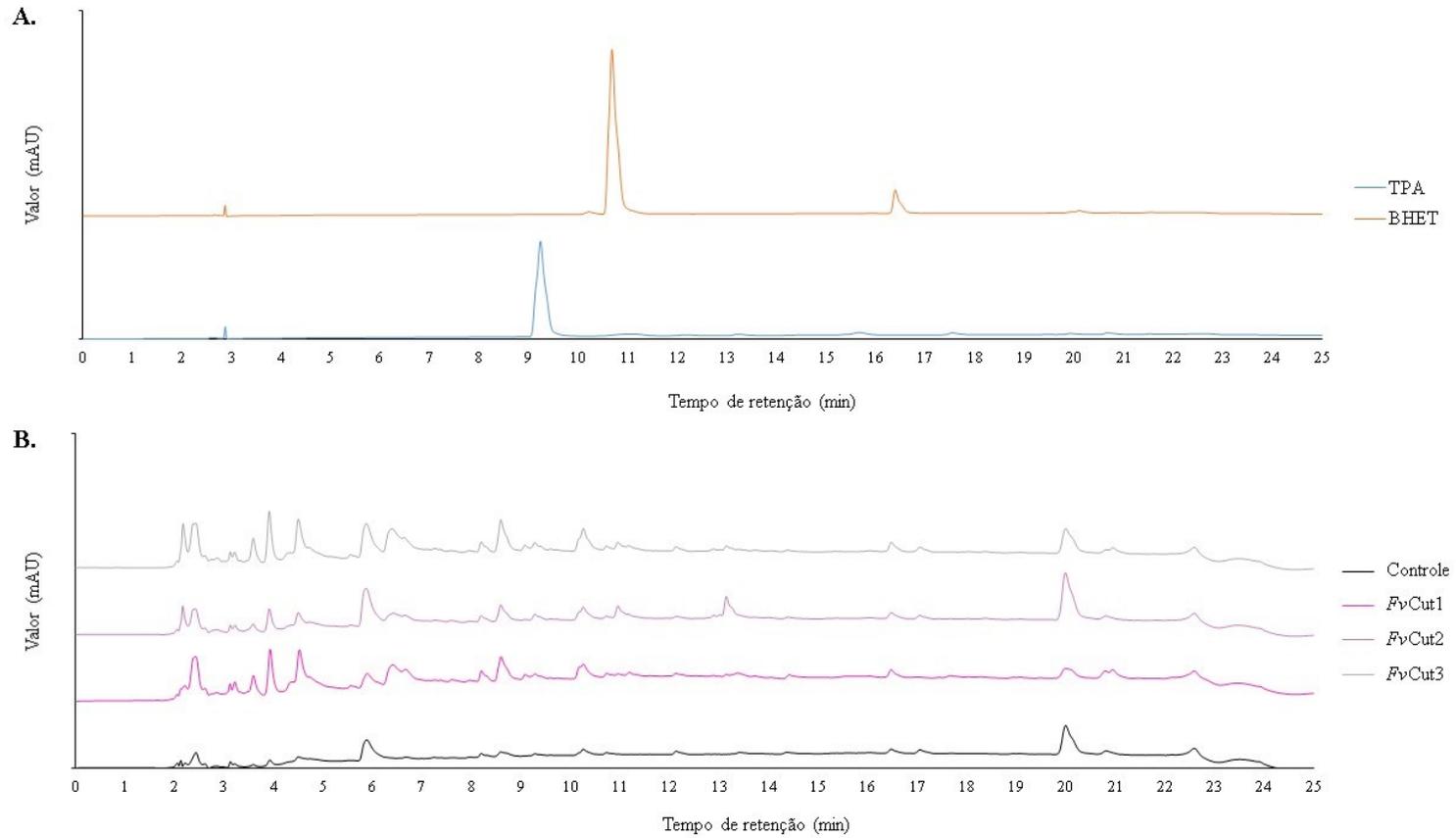
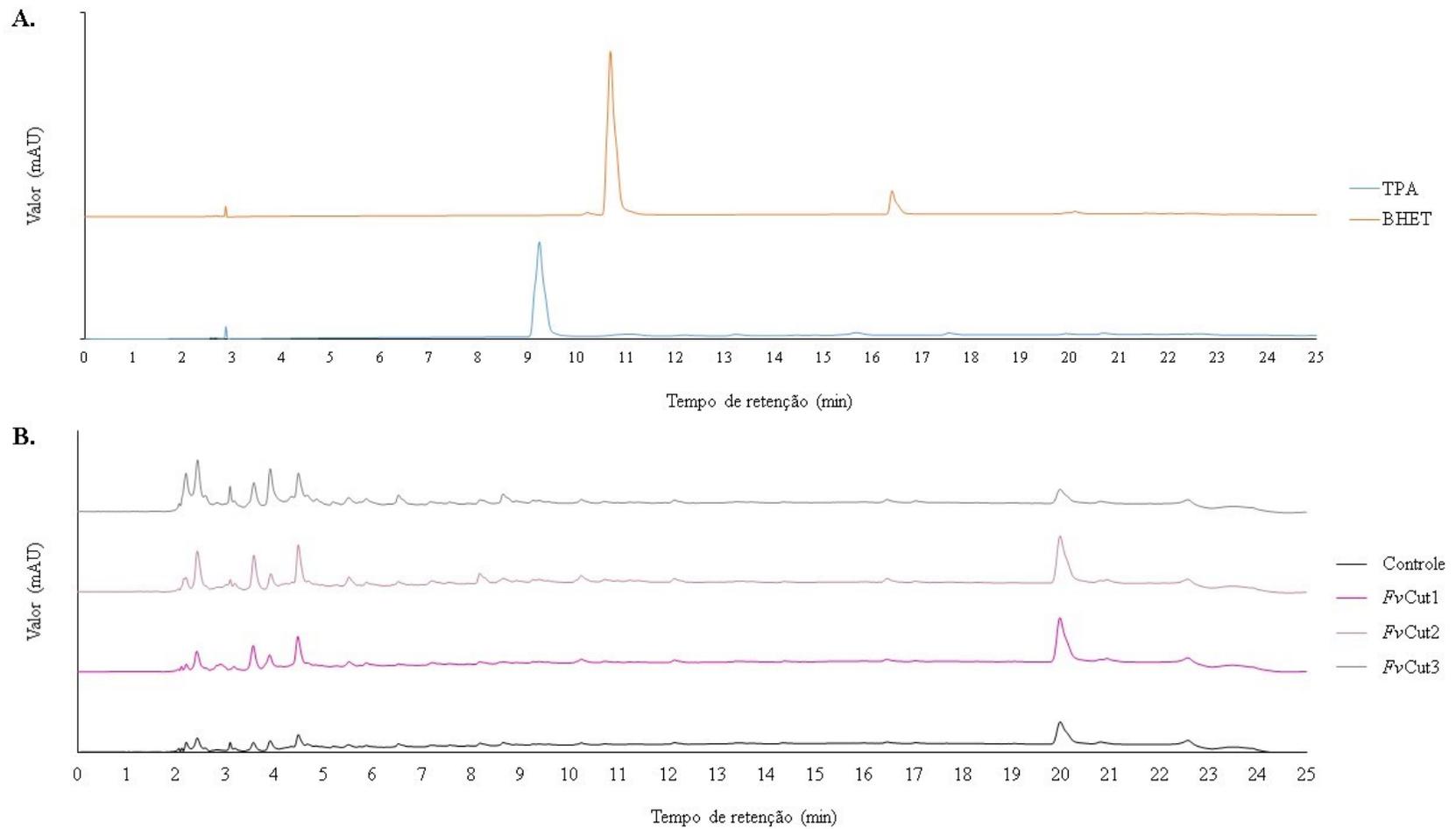


Figura 31: Cromatograma A.) dos produtos padrão da hidrólise de PET (TPA e BHET), B.) da reação de controle (sem enzima) e as amostras de PET após hidrólise enzimática com *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* a 50 °C.



Embora não tenha sido possível observar picos nos tempos de retenção correspondentes aos padrões TPA e BHET, observou-se picos em outros tempos de retenção. As informações sobre os picos visualizados são fornecidas na Tabela 14. Os picos vistos para as reações com *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* não foram observados na amostra controle. Portanto, possivelmente ocorreu uma reação de hidrólise, gerando produtos não identificados.

Tabela 14: Comprimentos de onda e tempos de retenção para os picos detectados no cromatograma das amostras de PET após hidrólise com *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* nas temperaturas de 30 e 50 °C.

Temperatura de hidrólise (°C)	Enzima	Tempo de retenção (min)	Comprimento de onda (nm)
30	<i>FvCut1</i>	4	259
	<i>FvCut2</i>	6	274
		3,5	262
	<i>FvCut3</i>	6	274
		6,5	273
50	<i>FvCut1</i>	3,5	261
	<i>FvCut2</i>	2,5	266
		3,5	261
	<i>FvCut3</i>	3	261

5 CONCLUSÃO

Este estudo forneceu insights para o aumento de escala da produção de cutinase de *F. verticillioides* via FES. Genes que codificam cutinases produzidas pelo fungo filamentosos foram selecionados, as enzimas foram expressas em um hospedeiro heterólogo procaríote e pela primeira vez na literatura são fornecidas informações sobre as características funcionais e estruturais dessas cutinases.

A otimização da produção de cutinase via FES indicou que a melhor atividade enzimática ocorreu com uma composição do meio de 70% farelo de arroz, 30% casca de arroz, temperatura de 28 °C, umidade inicial de 87%, 12 dias de fermentação e utilizando uma camada de substrato com espessura de 4 a 6 cm. A adição de casca de arroz ao substrato conduziu a bons resultados (9,14 U/g) após otimização, mas aparentemente apresenta algumas limitações que podem estar relacionadas a dificuldade de acesso da enzima ao substrato. O scale up em biorreator de leito fixo (atividade máxima de 1,29 U/g) resultou em melhores atividades em relação ao biorreator com agitação mecânica (atividade máxima de 0,40 U/g). No entanto, as condições ambientais na etapa de scale up diferem em alguns aspectos daquelas aplicadas em frascos de menor escala. Esse fato parece explicar a diferença nos valores de atividade de cutinase encontrados nos reatores de maior escala e abre possibilidades de novos estudos para otimizar o scale up da produção de cutinase via FES.

As três cutinases produzidas por expressão heteróloga possuem algumas diferenças funcionais e estruturais. Filogeneticamente, *FvCut1* é a cutinase mais distante entre as três enzimas estudadas. A temperatura ótima de *FvCut1* foi de 20 °C, significativamente menor em comparação com *FvCut2* e *FvCut3* que possuem temperaturas ótimas de 40 e 35 °C, respectivamente. As faixas de temperatura ideais de *FvCut2* e *FvCut3* são consistentes com as temperaturas exigidas para aplicações agrícolas em formulações de bioherbicidas ou outras aplicações que não exijam temperaturas elevadas. As três cutinases foram intensamente inibidas por metanol, etanol, isopropanol, butanol e acetona. Os surfactantes Tween 80 e Triton X-100 potencializaram significativamente a atividade de *FvCut2* e *FvCut3*. Em termos estruturais, as três cutinases possuem um sítio catalítico do tipo fenda rasa exposto ao solvente. Este tipo de sítio catalítico é típico de várias cutinases. Existe uma pequena diferença na abertura dos sítios catalíticos das três enzimas. *FvCut1* tem uma abertura do sítio ativo mais estreita e exibiu menor eficiência catalítica utilizando substrato p-NPB, um substrato de carbono de cadeia curta. A pequena abertura do sítio catalítico pode influenciar na capacidade de hidrólise de determinados substratos, portanto *FvCut1* pode apresentar maiores limitações de aplicação em substratos

volumosos. *FvCut2* e *FvCut3* apresentaram uma eficiência catalítica maior em p-NPB em comparação a *FvCut1*. A enzima com maior eficiência catalítica em p-NPB foi *FvCut3*, que possui uma fenda de ligação ao substrato mais aberta. Um teste de hidrólise de um substrato volumosos (PET) foi realizado com as três enzimas individualmente e aparentemente *FvCut1*, *FvCut2* e *FvCut3* apresentam dificuldades para hidrolisar esse substrato. No entanto, apenas uma caracterização mais avançada da atividade enzimática em substratos volumosos pode confirmar esta hipótese.

O desenvolvimento do presente estudo foi capaz de fornecer informações essenciais para orientar a produção de cutinases de *F. verticillioides* e fundamentar decisões referentes a aplicações. Explorar a ampla gama de aplicações potenciais dessas enzimas requer um conhecimento profundo da biodiversidade das cutinases e das relações estrutura-função e este estudo contribui para construção desse conhecimento.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a produção de cutinase por *F. verticillioides* via FES em biorreatores miniaturizados.
- Explorar os sistemas heterólogos eucariotos para expressão das cutinases.
- Aplicar métodos computacionais para prever a interação das cutinases com diferentes substratos.
- Aplicar métodos computacionais para prever mutações que possam melhorar a estabilidade e a atividade enzimática.

REFERÊNCIAS

- ABERGEL, C. et al. Crystallization and preliminary X-ray study of a recombinant cutinase from *Fusarium solani* pisi. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 2, p. 215–216, 20 set. 1990.
- AGRAWAL, P. B.; NIERSTRASZ, V. A.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G. Role of mechanical action in low-temperature cotton scouring with *F. solani* pisi cutinase and pectate lyase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 473–482, 2008.
- AL-FAHAD, A. J. et al. Metabolically engineered recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-Deoxy-scyлло-inosose (2-DOI). **Metabolic Engineering Communications**, v. 11, 1 dez. 2020.
- ALTAMMAR, K. A. et al. Characterization of AnCUT3, a plastic-degrading paucimannose cutinase from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 6 out. 2022.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.
- AOYAGI, H.; KATAKURA, Y.; IWASAKI, A. Production of secretory cutinase by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. **SpringerPlus**, v. 5, p. 160, 2016.
- ARAÚJO, R. et al. Tailoring cutinase activity towards polyethylene terephthalate and polyamide 6,6 fibers. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 4, p. 849–857, 10 mar. 2007.
- ARMENTEROS, J. J. A. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 18 fev. 2019.
- ARNLING BÅÅTH, J.; BORCH, K.; WESTH, P. A suspension-based assay and comparative detection methods for characterization of polyethylene terephthalate hydrolases. **Analytical Biochemistry**, v. 607, p. 113873, 15 out. 2020.
- ARYA, G. C. et al. The Plant Cuticle: An Ancient Guardian Barrier Set Against Long-Standing Rivals. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 25 jun. 2021.
- ARYA, G. C.; COHEN, H. The Multifaceted Roles of Fungal Cutinases during Infection. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, 1 fev. 2022.

- ASTOLFI, V. et al. Operation of a fixed-bed bioreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58–59, p. 39–49, 2011.
- ÁVILA, S. N. S. et al. Multipurpose fixed-bed bioreactor to simplify lipase production by solid-state fermentation and application in biocatalysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 1–7, 15 abr. 2019.
- BABA, T. et al. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. **Molecular Systems Biology**, v. 2, 16 maio 2006.
- BADENES, S. M.; LEMOS, F.; CABRAL, J. M. S. Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 399–403, 2010.
- BADENES, S. M.; LEMOS, F.; CABRAL, J. M. S. Kinetics and mechanism of the cutinase-catalyzed transesterification of oils in AOT reversed micellar system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 1133–1142, 2011a.
- BADENES, S. M.; LEMOS, F.; CABRAL, J. M. S. Performance of a cutinase membrane reactor for the production of biodiesel in organic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 1279–1289, jun. 2011b.
- BAGHBAN, R. et al. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 365–384, 1 maio 2019.
- BAI, Z. et al. Correlation between the chemical structure and enzymatic hydrolysis of Poly(butylene succinate), Poly(butylene adipate), and Poly(butylene suberate). **Polymer Degradation and Stability**, v. 158, p. 111–118, 1 dez. 2018.
- BAO, C. et al. Expression and function of an Hac1-regulated multi-copy xylanase gene in Saccharomyces cerevisiae. **Scientific Reports**, v. 10, n. 11686, 1 dez. 2020.
- BARROS, D. P. C. et al. Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 178–185, 2009.
- BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: A review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 881–896, 31 jan. 2003.

- BELVAL, L. et al. A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by *E. coli* Arctic Express. **Protein Expression and Purification**, v. 109, p. 29–34, 1 maio 2015.
- BERGQUIST, P. L. et al. Production of recombinant bleaching enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 165–176, 2002.
- BERTONI, M. et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 5 set. 2017.
- BHARDWAJ, H.; GUPTA, R.; TIWARI, A. Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, p. 575–579, 2013.
- BIENERT, S. et al. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D313–D319, 4 jan. 2017.
- BILL, R. M. Playing catch-up with *Escherichia coli*: using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 85, p. 1–5, 5 mar. 2014.
- BISCHOFF, F. et al. Three New Cutinases from the Yeast *Arxula adenivorans* That Are Suitable for Biotechnological Applications. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5497–5510, ago. 2015.
- BISCHOFF, F. et al. Applications of *blastobotrys (arxula) adenivorans* in biotechnology. Em: **Yeast Diversity in Human Welfare**. [s.l.] Springer Singapore, 2017. p. 455–479.
- BOGDAN, N. Patogeniczne grzyby zasiedlające nasiona łubinu wąskolistnego. **Acta Agrobotanica**, v. 48, n. 2, p. 59–64, 1953.
- BOLLINGER, A. et al. A Novel Polyester Hydrolase From the Marine Bacterium *Pseudomonas aestusnigri* – Structural and Functional Insights. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 114, 13 fev. 2020.
- BOMMARIUS, A. S.; BLUM, J. K.; ABRAHAMSON, M. J. Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 2, p. 194–200, 1 abr. 2011.

- BORRELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774–20840, 1 set. 2015.
- BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial - Volume 1**. São Paulo: [s.n.].
- BURDETTE, L. A. et al. Developing Gram-negative bacteria for the secretion of heterologous proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 196, p. 1–16, 20 dez. 2018.
- BUSSAMARA, R. et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 268–275, 2010.
- BYUN, H. et al. Generalized Approach towards Secretion-Based Protein Production via Neutralization of Secretion-Preventing Cationic Substrate Residues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, 1 jun. 2022.
- CAHN, F. J. Citric Acid Fermentation on Solid Materials. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 201–204, fev. 1935.
- CARVALHO, C. M.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. Cutinase structure, function and biocatalytic applications. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 15 dez. 1998.
- CARVALHO, C. M. L.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Cutinase: From molecular level to bioprocess development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 66, n. 1, p. 17–34, 1 jan. 1999.
- CASTRO, A. M. DE et al. High-fold improvement of assorted post-consumer poly(ethylene terephthalate) (PET) packages hydrolysis using *Humicola insolens* cutinase as a single biocatalyst. **Process Biochemistry**, v. 81, p. 85–91, 1 jun. 2019.
- CAUSSETTE, M. et al. Enzyme inactivation by inert gas bubbling. **Progress in Biotechnology**, v. 15, p. 393–398, 1 jan. 1998.
- CHAROENRAT, T. et al. Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 193–198, 1 ago. 2013.

- CHAUDHARI, S. A.; SINGHAL, R. S. Cutin from watermelon peels: A novel inducer for cutinase production and its physicochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 398–404, 2015.
- CHEN, H.-Z.; LIU, Z.-H.; DAI, S.-H. A novel solid state fermentation coupled with gas stripping enhancing the sweet sorghum stalk conversion performance for bioethanol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, 2014.
- CHEN, S. et al. Identification and Characterization of Bacterial Cutinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 38, p. 25854–25862, 2008.
- CHEN, S. et al. Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 3–4, p. 121–127, 1 maio 2010.
- CHEN, S. et al. Cutinase: Characteristics, preparation, and application. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1754–1767, 2013.
- CHEN, X. Q. et al. Directional-path modification strategy enhances PET hydrolase catalysis of plastic degradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 433, 5 jul. 2022.
- CHEN, Y. et al. Cell Surface Display Fungal Laccase as a Renewable Biocatalyst for Degradation of Persistent Micropollutants Bisphenol A and Sulfamethoxazole. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 16, p. 8799–8808, 16 ago. 2016.
- CHEN, Z. et al. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 1306–1313, 2007.
- CHUTMANOP, J. et al. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 7, p. 1012–1018, 1 jul. 2008.
- CROTEAU, R.; KOLATTUKUDY, P. E. Biosynthesis of Hydroxyfatty Acid Polymers. Enzymatic Synthesis of Cutin from Monomer Acids by Cell-Free Preparations from the Epidermis of *Vicia faba* Leaves. **Biochemistry**, v. 13, n. 15, p. 3193–3202, 1 jul. 1974.
- CUI, Y. et al. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation by the GRAPE strategy. **bioRxiv**, p. 787069, 30 set. 2019.

- CUI, Y. et al. Computational Redesign of a PETase for Plastic Biodegradation under Ambient Condition by the GRAPE Strategy. **ACS Catalysis**, v. 11, n. 3, p. 1340–1350, 5 fev. 2021.
- CUI, Z.; QIU, Z. Thermal properties and crystallization kinetics of poly(butylene suberate). **Polymer**, v. 67, p. 12–19, 29 abr. 2015.
- DAGNINO, E. P. et al. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 363–368, mar. 2013.
- DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, n. 2, p. 119–138, mar. 2005.
- DANTZIG, A. H.; ZUCKERMAN, S. H.; ANDONOV-ROLAND, M. M. Isolation of a *fusarium solani* mutant reduced in cutinase activity and virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 168, n. 2, p. 911–916, 1 nov. 1986.
- DE ALMEIDA, T. C. et al. Production and formulation of a bioherbicide as environment-friendly and safer alternative for weed control. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 5938–5943, 2020.
- DE CASTRO, A. M. et al. Biocatalytic depolymerization of waste polyester mooring lines from oil and gas offshore platforms made of poly(ethylene terephthalate) (PET). **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 709–718, 1 mar. 2022.
- DE CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.
- DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, p. 1085–1093, 2015.
- DE OLIVEIRA, C. T. et al. Production of cutinase by solid-state fermentation and its use as adjuvant in bioherbicide formulation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 829–838, 9 maio 2019a.

- DE OLIVEIRA, C. T. et al. Production of cutinase by solid-state fermentation and its use as adjuvant in bioherbicide formulation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 829–838, 9 maio 2019b.
- DEGANI, O.; GEPSTEIN, S.; DOSORETZ, C. G. Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102, p. 277–289, 2002.
- DEKOSTER, G. T.; ROBERTSON, A. D. Thermodynamics of unfolding for kazal-type serine protease inhibitors: Entropic stabilization of ovomucoid first domain by glycosylation. **Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 2323–2331, 25 fev. 1997.
- DEMIR, H.; TARI, C. Bioconversion of wheat bran for polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in tray type solid-state fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 106, p. 60–66, 1 jan. 2016.
- DESGRANGES, C. et al. Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 200–205, maio 1991.
- DI LUCCIO, M. et al. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, 2004.
- DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 28, n. 2, p. 235–242, 1 mar. 1986.
- DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Purification, characterization and rôle in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 3, p. 333–347, 1 maio 1982.
- DICKMAN, M. B.; PODILA, G. K.; KOLATTUKUDY, P. E. Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. **Nature**, v. 342, n. 6248, p. 446–448, 1 nov. 1989.

DIMAROGONA, M. et al. Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, p. 2308–2317, 2015a.

DIMAROGONA, M. et al. Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 11, p. 2308–2317, 5 nov. 2015b.

DONG, Q. et al. Structure-guided engineering of a *Thermobifida fusca* cutinase for enhanced hydrolysis on natural polyester substrate. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2020.

DUAN, X. et al. High-level expression of codon-optimized *Thielavia terrestris* cutinase suitable for ester biosynthesis and biodegradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 768–775, 15 ago. 2019.

DUTTA, K.; DASU, V. V. Synthesis of short chain alkyl esters using cutinase from *Burkholderia cepacia* NRRL B2320. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3–4, p. 150–156, 1 nov. 2011.

DUTTA, K.; SEN, S.; VEERANKI, V. D. Production, characterization and applications of microbial cutinases. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 127–134, 2009.

EGMOND, M. R.; DE VLIEG, J. *Fusarium solani* pisi cutinase. **Biochimie**, v. 82, p. 1015–1021, 2000.

ESCOBAR, J.; BARNETT, S. Synthesis of acid protease from *Mucor miehei*: integration of production and recovery. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 695–700, 1 jan. 1995.

ETTINGER, W. F.; KOLATTUKUDY, P. E.; THUKRAL, S. K. Structure of Cutinase Gene, cDNA, and the Derived Amino Acid Sequence from Phytopathogenic Fungi. **Biochemistry**, v. 26, n. 24, p. 7883–7892, 1987.

EUGENIO, E. DE Q. et al. Kinetic Modeling of the Post-consumer Poly(Ethylene Terephthalate) Hydrolysis Catalyzed by Cutinase from *Humicola insolens*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 30, n. 4, p. 1627–1637, 1 abr. 2022.

- FATHI-ROUDSARI, M.; AKHAVIAN-TEHRANI, A.; MAGHSOUDI, N. Comparison of three *Escherichia coli* strains in recombinant production of reteplase. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 16–22, 1 jan. 2016.
- FERRÈ, F.; CLOTE, P. DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server issue, p. W230, 7 jul. 2005.
- FERREIRA, R. et al. Isolation of suberin from birch outer bark and cork using ionic liquids: A new source of macromonomers. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 520–527, 1 jan. 2013.
- FETT, W. F. et al. Cutinase Production by *Streptomyces* spp. **Current Microbiology**, v. 25, p. 165–171, 1992.
- FETT, W. F. et al. Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC 27730. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 561–568, 1 abr. 1999.
- FETT, W. F. et al. Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 25–29, 1 jul. 2000.
- FRAGA, L. P.; CARVALHO, P. O.; MACEDO, G. A. Production of cutinase by *Fusarium oxysporum* on brazilian agricultural by-products and its enantioselective properties. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 138–146, 2012.
- GALERA, J. S. **Substituição parcial da farinha de trigo por farinha de arroz (*Oryza sativa* L.) na produção de “sonho” - estudo modelo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 21 set. 2006.
- GANGADHARAPP, B. S. et al. Reverse micelles as a bioseparation tool for enzymes. **Journal of Proteins & Proteomics**, v. 8, n. 2, p. 105–120, 15 jun. 2017.
- GASTEIGER, E. et al. **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server**. [s.l.] Humana Press, 2005.
- GIGLI, M. et al. Enzymatic hydrolysis of poly(1,4-butylene 2,5-thiophenedicarboxylate) (PBTF) and poly(1,4-butylene 2,5-furandicarboxylate) (PBF) films: A comparison of mechanisms. **Environment International**, v. 130, p. 1–7, 1 set. 2019.

- GRISWOLD, K. E. et al. Effects of codon usage versus putative 5'-mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm. **Protein Expression and Purification**, v. 27, n. 1, p. 134–142, 1 jan. 2003.
- GU, S. et al. Characteristics of a recombinant *Fusarium verticillioides* cutinase and its effects on enzymatic hydrolysis of rice straw. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 171, p. 382–388, 28 fev. 2021.
- GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. S1, p. S162–S173, 1 jun. 2009.
- GUI, Y. J. et al. A *verticillium dahhiae* extracellular cutinase modulates plant immune responses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31, n. 2, p. 260–273, 1 fev. 2018.
- GUO, Y.; KANNAN, K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 24, p. 14442–14449, 17 dez. 2013.
- GUPTA, R.; BRUNAK, S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. **Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing**, p. 310–322, 2002.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p. 763–781, 2004.
- HAERNVALL, K. et al. Enzymes as Enhancers for the Biodegradation of Synthetic Polymers in Wastewater. **ChemBioChem**, v. 19, n. 4, p. 317–325, 16 fev. 2018.
- HALONEN, P. et al. A high throughput profiling method for cutinolytic esterases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6–7, p. 394–399, 8 jun. 2009.
- HEINEN, W. Über den enzymatischen cutin-abbau. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 9, n. 2, p. 167–190, 1 maio 1960.
- HEINEN, W. Über den enzymatischen Cutin-Abbau - III. Mitteilung Die enzymatische Ausrüstung von *Penicillium spinulosum* zum Abbau der Cuticularbestandteile. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 41, n. 3, p. 268–281, set. 1962.

- HELLECKES, L. M. et al. Explore or exploit? A model-based screening strategy for PETase secretion by *Corynebacterium glutamicum*. **Biotechnology and Bioengineering**, 11 nov. 2022.
- HEMMERICH, J. et al. Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 208, 7 dez. 2016.
- HEMMERICH, J. et al. Combinatorial impact of Sec signal peptides from *Bacillus subtilis* and bioprocess conditions on heterologous cutinase secretion by *Corynebacterium glutamicum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 3, p. 644–655, 31 mar. 2019.
- HEREDIA, A. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1620, p. 1–7, 2003.
- HEREDIA-GUERRERO, J. A. et al. Plant cuticle under global change: Biophysical implications. **Global Change Biology**, v. 24, n. 7, p. 2749–2751, 1 jul. 2018.
- HERRERO ACERO, E. et al. Enzymatic surface hydrolysis of PET: Effect of structural diversity on kinetic properties of cutinases from *Thermobifida*. **Macromolecules**, v. 44, n. 12, p. 4632–4640, 28 jun. 2011.
- HONG, R. et al. High-level expression of *Humicola insolens* cutinase in *Pichia pastoris* without carbon starvation and its use in cotton fabric bioscouring. **Journal of Biotechnology**, v. 304, p. 10–15, 10 out. 2019.
- HU, X. et al. Enzymatic degradation of poly(butylene succinate) by cutinase cloned from *Fusarium solani*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 134, p. 211–219, 19 out. 2016.
- ICHIKAWA, H. et al. Improved recombinant protein production in *Aspergillus oryzae* lacking both α -1,3-glucan and galactosaminogalactan in batch culture with a lab-scale bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 133, n. 1, p. 39–45, 1 jan. 2022.
- JABLOUNE, R. et al. Enzymatic Degradation of p-Nitrophenyl Esters, Polyethylene Terephthalate, Cutin, and Suberin by Sub1, a Suberinase Encoded by the Plant Pathogen *Streptomyces scabies*. **Microbes Environmental**, v. 35, n. 1, p. 1–7, 27 fev. 2020.
- JOO, S. et al. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2018.

JULIANO, B. O.; TUAÑO, A. P. P. Gross structure and composition of the rice grain. Em: **Rice: Chemistry and Technology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 31–53.

KAMARUDDIN, N. et al. Reduction of Extracellular Proteases Increased Activity and Stability of Heterologous Protein in *Aspergillus niger*. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 43, p. 3327–3338, 2018.

KANGWA, M.; SALGADO, J. A. G.; FERNANDEZ-LAHOIRE, H. M. Identification and characterization of N-glycosylation site on a *Mucor circinelloides* aspartic protease expressed in *Pichia pastoris*: effect on secretion, activity and thermo-stability. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2018.

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 9, p. 5867–5881, 14 set. 2020.

KARTHIKRAJ, R. et al. Parabens and Their Metabolites in Pet Food and Urine from New York State, United States. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3727–3737, 20 mar. 2018.

KAWAI, F. et al. A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 10053–10064, 15 jun. 2014.

KAWAI, F. The Current State of Research on PET Hydrolyzing Enzymes Available for Biorecycling. **Catalysts**, v. 11, n. 2, p. 206, 3 fev. 2021.

KAWAI, F.; KAWABATA, T.; ODA, M. Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 11, p. 4253–4268, 4 jun. 2019.

KAWAI, F.; KAWABATA, T.; ODA, M. Current State and Perspectives Related to the Polyethylene Terephthalate Hydrolases Available for Biorecycling. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 24, p. 8894–8908, 22 jun. 2020.

KAZENWADEL, C. et al. Thiol-functionalization of acrylic ester monomers catalyzed by immobilized *Humicola insolens* cutinase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 1, p. 9–15, 10 jun. 2012.

- KLEEBERG, I. et al. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1731–1735, 1998.
- KOLATTUKUDY, P. E. Biosynthesis of a lipid polymer, cutin: The structural component of plant cuticle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 41, n. 2, p. 299–305, 23 out. 1970.
- KOLATTUKUDY, P. E. Enzymatic Penetration of the Plant Cuticle by Fungal Pathogens. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.001255>, v. 23, n. 1, p. 223–250, 28 nov. 1985.
- KOLATTUKUDY, P. E. Polyesters in higher plants. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 71, p. 1–49, 2001.
- KOLATTUKUDY, P.; POULOSE, A. J. **Enzymes as agricultural chemical adjuvants**. Estados Unidos, 1996.
- KOLD, D. et al. Thermodynamic and structural investigation of the specific SDS binding of *humicola insolens* cutinase. **Protein Science**, v. 23, n. 8, p. 1023–1035, 1 ago. 2014.
- KOSIOROWSKA, K. E. et al. Efficient biodegradation of aliphatic polyester by genetically engineered strains of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 161, p. 1–9, 1 jul. 2021.
- KOSIOROWSKA, K. E. et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for poly(ethylene terephthalate) degradation. **Science of The Total Environment**, v. 831, p. 154841, 20 jul. 2022.
- KUBICEK, C. P.; STARR, T. L.; GLASS, N. L. Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>, v. 52, p. 427–451, 4 ago. 2014.
- KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2012.716810>, v. 33, n. 4, p. 365–378, dez. 2013.
- KWON, M. A. et al. High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 68, n. 1, p. 104–109, nov. 2009.

- LEE, S. H.; SONG, S. W.; KIM, H. R. Cutinase treatment of cotton fabrics. **Fibers and Polymers**, v. 10, n. 6, p. 802–806, 2009.
- LI, C. et al. Promising advancement in fermentative succinic acid production by yeast hosts. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, 5 jan. 2021.
- LI, Q. et al. Computational design of a cutinase for plastic biodegradation by mining molecular dynamics simulations trajectories. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 459–470, 1 jan. 2022a.
- LI, Z. et al. Structural insight and engineering of a plastic degrading hydrolase Ple629. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 626, p. 100–106, 20 out. 2022b.
- LIAO, C.; LIU, F.; KANNAN, K. Occurrence of and dietary exposure to parabens in foodstuffs from the united states. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 8, p. 3918–3925, 16 abr. 2013.
- LIMA, P. R. F.; MACHADO-NETO, J. G. Optimizing Fluazifop-P-Butyl Application on Postemergence Soybeans (*Glycine max*). **Planta Daninha**, v. 19, p. 85–95, 2001.
- LIN, T. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Induction of a biopolyester hydrolase (Cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *lisi*. **Journal of Bacteriology**, v. 133, n. 2, p. 942–951, 1978.
- LIN, T. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from phytopathogenic fungi. **Physiological Plant Pathology**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 1 jul. 1980a.
- LIN, T.-S.; KOLATTUKUDY, P. E. Structural studies on cutinase, a glycoprotein containing novel amino acids and glucuronic acid amide at the N terminus. **European Journal of Biochemistry**, v. 106, n. 2, p. 341–351, 1 maio 1980b.
- LINSKENS, H. F.; HAAGE, P. Cutinase-Nachweis in phytopathogenen Pilzen. **Journal of Phytopathology**, v. 48, n. 3, p. 306–311, 1 ago. 1963.
- LIU, L. et al. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: Strategies and perspectives. **Bioengineered**, v. 4, n. 4, p. 212–223, jul. 2013a.

- LIU, L. et al. Recent advances in recombinant protein expression by *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, and *Streptomyces*: From transcription and translation regulation to secretion pathway selection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 22, p. 9597–9608, 26 dez. 2013b.
- LIU, M. et al. Engineering a Chimeric Lipase-cutinase (Lip-Cut) for Efficient Enzymatic Deinking of Waste Paper | Liu | BioResources. **BioResources**, v. 13, n. 1, p. 981–996, 2018.
- LIU, M. et al. Efficient enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone) by an engineered bifunctional lipase-cutinase. **Polymer Degradation and Stability**, v. 160, p. 120–125, 1 fev. 2019.
- LIU, Z.; ZHANG, Y.; WU, J. Enhancement of PET biodegradation by anchor peptide-cutinase fusion protein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 156, p. 1–6, 1 maio 2022.
- LOBSTEIN, J. et al. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 56, p. 1–16, 8 maio 2012.
- LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D490–D495, 1 jan. 2014.
- LÓPEZ-LLANO, J. et al. α -helix stabilization by alanine relative to glycine: Roles of polar and apolar solvent exposures and of backbone entropy. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 64, n. 3, p. 769–778, 15 ago. 2006.
- LU, H. et al. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. **Nature**, v. 604, n. 7907, p. 662–667, 27 abr. 2022.
- LU, L. et al. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Cutinase Gene Family in *Rhizoctonia cerealis* and Functional Study of an Active Cutinase RcCUT1 in the Fungal–Wheat Interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1813, p. 1–13, 7 ago. 2018.
- MACEDO, G.; FRAGA, L. Production of cutinase by *Fusarium oxysporum* in solid-state fermentation using agro-industrial residues. **Journal of Biotechnology**, v. 131S, p. S211–S241, 2007.
- MAITI, I. B.; KOLATTUKUDY, P. E. Prevention of fungal infection of plants by specific inhibition of cutinase. **Science**, v. 205, n. 4405, p. 507–508, 3 ago. 1979.

- MAITI, I. B.; KOLATTUKUDY, P. E.; SHAYKH, M. Purification and characterization of a novel cutinase from Nasturtium (*Tropaeolum majus*) pollen? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 196, n. 2, p. 412–423, 1979.
- MALAK, A.; BARONIAN, K.; KUNZE, G. Blastobotrys (*Arxula*) adenivorans : a promising alternative yeast for biotechnology and basic research. **Yeast**, v. 33, n. 10, p. 535–547, 1 out. 2016.
- MANSOUR, A. A. et al. Review of solid state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: challenges for environmental applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, p. 31–46, 2016.
- MARTEN, E.; MÜLLER, R. J.; DECKWER, W. D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic–aromatic copolyesters. **Polymer Degradation and Stability**, v. 88, n. 3, p. 371–381, 1 jun. 2005.
- MARTINEZ, C. et al. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. **Nature**, v. 356, p. 615–617, 1992.
- MARTÍNEZ, R.; SCHWANEBERG, U. A roadmap to directed enzyme evolution and screening systems for biotechnological applications. **Biological Research**, v. 46, n. 4, p. 395–405, 2013.
- MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365–373, 2011.
- MENG, S.-X. et al. Enhanced enzymatic reaction by aqueous two-phase systems using parallel-laminar flow in a double Y-branched microfluidic device. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, p. 392–400, mar. 2018.
- MENG, X. et al. Developing fungal heterologous expression platforms to explore and improve the production of natural products from fungal biodiversity. **Biotechnology Advances**, v. 54, 1 jan. 2022.
- MOLDES, D. et al. Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. **Chemosphere**, v. 51, n. 4, p. 295–303, 1 abr. 2003.

- MUSIL, M. et al. Computational Design of Stable and Soluble Biocatalysts. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 2, p. 1033–1054, 1 fev. 2019.
- NAGHDI, M. et al. **Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. Environmental Pollution** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2018.
- NAKAMURA, A. et al. Positive charge introduction on the surface of thermostabilized PET hydrolase facilitates PET binding and degradation. **ACS Catalysis**, v. 11, p. 8550–8564, 2021.
- NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 6, p. 732–737, 1 dez. 1999.
- NASCIMENTO, G. C. et al. Physical and chemical characterization of husk ash rice originating in the thermoelectric process in south of Santa Catarina-Brazil. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, p. 634–640, 11 set. 2015.
- NEVALAINEN, H.; PETERSON, R. Making recombinant proteins in filamentous fungi- Are we expecting too much? **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. FEB, 27 fev. 2014.
- NEVALAINEN, K. M. H.; TE’O, V. S. J.; BERGQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 468–474, 1 set. 2005.
- NIKOLAIVITS, E. et al. Microbial host selection and periplasmic folding in Escherichia coli affect the biochemical characteristics of a cutinase from Fusarium oxysporum. **Protein Expression and Purification**, v. 127, p. 1–7, 11 jun. 2016.
- NIKOLAIVITS, E. et al. A middle-aged enzyme still in its prime: Recent advances in the field of cutinases. **Catalysts**, v. 8, n. 612, p. 1–28, 1 dez. 2018.
- NOVY, V. et al. Phylogenetic analysis and in-depth characterization of functionally and structurally diverse CE5 cutinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 5, 1 nov. 2021.
- NYSSÖLÄ, A. Which properties of cutinases are important for applications? **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, p. 4931–4942, 2015.

ODA, M. et al. Enzymatic hydrolysis of PET: functional roles of three Ca²⁺ ions bound to a cutinase-like enzyme, Cut190*, and its engineering for improved activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 23, p. 10067–10077, 1 dez. 2018.

OH, Y. R. et al. Secretory production of an engineered cutinase in *Bacillus subtilis* for efficient biocatalytic depolymerization of polyethylene terephthalate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 45, n. 4, p. 711–720, 1 abr. 2022.

PANDEY, A. Effect of particle size of substrate of enzyme production in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 37, n. 2, p. 169–172, 1 jan. 1991.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.

PEDROSO, R. B. **Caracterização de produtos da industrialização de arroz para uso em nutrição de ruminantes**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 20 nov. 2019.

PFAFF, L. et al. Multiple Substrate Binding Mode-Guided Engineering of a Thermophilic PET Hydrolase. **ACS Catalysis**, v. 12, n. 15, p. 9790–9800, 5 ago. 2022.

PING, L. F. et al. Application and comparison in biosynthesis and biodegradation by *Fusarium solani* and *Aspergillus fumigatus* cutinases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1238–1245, 1 nov. 2017.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 613–619, 2007.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Cutinase production by *Fusarium oxysporum* in liquid medium using central composite design. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 59–67, 2008.

PONTRELLI, S. et al. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 50, p. 16–46, 2018.

POSTEMSKY, P. D. et al. Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. **Bioresource Technology**, v. 231, p. 85–93, 2017.

- POTUMARTHI, R. et al. Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochete chrysosporium* for improved production of reducing sugars. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 113–117, 2013.
- POULOSE, A.; BOSTON, M. **Enzyme assisted degradation of surface membranes of harvested fruits and vegetables**. Estados Unidos, 1994.
- PURDY, R. E.; KOLATTUKUDY, P. E. Hydrolysis of Plant Cuticle by Plant Pathogens. Properties of Cutinase I, Cutinase II, and a Nonspecific Esterase Isolated from *Fusarium solani* pisi. **Biochemistry**, v. 14, n. 13, p. 2832–2840, 1 jul. 1975a.
- PURDY, R. E.; KOLATTUKUDY, P. E. Hydrolysis of Plant Cuticle by Plant Pathogens. Purification, Amino Acid Composition, and Molecular Weight of Two Isoenzymes of Cutinase and a Nonspecific Esterase from *Fusarium Solani* f. Pisi. **Biochemistry**, v. 14, n. 13, p. 2824–2831, 1 jul. 1975b.
- QUEVILLON, E. et al. InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server issue, p. 116–120, 1 jul. 2005.
- QUIROZ, R. D. LA C. et al. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-stat...: EBSCOhost. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 326–333, 2015.
- RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 161–179, mar. 2006.
- RAJAN, A.; SUDHA, J. D.; ABRAHAM, T. E. Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 1, p. 50–59, 1 jan. 2008.
- RASCHMANOVÁ, H. et al. Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 3, p. 641–665, 1 maio 2018.
- RIBITSCH, D. et al. Small cause, large effect: Structural characterization of cutinases from *Thermobifida cellulolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 11, p. 2481–2488, 1 nov. 2017.
- RIGGS, P. D. Overview of Protein Expression Vectors for *E. coli*. **Current Protocols in Essential Laboratory Techniques**, v. 17, n. 1, p. 1–22, 1 nov. 2018.

- RONKVIST, Å. M. et al. Cutinase-Catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). **Macromolecules**, v. 42, n. 14, p. 5128–5138, 28 jul. 2009.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 172, 17 abr. 2014.
- ROSATO, A. et al. Enzymatic Degradation of the Most Common Aliphatic Bio-Polyesters and Evaluation of the Mechanisms Involved: An Extended Study. **Polymers**, v. 14, n. 9, 1 maio 2022.
- RYAN, C. A. et al. Surface signaling in pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 10, p. 4080–4087, 9 maio 1995.
- SAGT, C. M. J. et al. Introduction of an N-Glycosylation Site Increases Secretion of Heterologous Proteins in Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4944, 2000.
- SAKEKAR, A. A.; GAIKWAD, S. R.; PUNEKAR, N. S. Protein expression and secretion by filamentous fungi. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 1, p. 1–18, 1 dez. 2021.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1–17, 1 jan. 2004.
- SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001.
- SCHWEICKERT, P. G.; CHENG, Z. Application of Genetic Engineering in Biotherapeutics Development. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 15, n. 2, p. 232–254, 1 jun. 2020.
- SEBASTIAN, J.; KOLATTUKUDY, P. E. Purification and characterization of cutinase from a fluorescent Pseudomonas putida bacterial strain isolated from phyllosphere. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 263, n. 1, p. 77–85, 15 maio 1988.
- SEMAN, W. M. K. W. et al. High level expression of Glomerella cingulata cutinase in dense cultures of Pichia pastoris grown under fed-batch conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 184, p. 219–228, 6 jun. 2014.
- SHENTAL-BECHOR, D.; LEVY, Y. Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8256–8261, 17 jun. 2008.

- SHENTAL-BECHOR, D.; LEVY, Y. Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, n. 5, p. 524–533, 1 out. 2009.
- SHI, K. et al. Selective enzymatic degradation and porous morphology of poly(butylene succinate)/poly(lactic acid) blends. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 436–442, 1 abr. 2019.
- SHI, K. et al. Enzymatic hydrolysis of polyester: Degradation of poly(ϵ -caprolactone) by *Candida antarctica* lipase and *Fusarium solani* cutinase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 183–189, 1 fev. 2020a.
- SHI, K. et al. Preparation of porous materials by selective enzymatic degradation: effect of in vitro degradation and in vivo compatibility. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2020b.
- SHILLING, P. J. et al. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. **Communications Biology**, v. 3, n. 214, p. 1–8, 1 dez. 2020.
- SHIRKE, A. N. et al. Stabilizing Leaf and Branch Compost Cutinase (LCC) with Glycosylation: Mechanism and Effect on PET Hydrolysis. **Biochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1190–1200, 20 fev. 2018.
- SHISHIYAMA, J.; ARAKI, F.; AKAI, S. Studies on cutin-esterase II. Characteristics of cutin-esterase from *Botrytis cinerea* and its activity on tomato-cutin. **Plant and Cell Physiology**, v. 11, n. 6, p. 937–945, 1 dez. 1970.
- SINGHA, T. K. et al. Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. **Process Biochemistry**, v. 55, p. 17–31, 2017.
- SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13–18, 2009.
- SISILA, V. et al. Esterification of Polymeric Carbohydrate Through Congener Cutinase-Like Biocatalyst. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 1, p. 19–32, 1 jan. 2021.

SOARES JÚNIOR, M. S. et al. Qualidade de pães com farelo de arroz torrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 636–641, 2009.

SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, jan. 2017.

SOLIDAY, C. L.; KOLATTUKUDY, P. E. Isolation and characterization of a cutinase from *Fusarium roseum culmorum* and its immunological comparison with cutinases from *F. solani pisi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 176, n. 1, p. 334–343, 1 set. 1976.

SON, H. F. et al. Rational Protein Engineering of Thermo-Stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for Highly Efficient PET Degradation. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 4, p. 3519–3526, 5 abr. 2019.

SOOKSAI, T. et al. Production of cutinase from *Fusarium falciforme* and its application for hydrophilicity improvement of polyethylene terephthalate fabric. **3 Biotech**, v. 9, n. 11, 1 nov. 2019.

SORENSEN, J. D.; PETERSEN, E. I.; WIEBE, M. G. Production of *Fusarium solani* f. sp. *pisii* cutinase in *Fusarium venenatum* A3/5. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 8, p. 1227–1232, ago. 2007.

SPADIUT, O.; HERWIG, C. Dynamics in bioprocess development for *Pichia pastoris*. <http://dx.doi.org/10.4161/bioe.36152>, v. 5, n. 6, p. 401–404, 10 out. 2015.

SPERANZA, P.; CARVALHO, P. D. O.; MACEDO, G. A. Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. “**Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**”, v. 72, p. 181–186, 2011.

SPERANZA, P.; MACEDO, G. A. Biochemical characterization of highly organic solvent-tolerant cutinase from *Fusarium oxysporum*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 372–376, 2013.

SRINIVAS, M. R. S.; CHAND, N.; LONSANE, B. K. Use of Plackett-Burman design for rapid screening of several nitrogen sources, growth/product promoters, minerals and enzyme inducers for the production of alpha-galactosidase by *Aspergillus niger* MRSS 234 in solid state fermentation system. **Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 3, p. 139–144, mar. 1994.

- STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 10, p. 1478–1488, 5 maio 2013.
- STREDANSKY, M.; CONTI, E. Succinoglycan production by solid-state fermentation with *Agrobacterium tumefaciens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 332–337, set. 1999.
- SU, L. et al. Extracellular expression of *Thermobifida fusca* cutinase with pelB signal peptide depends on more than type II secretion pathway in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 204, p. 47–52, 9 abr. 2015.
- SU, L. et al. Enhanced activity towards polyacrylates and poly(vinyl acetate) by site-directed mutagenesis of *Humicola insolens* cutinase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1752–1759, 1 nov. 2020.
- SU, L.; HONG, R.; WU, J. Enhanced extracellular expression of gene-optimized *Thermobifida fusca* cutinase in *Escherichia coli* by optimization of induction strategy. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1039–1046, 1 jul. 2015.
- SULAIMAN, S. et al. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1556–1562, mar. 2012.
- SWEIGARD, J. A.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. Disruption of a *Maanaporthe arisea* cutinase gene. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 232, n. 2, p. 183–190, mar. 1992.
- TANG, Y. et al. Secretory expression and characterization of a novel peroxiredoxin for zearalenone detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Research**, v. 168, n. 1, p. 6–11, 15 jan. 2013.
- THEN, J. et al. A disulfide bridge in the calcium binding site of a polyester hydrolase increases its thermal stability and activity against polyethylene terephthalate. **FEBS Open Bio**, v. 6, n. 5, p. 425–432, 1 maio 2016.
- THERON, C. W. et al. Integrating metabolic modeling and population heterogeneity analysis into optimizing recombinant protein production by *Komagataella (Pichia) pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2017 102:1, v. 102, n. 1, p. 63–80, 14 nov. 2017.

- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.
- TOSUNER, Z. V.; TAYLAN, G. G.; ÖZMIHÇI, S. Effects of rice husk particle size on biohydrogen production under solid state fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 34, p. 18785–18791, 12 jul. 2019.
- TOURNIER, V. et al. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 216–219, 9 abr. 2020.
- VÁZQUEZ-ALCÁNTARA, L. et al. Expression of a Cutinase of *Moniliophthora roreri* with Polyester and PET-Plastic Residues Degradation Activity. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, 22 dez. 2021.
- WANG, C. et al. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. **Biochemistry**, v. 35, n. 23, p. 7299–7307, 11 jun. 1996.
- WATANABE, K.; SUZUKI, Y. Protein thermostabilization by proline substitutions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, n. 4, p. 167–180, 14 jun. 1998.
- WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.
- WEI, R. et al. Biocatalytic Degradation Efficiency of Postconsumer Polyethylene Terephthalate Packaging Determined by Their Polymer Microstructures. **Advanced Science**, v. 6, n. 14, p. 1900491, 20 jul. 2019.
- WEI, R.; ZIMMERMANN, W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1308–1322, 1 nov. 2017.
- WON, S.-J.; YIM, J. H.; KIM, H.-K. Functional production, characterization, and immobilization of a cold-adapted cutinase from Antarctic *Rhodococcus* sp. **Protein Expression and Purification**, v. 195–196, 1 ago. 2022.
- WORM, B. et al. Plastic as a Persistent Marine Pollutant. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102016-060700>, v. 42, p. 1–26, 17 out. 2017.

- XI, X. et al. Secretory expression in *Bacillus subtilis* and biochemical characterization of a highly thermostable polyethylene terephthalate hydrolase from bacterium HR29. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 143, p. 109715, 1 fev. 2021.
- XIE, Y.; HAN, X.; MIAO, Y. An Effective Recombinant Protein Expression and Purification System in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 123, n. 1, p. 1–16, 1 jul. 2018.
- YAMAGUCHI, S. et al. The consequences of engineering an extra disulfide bond in the *Penicillium camembertii* mono- and diglyceride specific lipase. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 9, n. 9, p. 789–795, 1 set. 1996.
- YANG, S. et al. Characterization of a cutinase from *Myceliophthora thermophila* and its application in polyester hydrolysis and deinking process. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 106–112, 1 mar. 2018.
- YAZID, N. A. et al. **Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. Sustainability (Switzerland)**MDPI AG, , 2017.
- ZABETAKIS, D. et al. Evaluation of Disulfide Bond Position to Enhance the Thermal Stability of a Highly Stable Single Domain Antibody. **PLOS ONE**, v. 9, n. 12, 19 dez. 2014.
- ZAVEC, D.; GASSER, B.; MATTANOVICH, D. Characterization of methanol utilization negative *Pichia pastoris* for secreted protein production: New cultivation strategies for current and future applications. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 5, p. 1405, 1 maio 2020.
- ZDOBNOV, E. M.; APWEILER, R. InterProScan – an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 847–848, 1 set. 2001.
- ZENG, W. et al. Substrate-Binding Mode of a Thermophilic PET Hydrolase and Engineering the Enzyme to Enhance the Hydrolytic Efficacy. **ACS Catalysis**, v. 12, n. 5, p. 3033–3040, 4 mar. 2022.
- ZHANG, J. et al. Evaluation and application of constitutive promoters for cutinase production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 538–544, 2017.

ZHANG, L.; LIU, W.-Q.; LI, J. Establishing a Eukaryotic *Pichia pastoris* Cell-Free Protein Synthesis System. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 536, p. 1–10, 18 jun. 2020.

ZHANG, T. et al. Regulating Strategies for Producing Carbohydrate Active Enzymes by Filamentous Fungal Cell Factories. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 691, p. 1–15, 8 jul. 2020a.

ZHANG, W. et al. Construction and characterization of a chimeric enzyme of swollenin and xylanase to improve soybean straw hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 558–564, 1 ago. 2020b.

ZHANG, Y. Y. et al. A new two-phase kinetic model of sporulation of *Clonostachys rosea* in a new solid-state fermentation reactor. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1119–1125, ago. 2013.

ZHANG, Z. et al. Depolymerization of post-consumer PET bottles with engineered cutinase 1 from *Thermobifida cellulolytica*. **Green Chemistry**, v. 24, n. 15, p. 5998–6007, 1 ago. 2022.

ZHIQIANG, L. et al. Structural and Functional Studies of *A. oryzae* Cutinase: Enhanced Thermostability and Hydrolytic Activity of Synthetic Ester and Polyester Degradation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 43, 11 nov. 2009.

ZHU, B.; WEI, N. Biocatalytic Degradation of Parabens Mediated by Cell Surface Displayed Cutinase. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 354–364, 2 jan. 2019.

ZIMMERMANN, W.; BILLIG, S. Enzymes for the Biofunctionalization of Poly(Ethylene Terephthalate). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 125, p. 97–120, 2011.

ZUMSTEIN, M. T. et al. Enzymatic Hydrolysis of Polyester Thin Films: Real-Time Analysis of Film Mass Changes and Dissipation Dynamics. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 197–206, 5 jan. 2016.

ANEXO A – Composição centesimal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone: (48) 3334-2047 / 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@contato.ufsc.br



RELATÓRIO DE ENSAIO

Protocolo: 3841 / 2019

Data de Entrada: 26/07/2019

Nome do Produto: **CASCA DE ARROZ**

Data de Fabricação: NA

Data de Vencimento: NA

Marca: NA

Temp. do Rec.da Amostra: AMB°C

Data e Hora da Coleta: NA

Nº do Lote: NA

Nº do Lacre: NA

N.Amostras: 1 Nº.Unid.Amostrais: 1

Peso/Volume: 500,0 gramas

Amostrado e Coletado por: Cliente

Embalagem: plástica

Fabricante: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Solicitante: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Responsável: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Av./Rua: luiz oscar de carvalho 75

Complemento: bloco a2 apto 31

CEP: 88036400

Bairro: trindade

UF: SC

Cidade: florianopolis

CNPJ/CPF: 031.063.890-95

Inscrição Estadual:

Observações Gerais:

RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 05/08/2019

DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 21/08/2019

TECNOLOGIA DE CEREAIS - CERES

Analista: Alicia de Francisco -

Fibra alimentar total

61,7 g / 100 g(*)

Metodologia(s):

(*)ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of the AOAC International, 18th ed. Maryland/USA: AOAC, 2005.

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S) ENSAIO(S)

Amostra analisada apresentou o resultado acima descrito.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 21 de Agosto de 2019

ALICIA DE FRANCISCO
DE CASAS:98402617972

Assinado de forma digital por ALICIA DE FRANCISCO DE CASAS:98402617972
Dados: 2019.08.21 14:11:09 -03'00'

Signatário Autorizado

Este protocolo foi emitido para WEB. É possível realizar a validação do mesmo pelo site: <http://www.labcal.ufsc.br>, clicando no menu VALIDAR LAUDO e informando o seguinte código: 4977.020 1938.410 0260.761

Documento Nº GG-POP 001-7.8	Revisão 05	Data da Emissão 18/03/2019	Página 1 de 1
--------------------------------	---------------	-------------------------------	------------------



RELATÓRIO DE ENSAIO

Protocolo: 3838 / 2019

Data de Entrada: 26/07/2019

Nome do Produto: **FARELO DE ARROZ**

Data de Fabricação: NA

Data de Vencimento: NA

Marca: NA

Temp. do Rec.da Amostra: AMB°C

Data e Hora da Coleta: NA

Nº do Lote: NA

Nº do Lacre: NA

N. Amostras: 1

Nº. Unid. Amostras: 1

Peso/Volume: 500,0 gramas

Amostrado e Coletado por: Cliente

Embalagem: plástica

Fabricante: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Solicitante: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Responsável: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Av./Rua: Luiz oscar de carvalho 75

Complemento: bloco a2 apto 31

Bairro: trindade

CEP: 88036400

Cidade: Florianópolis

UF: SC

CNPJ/CPF: 031.063.890-95

Inscrição Estadual:

Observações Gerais:

RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 30/07/2019

DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 21/08/2019

FÍSICO-QUÍMICA

Analista: Jusciele Nicolladelli Uller - RG: 4813952

Carboidratos totais (para VD)

25,9 g/100g (Método: RDC nº 360)

Gordura (lipídios)

19,84 g/100g (Método: IAL, p. 119)

Proteína

12,33 g/100g (N total X 5,75) (Método: AOAC, nº 991.20)

Resíduo mineral fixo

10,84 g/100g (Método: IAL, p. 105)

Umidade e voláteis

8,50 g/100g (Método: IAL, p. 98)

Metodologia(s):

(***)ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of the AOAC International, 20th ed. Maryland/USA: AOAC, 2016.

(**)INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4 ed. Brasília: Editora MS, 2005. 1018 p.

(*)BRASIL. Ministério da Saúde, ANVISA. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. D.O.U. de 26/12/2003. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 2003.

Documento N° GQ-POP 001-7.8	Revisão 05	Data da Emissão 18/03/2019	Página 1 de 2
--------------------------------	---------------	-------------------------------	------------------

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S)
ENSAIO(S)

Amostra analisada apresentou os resultados acima descritos.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 21 de Agosto de 2019

JORGE DOMINGOS
DE SOUSA:
07640578981

Assinado de forma digital por
JORGE DOMINGOS DE SOUSA:
07640578981
Dados: 2019.08.21 16:52:31 -03'00'

Signatário Autorizado

Este protocolo foi emitido para WEB. É possível realizar a validação do mesmo pelo site: <http://www.labcal.ufsc.br>, clicando no menu VALIDAR LAUDO e informando o seguinte código: 4977.020 1938.380 0260.739

Documento N° GQ-POP 001-7.8	Revisão 05	Data da Emissão 18/03/2019	Página 2 de 2
--------------------------------	---------------	-------------------------------	------------------



RELATÓRIO DE ENSAIO

Protocolo: 3839/2019

Data de Entrada: 26/07/2019

Nome do Produto: **FARELO DE ARROZ**

Data de Fabricação: NA

Data de Vencimento: NA

Marca: NA

Temp. do Rec.da Amostra: AMB°C

Data e Hora da Coleta: NA

Nº do Lote: NA

Nº do Lacre: NA

N. Amostras: 1

Nº. Unid. Amostras: 1

Peso/Volume: 500,0 gramas

Amostrado e Coletado por: Cliente

Embalagem: plástica

Fabricante: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Solicitante: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Responsável: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Av./Rua: Luiz oscar de carvalho 75

Complemento: bloco a2 apto 31

Bairro: trindade

CEP: 88036400

Cidade: florianopolis

UF: SC

CNPJ/CPF: 031.063.890-95

Inscrição Estadual:

Observações Gerais:

RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 05/08/2019

DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 21/08/2019

TECNOLOGIA DE CEREAIS - CERES

Analista: Alicia de Francisco -

Fibra alimentar total

22,6 g / 100 g(*)

Metodologia(s):

(*)ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of the AOAC International, 18th ed. Maryland/USA: AOAC, 2005.

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S) ENSAIO(S)

Amostra analisada apresentou o resultado acima descrito.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 21 de Agosto de 2019

ALICIA DE FRANCISCO DE
CASAS:98402617972

Assinado de forma digital por ALICIA
DE FRANCISCO DE CASAS:98402617972
Dados: 2019.08.21 14:10:32 -03'00'

Signatário Autorizado

Este protocolo foi emitido para WEB. É possível realizar a validação do mesmo pelo site: <http://www.labcal.ufsc.br>, clicando no menu VALIDAR LAUDO e informando o seguinte código: 4977.020 1938.390 0260.765

Documento Nº GQ-POP 001-7.8	Revisão 05	Data da Emissão 18/03/2019	Página 1 de 1
--------------------------------	---------------	-------------------------------	------------------



RELATÓRIO DE ENSAIO

Protocolo: 3840 / 2019

Data de Entrada: 26/07/2019

Nome do Produto: **CASCA DE ARROZ**

Data de Fabricação: NA

Data de Vencimento: NA

Marca: NA

Temp. do Rec.da Amostra: AMB°C

Data e Hora da Coleta: NA

Nº do Lote: NA

Nº do Lacre: NA

N. Amostras: 1

Nº. Unid. Amostras: 1

Peso/Volume: 500,0 gramas

Amostrado e Coletado por: Cliente

Embalagem: plástica

Fabricante: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Solicitante: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Responsável: CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA

Av./Rua: Luiz oscar de carvalho 75

Complemento: bloco a2 apto 31

Bairro: trindade

CEP: 88036400

Cidade: florianopolis

UF: SC

CNPJ/CPF: 031.063.890-95

Inscrição Estadual:

Observações Gerais:

RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 30/07/2019

DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 21/08/2019

FÍSICO-QUÍMICA

Analista: Jusciele Nicolladelli Uller - RG: 4813952

Carboidratos totais (para VD)

10,2 g/100g (Método: RDC nº 360)

Gordura (lipídios)

<0,1 g/100g (Método: IAL, p. 119)

Proteína

1,56 g/100g (N total X 5,75) (Método: AOAC, nº 991.20)

Resíduo mineral fixo

17,40 g/100g (Método: IAL, p. 105)

Umidade e voláteis

8,62 g/100g (Método: IAL, p. 98)

Metodologia(s):

(***)ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of the AOAC International, 20th ed. Maryland/USA: AOAC, 2016.

(**)INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4 ed. Brasília: Editora MS, 2005. 1018 p.

(*)BRASIL. Ministério da Saúde, ANVISA. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. D.O.U. de 26/12/2003. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 2003.

Documento N°	Revisão	Data da Emissão	Página
GQ-POP 001-7.8	05	18/03/2019	1 de 2

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S)
ENSAIO(S)

Amostra analisada apresentou os resultados acima descritos.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 21 de Agosto de 2019

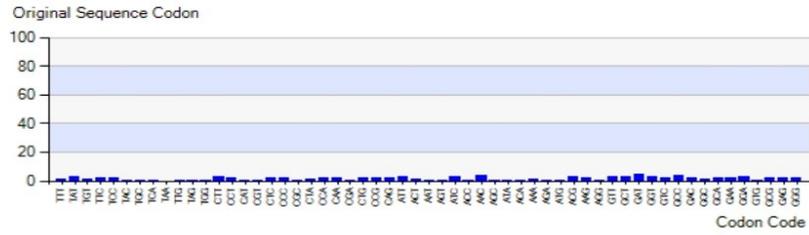
JORGE DOMINGOS
DE SOUSA:
07640578981

Assinado de forma digital por
JORGE DOMINGOS DE SOUSA:
07640578981
Dados: 2019.08.21 16:53:03 -03'00'

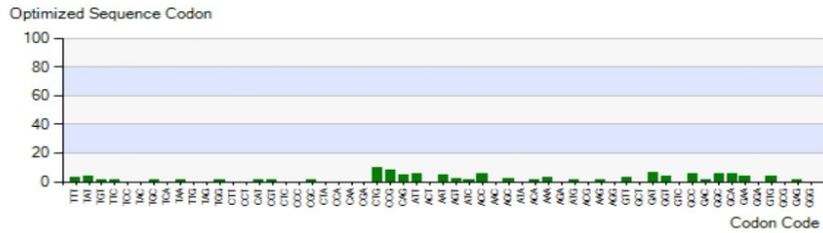
Signatário Autorizado

Este protocolo foi emitido para WEB. É possível realizar a validação do mesmo pelo site: <http://www.labcal.ufsc.br>, clicando no menu VALIDAR LAUDO e informando o seguinte código: 4977.020 1938.400 0260.735

Documento N° GQ-POP 001-7.8	Revisão 05	Data da Emissão 18/03/2019	Página 2 de 2
--------------------------------	---------------	-------------------------------	------------------



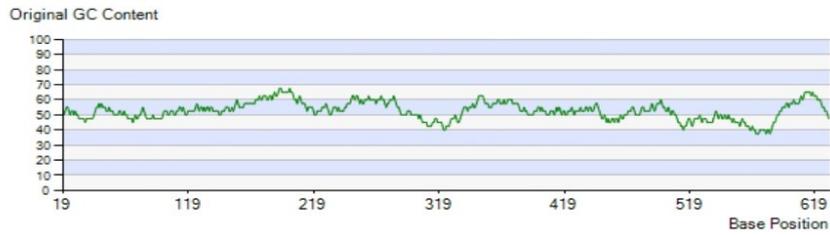
Before Optimization



After Optimization

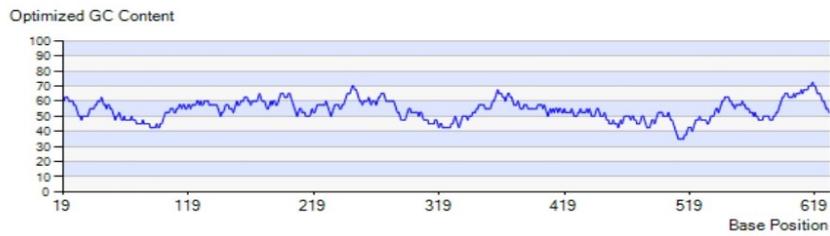
3.GC Content:

The comparison of GC content between original sequence and optimized sequence



GC: 0.52

Before Optimization



GC: 0.54

After Optimization

4. Restriction Enzyme And Avoid Sequence

Restriction Name	Original	Optimization
BamHI	0	0
BglII	1	0
EcoRI	1	0
HindIII	0	0
KpnI	0	0
SacI	0	0
SalI	0	0
SpeI	0	0
XbaI	0	0
XhoI	0	0
NotI	0	0

Removed	Original	Optimization
GGTAAG	0	0
GGTGAT	0	0
AATAAA	0	0
ATTAAA	0	0
ATTTA	0	0
TTTTT	0	0
AAAAAAA	0	0
AGGTATGT	0	0
ATTTA	0	0
GATC	0	0
MAGGTRAGT	0	0
TACTAAC	0	0
TATAAA	0	0
TATATA	0	0
TTATTTATT	0	0
YYYYNTAGG	0	0

5. Removed Repeats

Before Optimization

After Optimization

6. Optimized Sequence

TTCCCGACCGCCAGTAGCAATAAGAAACGTGCCGTGGCCGCACAGGATGTTAATCTGCTGGAAGCACGCGATCTGCT

GAATCGCAATGATATTGAAGATGGTGACAGCAGTAGCTGCCCGCCGGCAATTCTGATCTATGCACGTGGCAGTACCGA
ACCGGGCAATCTGGGTATTACCGTGGGCCCGATTCTGGCCGAAGCAATGCAGCTGGCCATTCCGGATATTGGATTCA
GGGCGTGGGTGGTCCGTATAACCGCGATCTGGCCCCGAATTTCTGCCGAAGGCACCACCGATGCAAGTATTGATGA
AGCCAAACGCCTGTTTCAGATGGCCTATGATAAATGTCCGGATACCCCGTGGTGACCGCAGGCTATAGCCAGGGTAC
AGTGGTTGTTGGCTATGCCCTGAGCGAACTGCAGATTGCAGTGCAGAATCAGGTTGTTGGCGCAGCACTGTTTGGCT
ATACCAAAAATGAACAGCTGGGCGGTTCGTATTCCGAATTATCCGACCGATAAAACCAAAATTTCTGCCTGCCGACCG
ATCTGGTGTGCGATGGCACCTGTTTATTCTGCCGGCACATTTCTGTATGGTGCCGATGCCGACGGCCCGGTCCGG
AGTTTCTGGTTGGCCAGATTAATGAATAA

7. Protein Alignment

Original Protein

FPTASSNKRAVAQAQDVNLEARDLLNRNDIEDGSSSCPAILIYARGSTEPGNLGITVGPILAEAMQLAIPDIWIQVGG
PYTADLAPNFLPEGTTDASIDEAKRLFQMAVDKCPDTPVVTAGYSQGTVVVGYALSELQIAVQNQVVGAAALFGYTKNEQ
LGGRIPTYDKTKIFCLPTDLVCDGTLFILPAHFLYGADAAGPGPEFLVQINE*

Optimized Protein

FPTASSNKRAVAQAQDVNLEARDLLNRNDIEDGSSSCPAILIYARGSTEPGNLGITVGPILAEAMQLAIPDIWIQVGG
PYTADLAPNFLPEGTTDASIDEAKRLFQMAVDKCPDTPVVTAGYSQGTVVVGYALSELQIAVQNQVVGAAALFGYTKNEQ
LGGRIPTYDKTKIFCLPTDLVCDGTLFILPAHFLYGADAAGPGPEFLVQINE*

8. DNA Alignment

Original DNA

TTCCCAACAGCGTCCCAAACAAAAAGAGAGCCGTGCTGCCAAGATGTCAACCTACTTGAAGCCCGAGACCTTCT
CAACCGCAATGATATTGAGGATGGGGATTCTCCAGTTGTCCCCAGCAATTCTGATCTATGCGCGTGGTAGCACAGA
ACCTGGCAACCTTGGAAATCACGGTTGGGCCGATCCTCGCAGAGGCCATGCAGCTCGCTATCCAGACATCTGGATAC
AAGGTGTTGGTGGGCCCTATACGGCTGATCTCGCGCCAACTTCTTCCGGAGGGGACTACTGATGCCCTCCATTGATG
AAGCTAAAAGGCTGTTCCAAATGGCTACGATAAGTGCCAGATACGCCCGTCGTGACGGCTGTTATAGTCAAGGC
ACGTTGTCGTGGATGCACTCAGCGAACTTCAAATCGCCGTCCAGAACCAGGTTGTTGGAGCTGCCTTGTGG
ATATACCAAGAACGAGCAGCTTGGGGCCGTATTCCGAATCTTACGGACAAAACCAAGATCTTGTCTGCCTAC
GGATCTAGTGTGTGACGGAACCTTGTTCATTCTCTGCTCAATTTCTAATCGGTGCAGATGCCGCGGGTCCAGGTCCG
GAATTCCTGGTTGGACAGATTAATGAGTAG

Optimized DNA

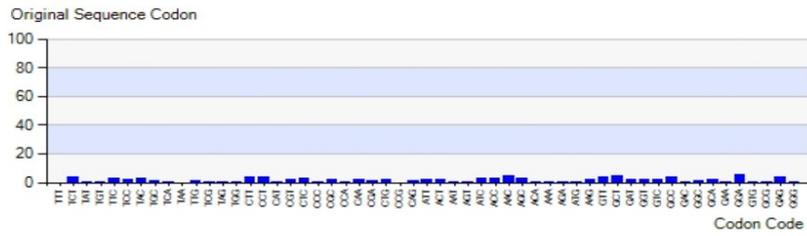
TTCCCGACCGCCAGTAGCAATAAGAAACGTGCCGTGGCCGACAGGATGTTAATCTGCTGGAAGCACCGGATCTGCT
GAATCGCAATGATATTGAAGATGGTGACAGCAGTAGCTGCCCGCCGGCAATTCTGATCTATGCACGTGGCAGTACCGA
ACCGGGCAATCTGGGTATTACCGTGGGCCCGATTCTGGCCGAAGCAATGCAGCTGGCCATTCCGGATATTGGATTCA
GGGCGTGGGTGGTCCGTATAACCGCGATCTGGCCCCGAATTTCTGCCGAAGGCACCACCGATGCAAGTATTGATGA
AGCCAAACGCCTGTTTCAGATGGCCTATGATAAATGTCCGGATACCCCGTGGTGACCGCAGGCTATAGCCAGGGTAC
AGTGGTTGTTGGCTATGCCCTGAGCGAACTGCAGATTGCAGTGCAGAATCAGGTTGTTGGCGCAGCACTGTTTGGCT
ATACCAAAAATGAACAGCTGGGCGGTTCGTATTCCGAATTATCCGACCGATAAAACCAAAATTTCTGCCTGCCGACCG
ATCTGGTGTGCGATGGCACCTGTTTATTCTGCCGGCACATTTCTGTATGGTGCCGATGCCGACGGCCCGGTCCGG
AGTTTCTGGTTGGCCAGATTAATGAATAA

9.Codon Used Table

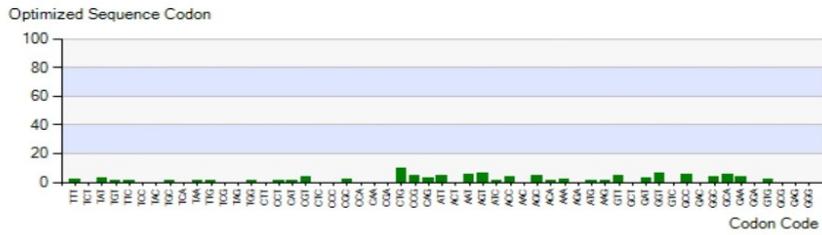
TTT [56791]	TCT [30494]	TAT [50400]	TGT [13662]
TTC [32513]	TCC [22637]	TAC [27239]	TGC [12777]
TTA [40627]	TCA [30502]	TAA [4664]	TGA [2674]
TTG [30084]	TCG [19071]	TAG [751]	TGG [31207]
CTT [33816]	CCT [22121]	CAT [28919]	CGT [37134]
CTC [22074]	CCC [14379]	CAC [17117]	CGC [32720]
CTA [12951]	CCA [21237]	CAA [33607]	CGA [11216]
CTG [87261]	CCG [33795]	CAG [62329]	CGG [18434]
ATT [68942]	ACT [30518]	AAT [68348]	AGT [30749]
ATC [45213]	ACC [44139]	AAC [47233]	AGC [33255]
ATA [31065]	ACA [35293]	AAA [86726]	AGA [16583]
ATG [55356]	ACG [31794]	AAG [35652]	AGG [9238]
GTT [50261]	GCT [44034]	GAT [78663]	GGT [55283]
GTC [30515]	GCC [50411]	GAC [41619]	GGC [47962]
GTA [30461]	GCA [53619]	GAA [81727]	GGA [31729]
GTG [46309]	GCG [49169]	GAG [45154]	GGG [28720]



Biomatik
 Tel:(519) 489-7195,(800) 836-8089
 Fax:(519) 231-0140,(877) 221-3515
 Email:info@biomatik.com
 http://www.biomatik.com



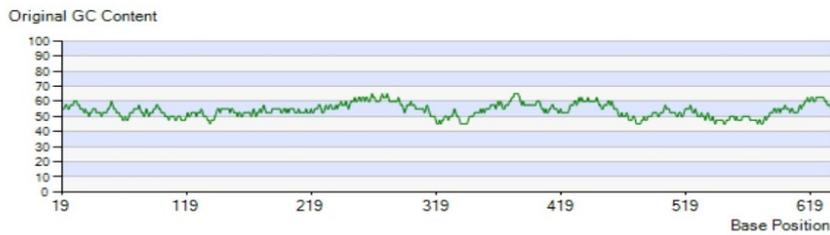
Before Optimization



After Optimization

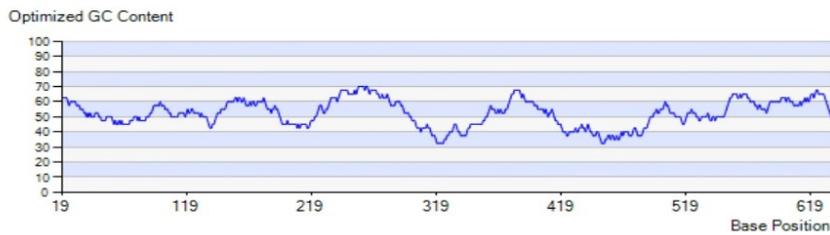
3.GC Content:

The comparison of GC content between original sequence and optimized sequence



GC: 0.54

Before Optimization



GC: 0.52

After Optimization

Integrated Products & Services for Life Sciences



Biomatik
Tel:(519) 489-7195,(800) 836-8089
Fax:(519) 231-0140,(877) 221-3515
Email:info@biomatik.com
http://www.biomatik.com

4.Restriction Enzyme And Avoid Sequence

Restriction Name	Original	Optimization
BamHI	2	0
BglII	0	0
EcoRI	0	0
HindIII	0	0
KpnI	0	0
SacI	1	0
SalI	0	0
SpeI	0	0
XbaI	0	0
XhoI	2	0
NotI	0	0

Removed	Original	Optimization
GGTAAG	0	0
GGTGAT	0	0
AATAAA	0	0
ATTAAA	0	0
ATTTA	0	1
TTTTTT	0	0
AAAAAAA	0	0
AGGTATGT	0	0
ATTTA	0	0
GATC	0	0
MAGGTRAGT	0	0
TACTAAC	0	0
TATAAA	0	0
TATATA	0	0
TTATTTATT	0	0
YYYYNTAGG	0	0

5.Removed Repeats

Before Optimization
Max Reverse Length:12

After Optimization
Max Reverse Length:12

6.Optimized Sequence

Integrated Products & Services for Life Sciences



Biomatik
Tel: (519) 489-7195, (800) 836-8089
Fax: (519) 231-0140, (877) 221-3515
Email: info@biomatik.com
http://www.biomatik.com

CTGCCTACAGTAGCCCGCTGAGCGAACGTGAAGTGCTGGCAGAACTGGAAAACGTCAGAGTGGCAGTATTACCC
GTGATGATCTGAGTAATGGCGCAAGTAGCGCCTGTCCGCCGTTATTTTATCTATGCCCGTGGTAGCACCGAACTGG
GTAATCTGGGTACTACTGGGCCCGCGTGTGCAAGTGTGCTGGAAAGCAATTATGGCAGTAATGGCGTTTGGATTACAG
GGTGTGGCGGTGCCTATCGCGCCACCCTGGGCGATAATGCCCTGCCCGTGGTACAAGCAGTGCAGCCATTCTGTA
AATGATTGGTCTGTTAATCTGGCAAATAGTAAATGCCCGAGTGCCAAAATTGTTGCAGGTGGCTATAGCCAGGGTGC
AGCACTGGCAGCCGCCAGCATTGAAGATTGAGTACCAGTGTTCGAATAAGGTTGTTGGTACAGTCTGTTGGTTA
TACCAAAAATCTGCAGAATCTGGGTCGTATTCCGAATTATCCGCGCGAACGCACCCTGGTTTTCTGTAATTTGGCGAT
CTGGTGTGCACCGGTAGCCTGATTGTGGCCGACCGCATCTGGCATATCAGAGTGATGCAAGCGGTCCGGCCCCGCA
GTTTCTGATTACCGTGTGGCAGCCACCAGTATTAA

7. Protein Alignment

Original Protein

LPTSPLSEREVLAELEKRQSGSITRDDLSNGASSACPPVIFYARGSTELGNLGLGPRVASVLESNYGNGVWIQVGVGA
YRAILGDNALPRGTSSAAIREMIGLFLNLSKCPSAKIVAGGYSQGAALAAASIEDLSTSVRNKVVGTVLFYTKNLQNL
GRIPNYPRERTLVFCNFGDLVCTGSLIVAAPHLAYQSDASGPAPQFLIQRVAATSI*

Optimized Protein

LPTSPLSEREVLAELEKRQSGSITRDDLSNGASSACPPVIFYARGSTELGNLGLGPRVASVLESNYGNGVWIQVGVGA
YRAILGDNALPRGTSSAAIREMIGLFLNLSKCPSAKIVAGGYSQGAALAAASIEDLSTSVRNKVVGTVLFYTKNLQNL
GRIPNYPRERTLVFCNFGDLVCTGSLIVAAPHLAYQSDASGPAPQFLIQRVAATSI*

8. DNA Alignment

Original DNA

CTGCCTACTTCCAGCCCTCTCTCTGAGCGTGAAGTCTTGGCCGAGCTCGAGAAACGTCAATCCGGAAGCATCACTCG
CGATGATCTTTCCAACGGCGCTTCACTGCTGTGCCCTGTTAATTTTCTACTACGCTCGCGGTTCCACTGAGCTTGGAA
AACTTGGGAACACTTGGTCCTCGTGTGCTCTGTGCTTGGAGCAACTACGGTAGCAACGGAGTCTGGATCCAAGG
AGTTGGTGGAGCATAACCGTGTACCCTCGGAGACAACGCCCTTCTCGAGGAACCTCTTCGGCAGCCATCAGAGAGA
TGATCGGGCTGTTCAACCTTGCAAACTCAAAGTGCCCTTCTGCCAAGATTGTTGCCGGAGGGTACAGTCAAGGCGCT
GCTCTTGTGTCAGCCAGCATTGAGGATCTCAGCACTTCTGTCCGAACAAGGTCGTCCGACCGTCTGTTCCGATA
CACCAAGAACCTGCAGAATCTTGGTGCATTCCAACTACCCACGAGAGCGAACCTCGTTTTCTGCAACTTCGGAG
ACTTGGTTTGC ACTGGATCCTGATTGTGCTGCTCCTCATCTGGCTTATCAGTCTGATGCCTCTGGACCTGCACCCCA
ATTCTCATCCAGCGCTTGTGTCGACCTCTATCTAG

Optimized DNA

CTGCCTAC**CAGT**AGCCCG**CTGAGC**GAACGTGAAGT**GCTGGC**AGA**ACTGG**AAAACGTCAGAGTGGCAGTATTACCC
GTGATGATCT**GAGT**AATGGCG**CAAGTAGC**CGCTGTCCGCCGTTATTTTATCTATGCCCGTGGTAGCACCGAACTGG
GTAATCTGGGTACTACTGGGCCCGCGTGTG**CAAGT**GTGCT**GGAA**AGCAATTATGGCAGTAATGGCGTTTGGATT**CAG**
GGTGTGGCGGTGCCTATCGCGCCACCCTGGGCGATAATGCCCTGCCCGTGGTACA**AAGCAGT**GCAGCCATT**CTGTA**
AATGATTGGTCTGTTAATCTGGCAAAT**AGT**AAATGCCCGAGTGCCAAAATTGTTGCAGGTGGCTATAGCCAGGGTGC
AGCACTGGCAGCCGCCAGCATTGAAGATT**GAGTACCAGT**GTTCGAATAAGGTTGTTGGTACAGTCTGTTGGTTA
TACCAAAAATCTGCAGAATCTGGGTCGTATTCCGAATTATCCGCGCGAACGCACCCTGGTTTTCTGTAATTTGGCGAT
CTGGTGTGCACCGGTAGCCTGATTGTGGCCGACCGCATCTGGCATATCAGAGTGATGCAAGCGGTCCGGCCCCGCA

Integrated Products & Services for Life Sciences



Biomatik
Tel: (519) 489-7195, (800) 836-8089
Fax: (519) 231-0140, (877) 221-3515
Email: info@biomatik.com
<http://www.biomatik.com>

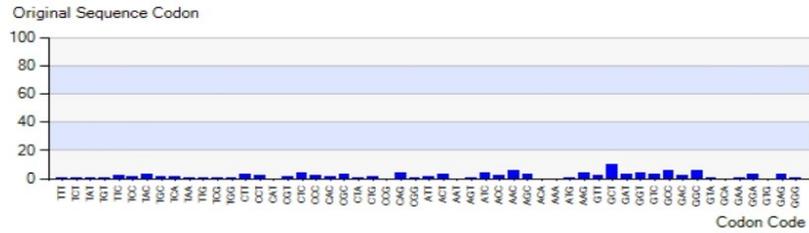
GTTTCTGATTCAGCGTGTGGCAGCCACCAGTATTTAA

9. Codon Used Table

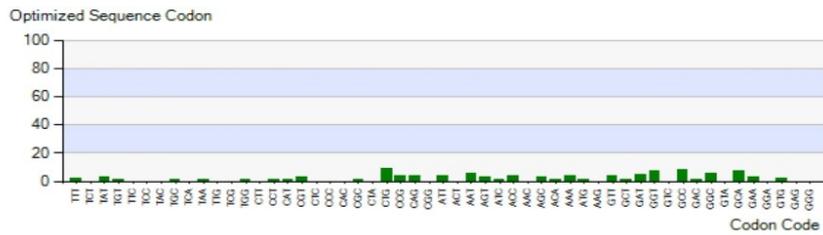
TTT [56791]	TCT [30494]	TAT [50400]	TGT [13662]
TTC [32513]	TCC [22637]	TAC [27239]	TGC [12777]
TTA [40627]	TCA [30502]	TAA [46664]	TGA [2674]
TTG [30084]	TCG [19071]	TAG [751]	TGG [31207]
CTT [33816]	CCT [22121]	CAT [28919]	CGT [37134]
CTC [22074]	CCC [14379]	CAC [17117]	CGC [32720]
CTA [12951]	CCA [21237]	CAA [33607]	CGA [11216]
CTG [87261]	CCG [33795]	CAG [62329]	CGG [18434]
ATT [68942]	ACT [30518]	AAT [68348]	AGT [30749]
ATC [45213]	ACC [44139]	AAC [47233]	AGC [33255]
ATA [31065]	ACA [35293]	AAA [86726]	AGA [16583]
ATG [55356]	ACG [31794]	AAG [35652]	AGG [9238]
GTT [50261]	GCT [44034]	GAT [78663]	GGT [55283]
GTC [30515]	GCC [50411]	GAC [41619]	GGC [47962]
GTA [30461]	GCA [53619]	GAA [81727]	GGA [31729]
GTG [46309]	GCG [49169]	GAG [45154]	GGG [28720]

Integrated Products & Services for Life Sciences

Relatório de otimização de $F\gamma\text{Cut3}$.



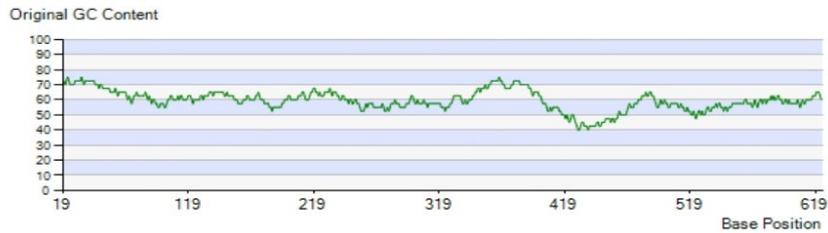
Before Optimization



After Optimization

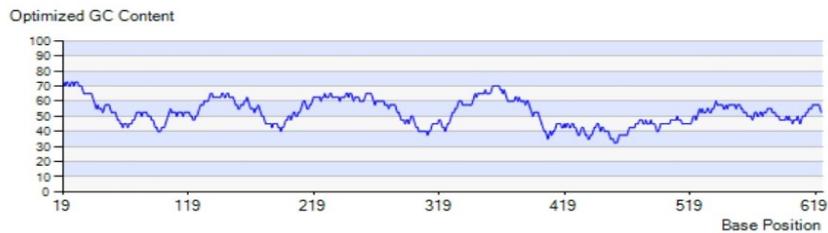
3.GC Content:

The comparison of GC content between original sequence and optimized sequence



GC: 0.6

Before Optimization



GC: 0.53

After Optimization

4.Restriction Enzyme And Avoid Sequence

Restriction Name	Original	Optimization
BamHI	1	0
BglII	0	0
EcoRI	0	0
HindIII	0	0
KpnI	0	0
SacI	0	0
SalI	0	0
SpeI	0	0
XbaI	0	0
XhoI	2	0
NotI	0	0

Removed	Original	Optimization
GGTAAG	0	0
GGTGAT	0	0
AATAAA	0	0
ATTAAA	0	0
ATTTA	0	0
TTTTTT	0	0
AAAAAAA	0	0
AGGTATGT	0	0
ATTTA	0	0
GATC	0	0
MAGGTRAGT	0	0
TACTAAC	0	0
TATAAA	0	0
TATATA	0	0
TTATTTATT	0	0
YYYYNTAGG	0	0

5.Removed Repeats

Before Optimization

After Optimization

6.Optimized Sequence

CTGCCTGCTGGCCAGGATGCCGCCGCACTGGAAGCACGCCAGCTGGGTGGCAGTATTACCCGTAATGATCTGGCCAA

TGGTAATAGTGGCAGCTGTCCGGGTGTTATTTTATCTATGCCCGGGTAGCACCGAAGCCGGTAATCTGGGTACTG
GGTCCGCGCGTTGCCAGTAACTGGAAGCCAAATATGGCAAAAATGGCGTGTGGATTACAGGGCGTGGGTGGTGCCTA
TCGTGCAACCCTGGGTGACAATGCCCTGCCCGTGGTACAAGTAGCGCCGAATTCGTGAAATGCTGGGCCATTTAA
TGATGCCAATCAGAAATGTCCGGATGCCGTTCTGCTGGCAGGCGGCTATAGTCAGGGTGCCGCACTGGCCGACGAA
GTGTTACCGATGTTGATGCAGGTATTCGTGAAAAATTGCAGGCGTGGTCTGTTGGTTATACCAAAAATCTGCAGA
ATCGTGGTAAAATCCGAGCTATCCGGAAGATCGTACCAAAGTGTTTTGAATACCGGCATCTGGTTGTACCGGCA
GCCTGATTGTTGCAGCACCGCATCTGGCATATCAGAGTGATGCAAGCAATGGTGCCCCGGAATTTCTGATTCAGAAAG
CAGATGCCGACGGCGCCCTAA

7. Protein Alignment

Original Protein

LPAGQDAAALEARQLGGSITRNDLANGNSGSCPGVIFYARGSTEAGNLGTLGPRVASKLEAKYGKNGVWIQVGGAYR
ATLGDNALPRGTSSAAIREMLGHFNDANQKCPDALLAGGYSQGAALAAASVTDVDAGIREKIAGVVLFGYTKNLQNR
GKIPSYPEDRIKVCNTGDLVCTGSLIVAAPHLAYQSDASNGAPEFLIQKADAAGAA*

Optimized Protein

LPAGQDAAALEARQLGGSITRNDLANGNSGSCPGVIFYARGSTEAGNLGTLGPRVASKLEAKYGKNGVWIQVGGAYR
ATLGDNALPRGTSSAAIREMLGHFNDANQKCPDALLAGGYSQGAALAAASVTDVDAGIREKIAGVVLFGYTKNLQNR
GKIPSYPEDRIKVCNTGDLVCTGSLIVAAPHLAYQSDASNGAPEFLIQKADAAGAA*

8. DNA Alignment

Original DNA

CTTCCCGCTGGTCAGGATGCCGCTGCCCTCGAGGCTCGCCAGCTAGGCGGCAGCATCACCCGCAACGACCTTGCCAA
CGGCAACAGCGGTTTCATGCCCTGGCGTCACTTTCATCTACGCTCGCGGCTCCACTGAAGCCGGCAACCTTGGAACCTC
TCGGTCCCGCGTTGCTTCAAAGCTCGAGGCCAAGTACGGCAAGAACGGTGTCTGGATCCAGGGCGTTGGCGGTGC
TTACCGCGCTACTCTGGCGACAACGCTCTTCTCGTGGAACCTTAGCGCTGCTATCCGTGAGATGCTGGGCCACTT
CAACGACGCCAACAGAAAGTGCCTGATGCTGCTCCTCGCCGGAGGTTACAGCCAGGGCGTGTCTCGCCGCTG
CCAGTGTACCGACGTCGATGCCGGTATTCGTGAGAAGATTGCTGGAGTTGTTCTTTCGGATATACCAAGAACCTTC
AGAACCAGGGGAAAGATCCCAGCTACCTGAGGACCGCACCAAGGTCTTTTGAACACTGGCGATCTCGTATGCACT
GGTTCGCTCATGTTGCTGCTCCTCACTTGGCTACCAGAGCGATGCTTCCAACGGTGTCTCCGAGTTCCTGATCCAG
AAGGCTGATGCTGCTGGGGCCGCTAA

Optimized DNA

CTGCCTGCTGGCCAGGATGCCGCCACTGGAAGCACGCCAGCTGGGTGGCAGTATTACCCGTAATGATCTGGCCAA
TGGTAATAGTGGCAGCTGTCCGGGTGTTATTTTATCTATGCCCGGGTAGCACCGAAGCCGGTAATCTGGGTACTG
GGTCCGCGCGTTGCCAGTAACTGGAAGCCAAATATGGCAAAAATGGCGTGTGGATTACAGGGCGTGGGTGGTGCCTA
TCGTGCAACCCTGGGTGACAATGCCCTGCCCGTGGTACAAGTAGCGCCGAATTCGTGAAATGCTGGGCCATTTAA
TGATGCCAATCAGAAATGTCCGGATGCCGTTCTGCTGGCAGGCGGCTATAGTCAGGGTGCCGCACTGGCCGACGAA
GTGTTACCGATGTTGATGCAGGTATTCGTGAAAAATTGCAGGCGTGGTCTGTTGGTTATACCAAAAATCTGCAGA
ATCGTGGTAAAATCCGAGCTATCCGGAAGATCGTACCAAAGTGTTTTGAATACCGGCATCTGGTTGTACCGGCA
GCCTGATTGTTGCAGCACCGCATCTGGCATATCAGAGTGATGCAAGCAATGGTGCCCCGGAATTTCTGATTCAGAAAG
CAGATGCCGACGGCGCCCTAA

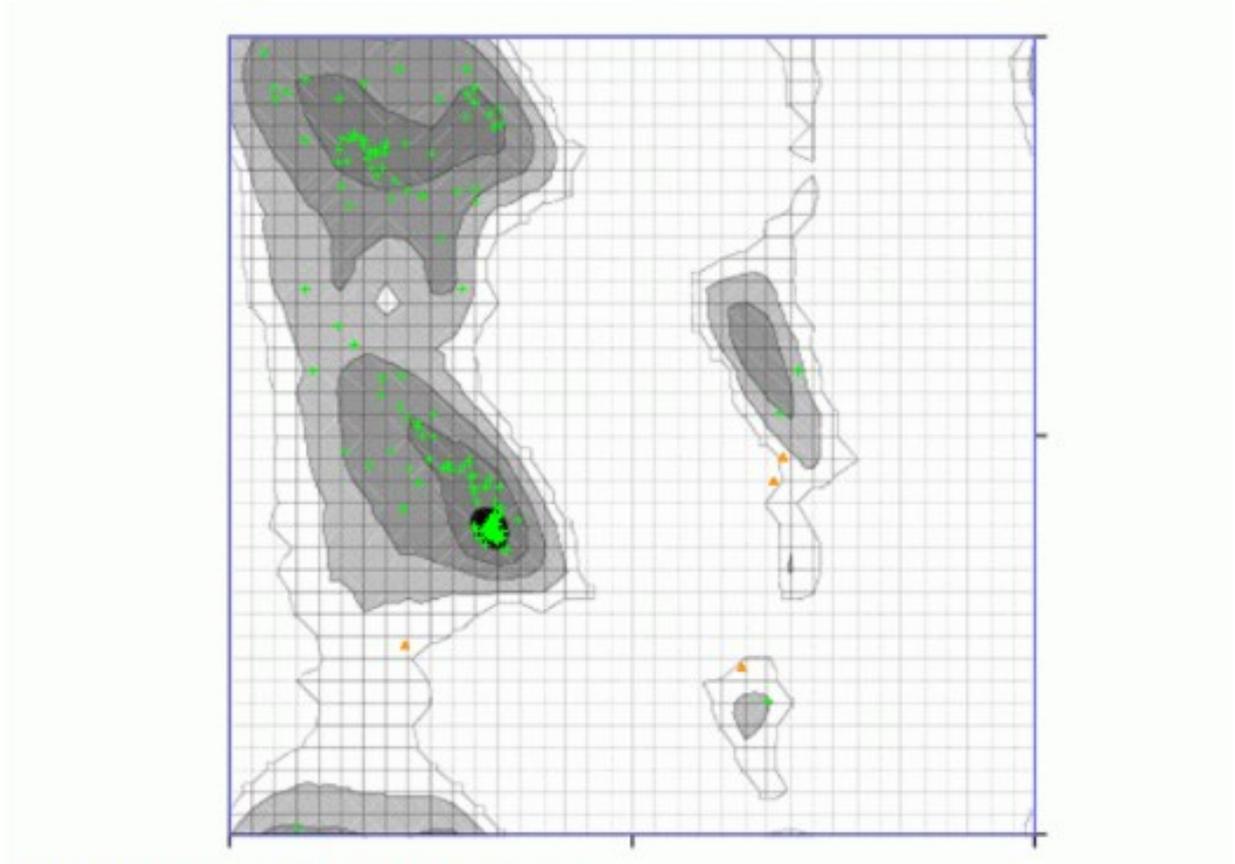
9.Codon Used Table

TTT [56791]	TCT [30494]	TAT [50400]	TGT [13662]
TTC [32513]	TCC [22637]	TAC [27239]	TGC [12777]
TTA [40627]	TCA [30502]	TAA [4664]	TGA [2674]
TTG [30084]	TCG [19071]	TAG [751]	TGG [31207]
CTT [33816]	CCT [22121]	CAT [28919]	CGT [37134]
CTC [22074]	CCC [14379]	CAC [17117]	CGC [32720]
CTA [12951]	CCA [21237]	CAA [33607]	CGA [11216]
CTG [87261]	CCG [33795]	CAG [62329]	CGG [18434]
ATT [68942]	ACT [30518]	AAT [68348]	AGT [30749]
ATC [45213]	ACC [44139]	AAC [47233]	AGC [33255]
ATA [31065]	ACA [35293]	AAA [86726]	AGA [16583]
ATG [55356]	ACG [31794]	AAG [35652]	AGG [9238]
GTT [50261]	GCT [44034]	GAT [78663]	GGT [55283]
GTC [30515]	GCC [50411]	GAC [41619]	GGC [47962]
GTA [30461]	GCA [53619]	GAA [81727]	GGA [31729]
GTG [46309]	GCG [49169]	GAG [45154]	GGG [28720]

ANEXO C – Gráficos de Ramachandran

FvCut1.pdb

Wed Mar 23 17:39:40 2022



The chart is color-coded for your convenience:

Black **Dark Grey** **Grey** **Light Grey** represent Highly Preferred Conformations. $\Delta \geq -2$

White with **Black Grid** represents preferred conformations. $-2 > \Delta \geq -4$

White with Grey Grid represents questionable conformations. $\Delta < -4$

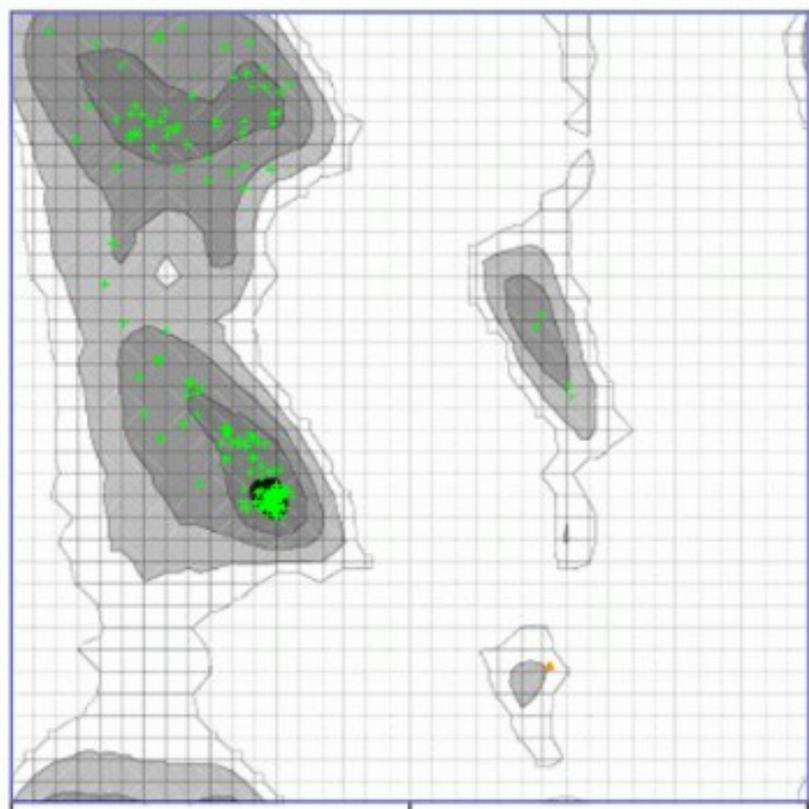
Highly Preferred observations shown as GREEN Crosses: 147 (97.351%)

Preferred observations shown as BROWN Triangles: 4 (2.649%)

Questionable observations shown as RED Circles: 0 (0.000%)

Not Shown: 2

Total: 151



The chart is color-coded for your convenience:

Black **Dark Grey** **Grey** **Light Grey** represent Highly Preferred Conformations. $\Delta \geq -2$

White with **Black Grid** represents preferred conformations. $-2 > \Delta \geq -4$

White with Grey Grid represents questionable conformations. $\Delta < -4$

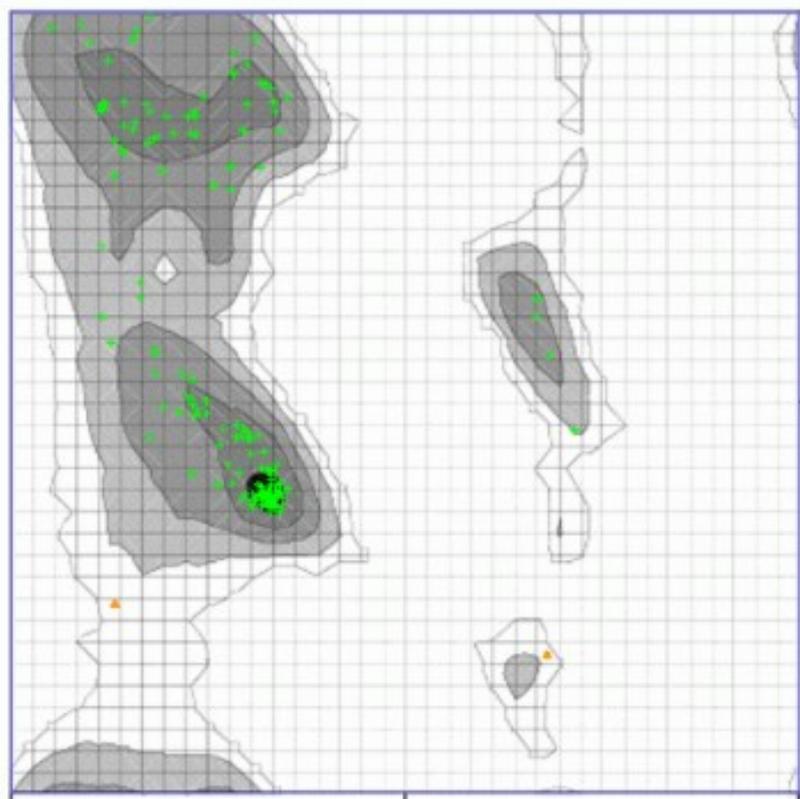
Highly Preferred observations shown as GREEN Crosses: 159 (99.375%)

Preferred observations shown as BROWN Triangles: 1 (0.625%)

Questionable observations shown as RED Circles: 0 (0.000%)

Not Shown: 2

Total: 160



The chart is color-coded for your convenience:

Black **Dark Grey** **Grey** **Light Grey** represent Highly Preferred Conformations. $\Delta \geq -2$

White with **Black Grid** represents preferred conformations. $-2 > \Delta \geq -4$

White with Grey Grid represents questionable conformations. $\Delta < -4$

Highly Preferred observations shown as GREEN Crosses: 159 (98.758%)

Preferred observations shown as BROWN Triangles: 2 (1.242%)

Questionable observations shown as RED Circles: 0 (0.000%)

Not Shown: 2

Total: 161

ANEXO D – Curvas de calibração

Figura 32: Curva de calibração de p-NP para as reações com volume de 4 mL, referentes ao tópico 4.1.7 Determinação da atividade de cutinase.

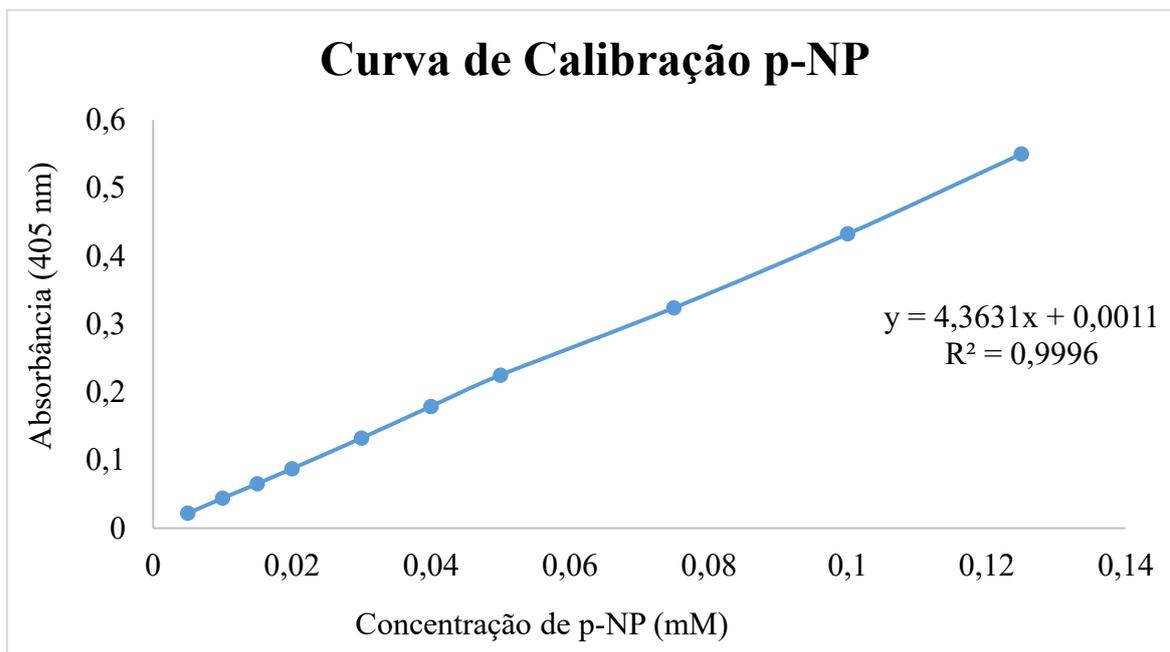


Figura 33: Curva de calibração de p-NP para as reações com volume de 200 µL, referentes ao tópico 4.2.5 Atividade enzimática.

