



ANA RUTE FERNANDES NUNES

LICENCIADA EM BIOQUÍMICA

**ESTUDOS SOBRE A REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO
DE *Marinobacter hydrocarbonoclasticus***

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
BIOQUÍMICA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

ORIENTADORA: Doutora Sofia Rocha Pauleta
Investigadora Auxiliar
Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNL

JÚRI:

PRESIDENTE: Professora Doutora Isabel Borges Coutinho Medeiros Dias

ARGUENTE: Doutora Marta Sofia Peixe Carepo

VOGAL: Doutora Sofia Rocha Pauleta



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

DEZEMBRO 2013

ANA RUTE FERNANDES NUNES

LICENCIADA EM BIOQUÍMICA

**ESTUDOS SOBRE A REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO
DE *Marinobacter hydrocarbonoclasticus***

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
BIOQUÍMICA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

ORIENTADORA: Doutora Sofia Rocha Pauleta
Investigadora Auxiliar
Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNL

JÚRI:

PRESIDENTE: Professora Doutora Isabel Borges Coutinho Medeiros Dias

ARGUENTE: Doutora Marta Sofia Peixe Carepo

VOGAL: Doutora Sofia Rocha Pauleta



DEZEMBRO 2013

DIREITOS DE CÓPIA

ESTUDOS SOBRE A REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO DE *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Copyright © em nome de Ana Rute Fernandes Nunes, da FCT/UNL e da UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste ciclo de estudos, sobretudo desta dissertação, não teria sido possível sem o apoio e preciosa ajuda (direta ou indireta) de algumas pessoas, às quais gostaria de dizer umas “palavrinhas” de modo a transmitir a minha gratidão.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar o meu agradecimento, sincero e especial, à Doutora Sofia Pauleta, por ter orientado esta tese, por todos os conhecimentos que me transmitiu e que em muito contribuíram para o que sei e sou hoje. Um muito obrigada Sofia, por todo o apoio, compreensão, paciência e amizade que sempre demonstrou por mim. Agradeço todas as vezes que me ajudou a ficar menos “frustrada” comigo mesma e compreender que a ciência é mesmo assim! Por todas as palavras de encorajamento, conselhos e confiança no meu trabalho. Obrigada por tudo!

À Professora Isabel Moura agradeço o facto de me ter acolhido no seu laboratório e me fornecer a oportunidade de entrar para este grande grupo (*BioProt*)! Obrigada por todo o apoio incondicional, simpatia e discussões científicas.

À Doutora Filomena Freitas agradeço toda a ajuda, explicações fornecidas sobre reatores e por me receber tão bem no vosso laboratório. Sendo que neste último aspeto não posso deixar de agradecer, também, ao Doutor Christophe por toda a sua alegria no trabalho e gargalhadas que me fez soltar, à Cristiana, Diana, Inês, Margarida e Mónica por todo o apoio no manuseamento dos reatores e em algum problema que era impossível de resolver sozinha. Um especial obrigada à Sílvia Antunes, pelo apoio incondicional, simpatia, pelos conhecimentos que me transmitiu e por se demonstrar sempre disponível para algo que fosse preciso.

Ao Doutor Oliver Einsle agradeço a sua simpatia e hospitalidade. Embora tenha sido por pouco tempo, agradeço o facto de me ter recebido tão bem no seu laboratório, em Freiburg, e pela oportunidade. Obrigada, também, à Anja Wüst pelo conhecimento transmitido, pela paciência, e ajuda incondicional.

Ao Professor José Moura agradeço a utilização de todo o equipamento de que necessitei durante o decorrer desta tese, por toda a simpatia que sempre me dispensou e pela paixão pela ciência, tão contagiante!

A ti, Ana Teresa gostaria de agradecer todo o conhecimento que me transmitiste sobretudo na montagem do reator, as vezes que “sofreste” comigo por o reator ter algum problema. Muito obrigada por todas as palavras encorajadoras, pela tua simpatia e todo o teu esforço para conseguir, sempre, obter tudo o que era necessário com a maior brevidade possível! Obrigada Ana Teresa (gostava que notasses o meu esforço, aqui, por te tratar por “tu”, a escrever é mais fácil...).

Ao “Jorginho” (Jorge Dias) agradeço, sinceramente, todas as palavras carinhosas e simpatia que tem para dar! Obrigada por me “ensinar a respirar” e por toda a sua alegria, contagiante. Obrigada por tudo Jorge!

Ao grupo *BioIn* e *BioProt* agradeço o bom ambiente no trabalho, apoio e amizade. Obrigada à Cecília, Célia, Gabriela Almeida, Gabriela Rivas, Hivana, Humberto, Íris, Jacopo, Leonardo, Luísa, Maiti, Mariana, Marta, Nathália, Pablo, Rashmi e Rui Soares. Muito obrigada pela boa disposição e conselhos científicos.

Em particular, a ti Catarina, quero agradecer-te (embora não tenha palavras suficientes para o fazer) a amizade verdadeira, as gargalhadas, os desabafos e as brincadeiras que me proporcionas. Obrigada por estares presente sempre quando é preciso, e quando não o é! Pelos conselhos que me elucidam mais do que imaginas, pela tua sinceridade e carinho incondicional! Pela ajuda preciosa que me deste no decorrer deste processo, fazes-me sentir e és, muito especial! Muito obrigada.

Cíntia, obrigada pelo apoio, pela tua (alguma) calma, por me dares o abraço que por vezes preciso e pelas palavras encorajadoras. Por partilharmos a mesma enzima, pelas discussões científicas e pela agitação emocional nos ensaios de atividade! Nisto não posso, também, deixar de agradecer ao Simone, pela sua grande ajuda e simpatia.

À Claudete (Cláudia), agradeço toda a sua disponibilidade e gosto em ajudar, todo o carinho demonstrado e as gomas que não faltavam quando o meu cérebro já precisava! Obrigada.

Olga, agradeço toda a tua disponibilidade em ajudar seja no que for preciso, a partilha da luta da *nautica* (agora *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*), pelas palavras carinhosas e simpáticas que tanto te caracterizam. Obrigada por em tão pouco tempo te tornares tão especial!

A ti, Rui Almeida é-me difícil expressar por palavras o que significas, bem como a gratidão que sinto por tudo o que fizeste e fazes por mim! Obrigada por não precisar de me dirigir a ti e falar, porque consegues conhecer-me, já, tão bem... Por vezes melhor que eu mesma! Obrigada por toda a amizade, pelos conselhos, risadas, parvoíces e “pontapés nos rins” e sobretudo por todo o apoio e ajuda incondicional! Muito obrigada.

Susana, de igual modo, qualquer coisa que te possa dizer ou agradecer é pouco por tudo o que és para mim! Obrigada pela amizade verdadeira, pelas palavras carinhosas, sinceridade, pelas vezes que me dás na cabeça e me fazes abrir os olhos. Por toda a preocupação, por me conheceres como poucas pessoas conhecem e pelo “calor” que me ofereces! Sou, com toda a certeza uma melhor pessoa por te ter na minha vida! Muito obrigada por tudo.

Aos amigos mais próximos e família, não podia deixar de dizer, uma ou duas “coisinhas” por terem sido fundamentais para a conclusão desta fase:

Em especial a ti, Prima (Cláudia), pela paciência que tens! Pela compreensão dos “nãos” que por vezes sou obrigada a dar... Obrigada também por nunca te esqueceres de me dar ânimo e por, mesmo com falhas da minha parte, seres sempre a mesma e demonstrares o quanto sou importante para ti! Obrigada por aturares toda a minha arrogância e falta de paciência! Obrigada por seres quem és e pela amizade incondicional! Não poderia deixar de agradecer, também, à Tomé (Catarina) pela sua amizade (embora ela ache “super ridículo”). Obrigada a ambas!

Tiago, obrigada por toda a paciência e compreensão (por vezes falta dela), por muitas vezes ficares “para trás”, por todas as ausências e por mesmo assim teres sempre uma palavra amiga e encorajadora para me dar! Obrigada pelo apoio incondicional e por seres o namorado e amigo que és!

A toda a minha família tenho um agradecimento especial, por todo o orgulho que demonstram em mim, por toda a compreensão do meu cansaço e (mau) feitio! Pelo apoio e por tanto acreditarem naquilo que sou!

Em especial, um obrigada à minha Afilhada, pelo seu amor tão verdadeiro e genuíno, pelas ausências indesejadas, por muitas vezes combinar ir-te buscar e depois não puder. Por me compreenderes e mesmo, tão pequenina, me dares tanto apoio e força! Obrigada pelo teu sorriso, pelos abraços, beijinhos e brincadeiras que tens com a Madrinha! És a luzinha dos meus olhos, Mariana!

À minha Mãe, o mais profundo, sincero e merecido obrigada! Muito obrigada pelos valores que sempre me transmitiste, por seres um exemplo de força e coragem! Por me apoiares incondicionalmente, provavelmente mais que qualquer outra pessoa! Pelas minhas impaciências, discussões e mau estar! Pelas ausências e falta de tempo, mesmo estando debaixo do mesmo teto! Por me dares “colo” sempre que preciso, por me compreenderes sem que eu precise de abrir a boca... Pelo teu amor verdadeiro, sem palavras! Por acreditares em mim mais do que eu própria e por seres o meu porto de abrigo! Toda esta vitória devo-a a ti... Muito obrigada, Mãe!

À minha Avó e ao meu Pai, agradeço os valores que me transmitiram até quando lhes foi permitido... Hoje sou aquilo que ajudaram a que me tornasse! Obrigada pelo apoio que sempre me deram e por todo o orgulho que sempre demonstraram! Sei que tu, Pai, serias o mais orgulhoso do final de mais esta fase!

“A PERSISTÊNCIA É O MENOR CAMINHO DO ÊXITO”

Charles Chaplin



RESUMO

O óxido nitroso é um potente gás de efeito de estufa, responsável pela depleção da camada do ozono. As emissões globais deste gás para a atmosfera têm vindo a aumentar consideravelmente devido ao uso frequente de fertilizantes azotados. A reação de redução do N_2O a azoto, último passo da desnitrificação, é catalisada pela enzima redutase do óxido nitroso que possui dois centros de cobre distintos, o centro CuA (transferência eletrónica) e o centro CuZ (centro catalítico).

Efetuiu-se o crescimento da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617 em meio *EMS*, na presença de nitrato (10 mM) e variando o pH (6,5, 7,5 e 8,5), de modo a estudar o efeito do mesmo na desnitrificação, e isolar a N_2OR das diferentes massas celulares de forma a identificar as diferentes propriedades bioquímicas que poderiam explicar porque em solos ácidos a concentração de N_2O é mais elevada. Através das curvas de crescimento aos diferentes pHs, verificou-se que o pH ótimo de crescimento é 7,5, no entanto, a atividade específica de redução de N_2O foi mais elevada a pH 8,5 (2,6 U/mg_{prot}). Em todos os ensaios, no final de 48 h a atividade específica e a concentração de nitrito eram muito baixas.

A N_2OR foi isolada a partir de massas celulares obtidas sob condições microaerófilas, N_2OR_{micro} (rendimento: 2,69 mg _{N_2OR_{Pura}} /L_{meio}), ou anaeróbias estritas (N_2OR_{ana}), na presença de nitrato a pH 7,5 (rendimento: 0,15 mg _{N_2OR_{Pura}} /L_{meio}) e caracterizada bioquimicamente. A N_2OR_{micro} foi isolada com o centro CuZ no estado $[2Cu^{2+}-2Cu^+]$, com máximo de absorção a 550 nm e um ombro a 640 nm, apresentando o centro CuZ como uma mistura de 68% de CuZ e 32% de CuZ* e um $\epsilon_{660\text{ nm}} = 5,6\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (por monómero, na forma reduzida com ditionito); sendo que o centro CuA estava praticamente no estado $[Cu^+-Cu^+]$. Por outro lado, a N_2OR_{ana} apresenta máximos de absorção a 550 nm e 640 nm, pelo que o centro CuZ corresponde a uma mistura de CuZ e CuZ*, com praticamente igual contribuição (49% CuZ e 51% CuZ*) e um $\epsilon_{640\text{ nm}} = 3,8\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (por monómero, na forma reduzida com ditionito). Relativamente à atividade específica, observou-se que, quer na presença do doador de eletrões fisiológico (cit c_{552}), quer do doador artificial (MV), a enzima com maior contribuição de CuZ* apresenta uma maior atividade (81 U/mg_{prot} com ativação de 3 h e MV como doador de eletrões; 55 U/mg_{prot} e 2 U/mg_{prot}, com pré-ativação de 5 h e como doadores de eletrões o MV e o cit c_{552} , respetivamente), em comparação com 51 U/mg_{prot}, 33 U/mg_{prot} e 0,22 U/mg_{prot}, respetivamente para a N_2OR_{micro} .

TERMOS CHAVE

ÓXIDO NITROSO • DESNITRIFICAÇÃO • REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO • CENTROS CUA, CUZ • *Marinobacter*
• ATIVIDADE ESPECÍFICA



ABSTRACT

Nitrous oxide is a powerful greenhouse effect gas, and is responsible for the depletion of the ozone layer. Global N₂O emissions to the atmosphere have increased considerably due to the use of nitrogenated fertilizers. The reduction of N₂O to N₂, the final step of the denitrification pathway is catalyzed by nitrous oxide reductase, which contains two different copper centers, CuA (electron transferring) and CuZ (catalytic center).

Marinobacter hydrocarbonoclasticus 617 was grown in EMS medium, in the presence of nitrate (10 mM) and at different pH values (6.5, 7.5 and 8.5), in order to study its effect on denitrification and to isolate N₂OR from the different cell masses, with the goal of identifying the different biochemical properties that could explain the higher N₂O release levels in acidic soils. The optimal pH for growth was determined to be 7.5; however the specific N₂O reduction activity was highest at pH 8.5 (2.6 U/mg_{prot}). After 48 h, nitrite concentration and specific activity were very low for all assays.

N₂OR was isolated and biochemically characterized from cell growth obtained under microaerophilic, N₂OR_{micro} (yield: 2,69 mg_{Pure_N2OR}/L_{culture}), or strictly anaerobic (N₂OR_{ana}) conditions, at pH 7.5 and in the presence of nitrate (yield: 0,15 mg_{Pure_N2OR}/L_{culture}). N₂OR_{micro} was isolated with CuZ in the [2Cu²⁺-2Cu⁺] state, with a maximum visible absorption band at 550 nm and a shoulder at 640 nm; CuZ was present in a mixture of 68% CuZ and 32% CuZ*, with an $\epsilon_{660\text{ nm}} = 5.6\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (per monomer for the dithionite reduced form); CuA was mostly in the [Cu⁺-Cu⁺] state. However, N₂OR_{ana} presented an absorption maxima at 550 nm and 640 nm; CuZ center is also present as a mixture of CuZ and the redox inert CuZ*, with almost the same contribution (49% CuZ vs. 51% CuZ*) and an $\epsilon_{640\text{ nm}} = 3.8\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (per monomer for the dithionite reduced form). Regarding the specific activity, the enzyme with a larger ratio of CuZ*/CuZ exhibited higher activity in the presence of either its physiological electron donor (cytochrome *c*₅₅₂), or of an artificial donor (methyl viologen, MV) (81 U/mg_{prot} in the presence of MV after 3 hours of activation, 55 U/mg_{prot} and 2 U/mg_{prot}, with MV and cytochrome *c*₅₅₂ as electron donors, respectively, and both after a 5 hour pre-activation), compared to 51 U/mg_{prot}, 33 U/mg_{prot} and 0.22 U/mg_{prot}, respectively, for N₂OR_{micro}.

KEYWORDS

NITROUS OXIDE • DENITRIFICATION • NITROUS OXIDE REDUCTASE • CUA, CUZ CENTERS • *Marinobacter*
• SPECIFIC ACTIVITY



ÍNDICE DE MATÉRIAS

| | |
|---|-------|
| AGRADECIMENTOS..... | v |
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT..... | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xvii |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | xxiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xxv |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 3 |
| 1.1. <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> | 3 |
| 1.2. CICLO DO AZOTO..... | 5 |
| 1.2.1. DESNITRIFICAÇÃO..... | 8 |
| 1.2.1.1. REDUTASE DO NITRATO..... | 10 |
| 1.2.1.2. REDUTASE DO NITRITO..... | 10 |
| 1.2.1.3. REDUTASE DO ÓXIDO NÍTRICO..... | 12 |
| 1.2.1.4. REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO..... | 12 |
| 1.3. A ENZIMA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO (N ₂ OR)..... | 13 |
| 1.3.1. COBRE, COFATOR DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO..... | 13 |
| 1.3.2. SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO..... | 14 |
| 1.3.3. GENES E REGULAÇÃO DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO..... | 16 |
| 1.3.4. REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO E SUA ESTRUTURA..... | 21 |
| 1.3.5. CARACTERIZAÇÃO ESPETROSCÓPICA DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO..... | 25 |
| 1.3.6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO..... | 29 |
| 1.3.6.1. CICLO CATALÍTICO..... | 30 |
| 1.3.6.2. INTERMEDIÁRIOS DO CICLO CATALÍTICO..... | 32 |
| OBJETIVOS..... | 37 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 41 |
| 2.1. CRESCIMENTO DE <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> 617 EM BIOFERMENTADOR (2 L E 10 L)..... | 41 |
| 2.1.1. MEIO DE CULTURA..... | 41 |
| 2.1.2. PREPARAÇÃO DOS BIOFERMENTADORES..... | 41 |
| 2.1.2.1. BIOFERMENTADOR DE 10 L..... | 41 |
| 2.1.2.2. BIOFERMENTADOR DE 2 L..... | 43 |
| 2.1.3. PREPARAÇÃO DOS PRÉ-INÓCULOS..... | 43 |
| 2.1.4. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO NOS BIOFERMENTADORES..... | 44 |
| 2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS CRESCIMENTOS A DIFERENTES PHs..... | 44 |
| 2.2.1. QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO..... | 44 |
| 2.2.2. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA..... | 45 |
| 2.2.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE DE REDUÇÃO DO ÓXIDO NITROSO..... | 46 |
| 2.2.3.1. ENSAIOS DE ATIVIDADE DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO COM O DOADOR FISIOLÓGICO, CITOCROMO C ₅₅₂ | 48 |

| | | |
|------------|---|----|
| 2.3. | PURIFICAÇÃO DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO | 49 |
| 2.3.1. | OBTENÇÃO DE MASSA CELULAR E EXTRATO PERIPLASMÁTICO | 49 |
| 2.3.1.1. | OBTENÇÃO DE MASSA CELULAR DE CRESCIMENTO EM CONDIÇÕES MICROAERÓFILAS (CRESCIMENTO REALIZADO NUM BIOFERMENTADOR DE 10 L)..... | 49 |
| 2.3.1.2. | OBTENÇÃO DA FRAÇÃO PERIPLASMÁTICA..... | 49 |
| 2.3.1.2.1. | EXTRATO PERIPLASMÁTICO DE CRESCIMENTO EM CONDIÇÕES MICROAERÓFILAS NA PRESENÇA DE NITRATO (CRESCIMENTO REALIZADO NUM BIOFERMENTADOR DE 10 L)..... | 49 |
| 2.3.1.2.2. | EXTRATO PERIPLASMÁTICO DE CRESCIMENTO EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS ESTRITAS NA PRESENÇA DE NITRATO (CRESCIMENTO REALIZADO NUM FERMENTADOR DE 300 L EM MARSELHA) | 50 |
| 2.3.2. | PURIFICAÇÃO DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO DO EXTRATO PERIPLASMÁTICO DE CÉLULAS OBTIDAS EM CONDIÇÕES MICROAERÓFILAS NA PRESENÇA DE NITRATO | 50 |
| 2.3.3. | PURIFICAÇÃO DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO DO EXTRATO PERIPLASMÁTICO DE CÉLULAS OBTIDAS EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS ESTRITAS NA PRESENÇA DE NITRATO | 51 |
| 2.4. | PURIFICAÇÃO DO CITOCROMO C_{552} | 52 |
| 2.5. | GÉIS DE POLIACRILAMIDA..... | 53 |
| 2.5.1. | SDS-PAGE | 53 |
| 2.5.2. | PAGE | 53 |
| 2.5.3. | COLORAÇÃO DOS GÉIS..... | 54 |
| 2.5.3.1. | AZUL DE COOMASSIE – COLORAÇÃO DE PROTEÍNA..... | 54 |
| 2.5.3.2. | COLORAÇÃO DO GRUPO HÉMICO | 54 |
| 2.6. | CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO | 54 |
| 2.6.1. | ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA-VISÍVEL | 54 |
| 2.6.2. | DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR..... | 55 |
| 2.6.3. | QUANTIFICAÇÃO DE COBRE | 56 |
| 2.6.3.1. | MÉTODO DA BIQUINOLINA | 56 |
| 2.6.3.2. | DETERMINAÇÃO DE METAIS ATRAVÉS DE PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE..... | 57 |
| 3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 61 |
| 3.1. | CRESCIMENTOS DE <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> 617 EM BIOFERMENTADOR DE 2 L | 61 |
| 3.2. | CARACTERIZAÇÃO DOS CRESCIMENTOS A DIFERENTES PHs | 64 |
| 3.2.1. | QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO – MÉTODO DE GRIESS..... | 64 |
| 3.2.2. | ENSAIOS DE ATIVIDADE DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO | 66 |
| 3.3. | PURIFICAÇÃO DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO E DO SEU PARCEIRO REDOX FISIOLÓGICO, CITOCROMO C_{552} | 70 |
| 3.3.1. | CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS DA DESNITRIFICAÇÃO | 70 |
| 3.3.2. | PURIFICAÇÃO DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO DO EXTRATO PERIPLASMÁTICO OBTIDO DE MASSA CELULAR EM CONDIÇÕES MICROAERÓFILAS E NA PRESENÇA DE NITRATO COMO ACEITADOR FINAL DE ELETRÕES | 72 |
| 3.3.3. | PURIFICAÇÃO DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO DO EXTRATO PERIPLASMÁTICO DE CÉLULAS OBTIDAS EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS ESTRITAS E NA PRESENÇA DE NITRATO COMO ACEITADOR FINAL DE ELETRÕES..... | 76 |
| 3.3.4. | PURIFICAÇÃO DO CITOCROMO C_{552} DO EXTRATO PERIPLASMÁTICO DE CÉLULAS OBTIDAS EM CONDIÇÕES MICROAERÓFILAS E ANAERÓBIAS ESTRITAS NA PRESENÇA DE NITRATO COMO ACEITADOR FINAL DE ELETRÕES | 81 |
| 3.3.4.1. | CITOCROMO C_{552} | 84 |
| 3.4. | DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO..... | 85 |
| 3.5. | ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO | 86 |
| 3.6. | DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR..... | 92 |

| | |
|--|-----|
| 3.6.1. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA | 92 |
| 3.6.2. QUANTIFICAÇÃO DE COBRE | 92 |
| 3.7. ATIVIDADE ESPECÍFICA..... | 96 |
| 4. CONCLUSÕES | 103 |
| PERSPETIVAS FUTURAS | 109 |
| BIBLIOGRAFIA | 113 |
| ANEXOS..... | 125 |
| ANEXO I. MEIO EMS (DO FRANCÊS, <i>EAU DE MER SYNTHÉTIQUE</i>) LÍQUIDO | 125 |
| ANEXO II. MEIO EMS SÓLIDO..... | 126 |
| ANEXO III. REAGENTE BIURETO (MÉTODO DE <i>LOWRY</i>) | 127 |
| ANEXO IV. COMPOSIÇÃO DOS GÉIS E SOLUÇÕES DE ELETROFORESE SDS-PAGE E PAGE | 128 |
| ANEXO V. VALORES UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR APARENTE DAS AMOSTRAS DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO..... | 129 |
| ANEXO VI. PERFIS DO NITRITO E ATIVIDADE DE CRESCIMENTO EM BIOFERMENTADOR DE 10 L, PH 7,5..... | 130 |
| ANEXO VII. ESPETROS TEÓRICOS DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO | 131 |



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Ciclo biogeoquímico do Azoto indicando cada uma das enzimas que são responsáveis por cada reação. As setas representam as reações catalisadas por cada uma das enzimas. Na margem esquerda estão representados os números de oxidação do azoto de cada composto. NO – Óxido Nítrico, N₂O – Óxido Nitroso, N₂ – Azoto Molecular, ANAMOX – do inglês *ANAerobic AMmonia OXidation*. As setas que se encontram representadas de cima para baixo, dizem respeito aos processos de redução; as setas no sentido inverso (de baixo para cima) correspondem aos processos de oxidação. Adaptado de^{[14],[15]} 6

FIGURA 1.2. Esquema da desnitrificação em bactérias gram-negativas desnitrificantes, adaptado para o que acontece no periplasma da bactéria em estudo, *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas e na presença de nitrato. Apesar de não estar representada, a peroxidase do citocromo *c* também está presente. NAR – redutase do nitrato; NIR – redutase do nitrito ou citocromo *cd*₁; NOR – redutase do óxido nítrico; N₂OR – redutase do óxido nitroso e cit. *c*₅₅₂ – citocromo *c*₅₅₂. Códigos do PDB: NAR – 1Y4Z, NIR – 1NIR, NOR – 3OOR, N₂OR – 1QNI e Cit. *c*₅₅₂ – 1CNO (apenas as últimas duas estruturas são de enzimas isoladas de *Ma. hydrocarbonoclasticus*). Adaptado de^{[16],[27],[30]} 9

FIGURA 1.3. Alinhamento da sequência primária de N₂ORs de estruturas conhecidas. A verde e azul são destacados os resíduos do CuA e CuZ, respetivamente. O motivo de ligação do hemo tipo *c* está a vermelho. A roxo os resíduos envolvidos na transferência eletrónica. O *tat*-motif a amarelo. *Ma.h_Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Ps.s_Pseudomonas stutzeri*, *Ac.c_Achromobacter cycloclastes*, *Pa.d_Paracoccus denitrificans*, *Wo.s_Wolinella succinogenes*. *,;, . identidade, alta conservação e preservação de aminoácidos, respetivamente. Comparação de sequências com *software* de alinhamento múltiplo ClustalW2^{[113],[114]}. Adaptado de^[29] 15

FIGURA 1.4. Organização do *cluster* dos genes *nos* de diferentes divisões de Proteobactérias e três bactérias Gram-positivas identificadas como desnitrificantes completas. As unidades transcricionais estudadas e as regiões promotoras estão identificadas com setas e pontos, respetivamente. PA – Pseudoazurina, Az – Azurina, C – Proteína que contém motivo de ligação do hemo tipo *c* – CXXCH, ou proteína semelhante à tiorredoxina, C* – Proteína de tamanho semelhante à identificada por C mas sem motivo de ligação do hemo, identificada como uma tiorredoxina putativa, *dnr* – Regulador da respiração dissimilativa de nitrato, *tat* – motivo *twin-arginine*, *senC* – essencial para inserção de cobre. Os genes coloridos a preto dizem respeito a proteínas hipotéticas. Adaptado de^{[29],[47]} 17

FIGURA 1.5. Estrutura do centro catalítico, CuZ, da N₂OR de *Pa. denitrificans* (A) e de *Ac. cycloclastes* (B). B.I – Forma nativa com presença de uma molécula de água e um ião hidróxido entre Cu_{IV} e Cu_I, B.II – Forma inibida com ião iodeto entre Cu_{IV} e Cu_I. Os centros têm os seus ligandos coloridos de acordo com o elemento. O ião enxofre está representado com uma esfera amarela e o ião iodeto a roxo. A figura foi gerada com o programa Chimera^[70] utilizando as coordenadas do PDB 1FWX (A), 2IWF (B.I) e 2IWK (B.II). 22

FIGURA 1.6. Estrutura da N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e respetivos centros. A – Representação do dímero funcional redutase do óxido nitroso. O dímero está colorido de acordo com as subunidades. Um dos monómeros está representado a azul e o outro a cinza. Ambos os centros, CuA e CuZ, estão representados a vermelho e laranja, respetivamente. B.I – Centro CuA e B.II – Centro CuZ no estado [1Cu²⁺-3Cu⁺], na forma CuZ*. Os centros têm os seus ligandos coloridos de acordo com o elemento. O ião enxofre está representado com uma esfera amarela. A figura foi gerada com o programa Chimera^[70] e utilizando as coordenadas do PDB 1QNI. 23

FIGURA 1.7. Representação dos centros CuA (A) e CuZ (B) da N₂OR de *Ps. stutzeri*. Os ligandos estão coloridos de acordo com o elemento. O centro CuZ está no estado [2Cu²⁺-2Cu⁺]. Os iões enxofre estão representados com uma esfera amarela. A figura foi gerada com o programa Chimera^[70] e utilizando as coordenadas do PDB 3SBQ. 25

FIGURA 1.8. A – Espetro de UV-Visível e B – Espetro de RPE das diferentes formas redox da N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus*. i – N₂OR com o centro CuA completamente oxidado e o centro CuZ na forma redox ativa [2Cu²⁺-2Cu⁺], i' – N₂OR igual à forma i mas reduzida com ascorbato de sódio, com o centro CuA

reduzido e o centro CuZ, igualmente, no estado $[2\text{Cu}^{2+}-2\text{Cu}^+]$, ii – N_2OR com o centro CuA oxidado e o centro CuZ na forma de CuZ^* , redox inativo $[1\text{Cu}^{2+}-3\text{Cu}^+]$ e iii – N_2OR com o centro CuA reduzido e o centro CuZ na forma de CuZ^* , $[1\text{Cu}^{2+}-3\text{Cu}^+]$. O espectro de RPE foi adquirido a 30 K e com uma frequência de micro-ondas de 9,66 GHz. Adaptado de^[29]..... 28

FIGURA 1.9. Mecanismo de ativação e ciclo catalítico proposto para a N_2OR com o centro CuZ na forma de CuZ^* . Os íons cobre no estado de oxidação (II) estão representados com um círculo azul, e com um círculo cinzento no estado de oxidação (I). Na forma CuZ^* , o Cu^{2+} está representado com um quadrado azul (para indicar que é redox inativo). Contudo, em ambos os centros CuZ e CuA, os elétrons desemparelhados são deslocalizados dentro do *cluster* através dos átomos de enxofre, representados a círculos amarelos. DE – Doador de Elétrons. Adaptado de^{[29],[71]}..... 33

FIGURA 2.1. Esquema de montagem do Biofermentador de 10 L, utilizado na obtenção de massa celular de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas na presença de nitrato, usando o meio EMS. A – Tampa do Fermentador, B – Frascos de Schott de ácido, HCl 1 M e base, NaOH 1 M (caso se monitorize a adição de um anti-espuma, este seria colocado no seguimento do ácido e da base), C – Adição dos 4 L de Solução A ao Fermentador, com o auxílio de uma bomba peristáltica, D – Fermentador totalmente montado, já com os 9 L de Solução A e pré-inóculo de 1 L, $V_{\text{total}} = 10$ L. O reator de 2 L é exatamente igual ao ilustrado na Figura. 42

FIGURA 2.2. Retas de calibração usando o método de Griess para quantificação total de nitritos. A equação da reta é dada por $\text{Abs}_{542 \text{ nm}} = 0,0159.[\text{NaNO}_2] (\mu\text{M}) + 0,0042$, com um $R^2 = 0,999$. Curvas de calibração semelhantes foram utilizadas em todos os ensaios efetuados a pHs diferentes. O padrão utilizado foi uma solução de NaNO_2 , nitrato de sódio (solução *stock* a 1 mM). 45

FIGURA 2.3. Retas de calibração usada para quantificação total de proteína através do método de Lowry. A equação da reta é dada por $\text{Abs}_{750 \text{ nm}} = 0,3064.[\text{ASB}] (\text{mg/ml}) - 0,0003$, com um $R^2 = 0,999$. Retas semelhantes foram utilizadas em todos os ensaios efetuados a pHs diferentes. O padrão utilizado foi uma solução de ASB (solução *stock* a 1 mg/mL)..... 46

FIGURA 2.4. Ensaios enzimáticos usando o citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (A) ou metilviologénio (B), como doadores de elétrons. Os ensaios são iniciados pela adição de $\sim 15 \mu\text{M}$ da enzima, a uma solução contendo 1,25 mM N_2O saturado, tampão 100 mM Tris-HCl, pH 7,6 e $\sim 10 \mu\text{M}$ citocromo c_{552} / $\sim 90 \mu\text{M}$ metilviologénio. A absorvância é lida a 552 nm (A) e 600 nm (B). A azul está representado o declive da curva de decaimento, utilizado no cálculo da atividade específica..... 48

FIGURA 2.5. Retas de calibração usando o método da 2,2'-Biquinolina para quantificação de cobre. A equação da reta é: $\text{Abs}_{546 \text{ nm}} = 0,0065.[\text{Cu}^{2+}] (\mu\text{M}) - 0,0018$ com um $R^2 = 0,9966$. Retas semelhantes foram utilizadas em todos os ensaios efetuados para ambas as enzimas, isoladas de crescimentos em condições anaeróbias estritas e microaerófilas, ambos na presença de nitrato. O padrão utilizado foi uma solução de acetato de cobre (solução *stock* a 0,5 mM)..... 56

FIGURA 3.1. Curvas de crescimento de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617 num biofermentador de 2 L, em condições microaerófilas e na presença de nitrato. Representação do logaritmo da densidade ótica a 600 nm ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$) em função do tempo de crescimento, para os crescimentos a pH 6,5 (verde), pH 7,5 (azul) e pH 8,5 (vermelho). As fases exponencial e estacionária estão identificadas pelos números I e II, respetivamente. As linhas a tracejado correspondem à duração da fase exponencial que dependendo do pH tiveram uma duração de 5h, 6h e 10h, aproximadamente para os crescimento realizados a pH 6,5, pH 7,5 e pH 8,5, respetivamente. 62

FIGURA 3.2. Quantificação de nitritos a preto (eixo vertical secundário) e variação da atividade de redução do N_2O a azul (eixo vertical principal), em função do tempo de crescimento a pH 6,5, pH 7,5 e pH 8,5..... 67

FIGURA 3.3. Esquema simplificado da desnitrificação. A azul está representado o processo que ocorre no periplasma da bactéria. Nos quadrados encontram-se os elementos que são sucessivamente reduzidos ao

elemento que o segue, pelas enzimas indicadas por cima das setas. NO_3^- – Nitrato, NO_2^- – Nitrito, NO – Óxido Nítrico, N_2O – Óxido Nitroso, N_2 – Azoto Molecular, NAR – Redutase do Nitrato, NIR – Redutase do Nitrito, NOR – Redutase do Óxido Nítrico e N_2OR – Redutase do Óxido Nitroso..... 68

FIGURA 3.4. Análise do periplasma do crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas e na presença de nitrato (A) e em condições anaeróbias estritas igualmente na presença de nitrato (B). Em i. géis corados para hemoglobina e em ii. géis corados para conteúdo proteico. M – Padrão de massas moleculares, S – Sedimento/Esferoplastos; FS – Fração Solúvel/Periplasma; RC+M – Restos Celulares + Membranas; RC – Restos Celulares. Os retângulos identificam a peroxidase do citocromo *c* (vermelho), citocromo *cd*₁ (verde) e a possível banda correspondente à redutase do óxido nitroso (branco). Géis desnaturantes de poliacrilamida 12,5% em tampão Tris-Tricina, e eletroforese realizada a 150 V durante 1 hora. Bandas de proteína visualizadas através da coloração com azul de *Coomassie*, e as coradas para conteúdo hémico seguiram os passos descritos nos Materiais e Métodos. 71

FIGURA 3.5. Esquema de purificação do extrato periplasmático de massa celular em condições microaerófilas na presença de nitrato, de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 617. Após a primeira coluna (Troca Iónica) foram obtidas 4 frações, sendo a primeira automaticamente eluída, citocromo *c*₅₅₂ (cit. *c*₅₅₂). A proteína em estudo, redutase do óxido nitroso (N_2OR) foi eluída antes da peroxidase do citocromo *c* (Cp) e depois a redutase do nitrito (cit. *cd*₁). O segundo passo de purificação, coluna de Exclusão Molecular, foi utilizado, somente, para a fração do cit. *c*₅₅₂ e N_2OR . Cada fração eluída deu origem a outras duas, uma mais pura (FP) e outra menos pura ou mais impura (FI). A coluna PD10, serviu unicamente para trocar o tampão do citocromo (retirar o excesso de sal). Setas a azul correspondem ao início do gradiente e, os números a azul à massa obtida de cada fração relevante para o estudo efetuado na dissertação. 73

FIGURA 3.6. Cromatograma da primeira etapa da purificação, cromatografia de permuta aniónica (matriz DEAE FF) do extrato periplasmático proveniente de um crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas e na presença de nitrato. A azul está representada a $\text{Abs}_{280\text{ nm}}$ (eixo vertical principal), onde é possível observar a eluição do citocromo *c*₅₅₂ antes da aplicação do gradiente (Preto), gradiente salino entre 0 – 500 mM NaCl em Tris-HCl 10 mM, pH 7,6. A N_2OR começou a ser eluída a, aproximadamente, 250 mM de NaCl (metade do gradiente). 74

FIGURA 3.7. Cromatograma da segunda etapa da purificação, cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular (matriz *Superdex 75 pre-packed*) da fração da redutase do óxido nitroso obtida da primeira etapa (DEAE FF). A proteína foi eluída com 150 mM de NaCl em 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6..... 75

FIGURA 3.8. Eletroforese da purificação da N_2OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas na presença de nitrato. *Marker* – Padrão de massas moleculares, FS – Fração Solúvel, Retângulo branco diz respeito às bandas da redutase do óxido nitroso. Géis desnaturantes de poliacrilamida 12,5% em tampão Tris-Tricina, e eletroforese realizada a 150 V durante 1 hora. Bandas de proteína visualizadas através de coloração com azul de *Coomassie*, como descrito nos Materiais e Métodos. 76

FIGURA 3.9. Esquema da purificação do extrato periplasmático do crescimento em condições anaeróbias estritas e desnitrificantes, de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 617. Após a primeira coluna (troca iónica) foram obtidas 11 frações, sendo a primeira automaticamente eluída, citocromo *c*₅₅₂ (cit. *c*₅₅₂). O segundo passo de purificação, novamente uma coluna de Troca Iónica, foi utilizado, somente, para a fração da N_2OR . E o último passo cromatográfico, coluna de Exclusão Molecular, foi efetuado para as frações da N_2OR e cit. *c*₅₅₂. A coluna PD10, serviu unicamente para trocar o tampão do citocromo (retirar o excesso de sal). Setas a azul correspondem ao início do gradiente e, os números a azul à massa obtida de cada fração importante para o estudo efetuado na dissertação. 77

FIGURA 3.10. Cromatograma da segunda etapa da purificação, cromatografia de permuta aniónica (matriz *SOURCE 15Q*) da fração N_2OR proveniente da primeira etapa de purificação (DE 52) de um crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições anaeróbias estritas e na presença de nitrato. A azul está representada a $\text{Abs}_{280\text{ nm}}$ (eixo vertical principal) e gradiente salino (Preto) entre 0 – 300 mM NaCl em Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 (eixo vertical secundário). 78

FIGURA 3.11. Eletroforese em condições desnaturantes das frações obtidas ao longo da purificação da N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições anaeróbias estritas e na presença de nitrato. *Marker* – Padrão de massas moleculares, FS – Fração Solúvel, Retângulo branco diz respeito às bandas da redutase do óxido nítrico. Géis desnaturantes de poliacrilamida 12,5% em tampão Tris-Tricina, e eletroforese realizada a 150 V durante 1 hora. Bandas de proteína visualizadas através de coloração com azul de *Coomassie*, como descrito nos Materiais e Métodos. 79

FIGURA 3.12. Géis desnaturantes e nativos (N) de poliacrilamida 12,5% e 10%, respetivamente, em tampão Tris-Tricina, e eletroforese realizada a 150 V durante 1 hora, das frações da N₂OR FP (A.) e da N₂OR D₂ (B.). Bandas de proteína visualizadas através de coloração com azul de *Coomassie*, como descrito nos Materiais e Métodos. FP – Fração da redutase do óxido nítrico de massa celular em condições microaerófilas, D₂ – Fração da redutase do óxido nítrico de massa celular em condições anaeróbias estritas. 80

FIGURA 3.13. Cromatograma da segunda etapa da purificação, cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular (matriz *Superdex* 75) da fração do citocromo c₅₅₂ obtida da primeira etapa (DEAE FF). As proteínas foram eluídas com 150 mM de NaCl em 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6. 82

FIGURA 3.14. Eletroforese em condições desnaturantes das frações obtidas ao longo da purificação do citocromo c₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas (A.) e anaeróbias estritas (B.), ambos na presença de nitrato. *Marker* – Padrão de massas moleculares, FS – Fração Solúvel, FP – Fração mais Pura, Retângulo azul diz respeito às bandas do citocromo c₅₅₂. Géis desnaturantes de poliacrilamida 12,5% em tampão Tris-Tricina, e eletroforese realizada a 150 V durante 1 hora. Bandas de proteína visualizadas através de coloração com azul de *Coomassie*, como descrito nos Materiais e Métodos. 83

FIGURA 3.15. Espectros de visível entre 300 e 600 nm do citocromo c₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em tampão Tris-HCl 10 mM, pH=7,6, isolado a partir de massa celular obtida em condições anaeróbias estritas. Vermelho – c₅₅₂ como isolado e Azul – c₅₅₂ reduzido com ditionito de sódio. Citocromo c₅₅₂ com uma concentração de 352 µM. No canto superior direito, encontram-se uma ampliação dos espectros na região entre 500 e 575 nm. 85

FIGURA 3.16. Cromatograma obtido para curva de calibração da cromatografia de exclusão molecular. No cromatograma estão representadas a preto as proteínas padrão correspondentes ao eixo vertical principal (lado esquerdo), a N₂OR_{micro} a azul e a N₂OR_{ana} a verde, que dizem respeito ao eixo vertical secundário (lado direito), numa coluna *Superdex*TM 200. Fer – Ferritina, Ald – Aldolase, Con – Conalbumina, Oval – Ovalbumina e Rib – Ribonuclease A. No canto superior direito encontra-se a reta de calibração, K_{av} (V₀: 7,74 mL e V_i: 24 mL), em função do logaritmo das massas moleculares. Círculos sem preenchimento pretos – Padrões, Círculo azul – N₂OR_{micro}, Círculo sem preenchimento verde – N₂OR_{ana}. A equação da reta de calibração é dada por K_{av} = - 0,2619.log (MM) + 1,657, com um R² = 0,9969. 86

FIGURA 3.17. Espectros de visível entre 350 e 950 nm da redutase do óxido nítrico em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, isolada a partir de um crescimento em condições microaerófilas na presença de nitrato (A) e condições anaeróbias estritas na presença de nitrato (B). Azul – N₂OR como foi purificada, Vermelho – N₂OR oxidada com ferricianeto de potássio, e Verde – N₂OR reduzida com ditionito de sódio. A redutase do óxido nítrico em (A) tinha uma concentração de 65 µM e em (B) de 75 µM. No canto superior direito encontram-se os géis de poliacrilamida em condições desnaturantes e condições nativas da enzima. M – Padrão de massas moleculares, D₂ – Proteína N₂OR_{ana}, FP – Proteína N₂OR_{micro} e N – Gel nativo. As eletroforeses em gel de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes e 10% em condições nativas em tampão Tris-Tricina, foram realizadas durante 1 hora a 150 V. Os géis foram corados com azul de *Coomassie*, como descrito nos Materiais e Métodos. 87

FIGURA 3.18. Espectros de visível entre 400 e 950 nm da redutase do óxido nítrico em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, isolada a partir de um crescimento em condições microaerófilas na presença de nitrato (A) e condições anaeróbias estritas na presença de nitrato (B) após ativação da enzima durante 5 horas e posterior *desalting* numa coluna NAP-5 *Sephadex*TM G25. Roxo Claro – N₂OR após eluição na NAP-5, Roxo Escuro – N₂OR após eluição na NAP-5 oxidada com ferricianeto de potássio. A redutase do óxido nítrico em (A) tinha uma concentração de 10 µM e em (B) de 4 µM. No canto superior direito encontram-se os espectros de visível entre 350 e 950 nm da redutase do óxido nítrico em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, e

condições anaeróbias estritas na presença de nitrato, ambas sem ativação. Azul – N₂OR como foi isolada, Vermelho – N₂OR oxidada com ferricianeto de potássio, e Verde – N₂OR reduzida com ditionito de sódio. A redutase do óxido nitroso em (A) tinha uma concentração de 65 µM e em (B) de 75 µM. 91

FIGURA 3.19. Coeficiente de extinção molar em função do comprimento de onda em tampão Tris-HCl 10 mM, pH=7,6. A – N₂OR isolada a partir de massa celular em condições microaerófilas na presença de nitrato (N₂OR_{micro}), B – N₂OR isolada a partir de massa celular em condições anaeróbias estritas igualmente na presença de nitrato (N₂OR_{ana}). Azul – N₂OR como purificada, Vermelho – N₂OR oxidada com ferricianeto de potássio, Verde – N₂OR reduzida com ditionito de sódio e Roxo – N₂OR após eluição na NAP-5. 94

FIGURA 3.20. Esquema da mediação eletrônica para a N₂OR. O citocromo c₅₅₂/metil-viologénio reduzido é imediatamente oxidado pela N₂OR, a qual é reoxidada depois da conversão do N₂O a N₂. 98

FIGURA A.1. Receita de Meio EMS (*Eau de Mer Synthétique*) líquido para crescimento da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. O meio é composto por 5 soluções, soluções A, B, C, D e E. As soluções A, B e C (vermelha, amarela e verde, respetivamente) são esterilizadas no autoclave a uma temperatura de 120 °C durante 20 minutos e a uma pressão de 1 bar, enquanto que as soluções D e E (azul e roxa, respetivamente) são esterilizadas por filtração à chama e conservadas a 4 °C. O Meio EMS é composto por 98,3% de solução A, 0,4% de solução B, 1% de solução C, 0,2% de solução D e 0,1% de solução E, constituídas pelos elementos evidenciados acima. A receita aqui apresentada é para um V_{total} = 1 L. 125

FIGURA A.2. Receita de Meio EMS (*Eau de Mer Synthétique*) sólido para crescimento da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. O meio é composto por 50% de Agar e 50% de EMS 2X. O Meio EMS 2X é constituído por 5 soluções, soluções A, B, C, D e E. As soluções A, B e C (vermelha, amarela e verde, respetivamente) são esterilizadas no autoclave a uma temperatura de 120°C durante 20 minutos e a uma pressão de 1 bar, enquanto que as soluções D e E (azul e roxa, respetivamente) são esterilizadas por filtração à chama e conservadas a 4 °C. O Meio EMS 2X é composto por 96,6% de solução A, 0,8% de solução B, 2% de solução C, 0,4% de solução D e 0,2% de solução E, constituídas pelos elementos evidenciados acima. A receita aqui apresentada é para um V = 250 mL (EMS 2X) e um V_{total} = 500 mL (Agar + EMS 2X). 126

FIGURA A.3. Quantificação de nitritos a preto (eixo vertical secundário) e variação da atividade de redução do N₂O a azul (eixo vertical principal), em função do tempo de crescimento a pH 7,5 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* em biofermentador de 10 L (condições microaerófilas e na presença de 10 mM de nitrato). Crescimento que se utilizou para purificar a N₂OR_{micro}. 130

FIGURA A.4. Espectros da N₂OR de *Paracoccus pantotrophus*^[73] (I.), de condições anaeróbias (A.) e aeróbias (B) (em função do coeficiente de extinção molar por monómero), e de *Achromobacter xylosoxidans*^[83] (II.), de condições anaeróbias. Linhas sólidas – oxidada com ferricianeto, linhas tracejadas – reduzida com ascorbato e linhas ponteadas – reduzida com ditionito. A – como foi isolada, B – depois de oxidação sob condições anaeróbias com ferricianeto e C – depois de redução com ditionito (em atmosfera anaeróbia). 131



ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1.I. Diferentes formas redox da enzima redutase do óxido nitroso (N ₂ OR) e máximos de absorvância característicos de cada centro. Adaptado de ^{[29],[75]} | 26 |
| TABELA 2.I. Proteínas do <i>kit</i> de calibração de filtração em gel (<i>HMW</i> e <i>LMW</i> da <i>GE Healthcare</i>), utilizadas para obtenção da reta de calibração para determinação da massa molecular aparente da enzima redutase do óxido nitroso. | 55 |
| TABELA 3.I. Valores comparativos dos crescimentos a diferentes pHs realizados em condições microaerófilas na presença de nitrato. | 63 |
| TABELA 3.II. Tabela resumo dos máximos de atividade obtidos para crescimento de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i> a diferentes pHs (6,5, 7,5 e 8,5), em condições microaerófilas e na presença de nitrato. | 69 |
| TABELA 3.III. Razões de pureza da fração final de redutase do óxido nitroso obtida da purificação do extrato periplasmático de massa celular de crescimento em condições microaerófilas na presença de nitrato. | 75 |
| TABELA 3.IV. Razões de pureza das frações finais de redutase do óxido nitroso obtidas da purificação do extrato periplasmático proveniente de crescimento em condições anaeróbias estritas na presença de nitrato. | 78 |
| TABELA 3.V. Tabela de purificação da redutase do óxido nitroso de massa celular obtida em condições microaerófilas e anaeróbias estritas na presença de nitrato como aceitador final de elétrons. | 81 |
| TABELA 3.VI. Razões de pureza das frações finais do doador de elétrons fisiológico, citocromo <i>c</i> ₅₅₂ , da redutase do óxido nitroso, obtidas da purificação do extrato periplasmático de massa celular em condições microaerófilas e anaeróbias, na presença de nitrato. | 83 |
| TABELA 3.VII. Tabela de purificação do citocromo <i>c</i> ₅₅₂ , doador de elétrons fisiológico da redutase do óxido nitroso, de massa celular obtida em condições microaerófilas e anaeróbias estritas na presença de nitrato como aceitador final de elétrons. | 84 |
| TABELA 3.VIII. Concentração da proteína total nas amostras de N ₂ OR isolada de um crescimento em condições anaeróbias estritas (N ₂ OR _{ana}), e de um crescimento em condições microaerófilas na presença de nitrato (N ₂ OR _{micro}), através do método de <i>Lowry</i> e do espectro na forma reduzida. | 92 |
| TABELA 3.IX. Estimativa do número de cobres por proteína ([Cu ²⁺]/[N ₂ OR]), da amostra da redutase do óxido nitroso de um crescimento efetuado em condições microaerófilas e anaeróbias estritas na presença de nitrato, N ₂ OR _{micro} e N ₂ OR _{ana} , respetivamente. Estimativa obtida pela concentração de cobre (através do método de quantificação de cobre do reagente 2,2'-Biquinolina) e proteína, e confirmado por ICP (plasma acoplado indutivamente). | 93 |
| TABELA 3.X. Valores experimentais dos coeficientes de extinção molar (ϵ) da redutase do óxido nitroso proveniente de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i> , e da literatura de <i>Pa. pantotrophus</i> ^[73] , <i>Achromobacter xylosoxidans</i> ^[83] e <i>Ps. stutzeri</i> ^[74] . No caso de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i> , obtiveram-se os valores de ϵ para ambas as enzimas em estudo (N ₂ OR _{micro} e N ₂ OR _{ana}). | 95 |
| TABELA 3.XI. Concentração da proteína N ₂ OR _{micro} , N ₂ OR _{ana} , N ₂ OR _{micro_5h} e N ₂ OR _{ana_5h} (as duas últimas após ativação da enzima) através dos coeficientes de extinção molar estimados. | 96 |

TABELA 3.XII. Tabela resumo das atividades obtidas para a N₂OR proveniente de um crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas e anaeróbias estritas na presença de nitrato, N₂OR_{micro} e N₂OR_{anaer}, respetivamente. 97

TABELA A.I. Composição e modo de preparação da solução do reagente Biureto para método de quantificação de proteína através do método de *Lowry*. 127

TABELA A.II. Composição quantitativa dos géis de poliacrilamida 12,5% (m/v) e 10% (m/v) em solução-tampão Tris-Tricina. Independentemente da percentagem do gel de separação, o gel de concentração é sempre o mesmo. O APS (do inglês, *Ammonium Persulphate*) ou Persulfato de amónia (*Sigma-Aldrich*®), e o TEMED (do inglês, *Tetramethylethylenediamine*, com a fórmula (CH₃)₂NCH₂CH₂N(CH₃)₂), da *Merck*, são adicionados imediatamente antes de colocar a solução no suporte de vidro, para evitar polimerização antes da aplicação da solução do gel no local adequado. As soluções para realização de géis são guardadas a 4 °C, à exceção do APS, que é conservado a -20 °C. O stock da mistura de Acrilamida/Bisacrilamida tem uma percentagem diferente para o gel de separação e concentração, 41,5%/1,5% (m/v) e 48%/1,5% (m/v), respetivamente. Caso o gel seja nativo, o tampão em que é efetuado o gel (Tris-HCl 3 M, pH 8,45 e 0,3% (m/v) de SDS), embora no mesmo volume, tem uma composição diferente (sem agente desnaturante, SDS). 128

TABELA A.III. Composição quantitativa da solução aquosa do tampão de amostras para eletroforese SDS-PAGE. A receita apresentada é para um V_{total} = 20 mL. Caso se trate de um gel nativo, o tampão não contém agentes desnaturantes (β-mercaptoetanol e SDS). 128

TABELA A.IV. Composição quantitativa da solução corante para géis SDS-PAGE e PAGE. A solução é feita com água destilada a 250 mL. Para géis nativos, a solução corante é a mesma. 128

TABELA A.V. Valores utilizados na determinação da massa molecular aparente da N₂OR_{micro} e N₂OR_{anaer}. Sendo que V_t = 24 mL, V₀ = 7,74 mL e que a equação da reta era K_{av} = - 0,2619 (log (MM)) + 1,657. 129

LISTA DE ABREVIATURAS

ϵ – coeficiente de extinção molar

λ – Comprimento de Onda

\varnothing – Diâmetro

ΔG° – Variação da energia livre de *Gibbs*

Abs – Absorvância

ASB – Albumina de Soro Bovino

Ac. – *Achromobacter*

ANAMOX – *ANAerobic AMmonia OXidation*

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina Trifosfato

CcP – Peroxidase do Citocromo c

cit – citocromo

COX – Oxidase do Citocromo c

CuNIR – Redutase do Nitrito de Cobre

DCM – Dicroísmo Circular Magnético

DE – Doador de Eletrões

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Dnr – Regulador da Respiração Dissimilativa de Nitrato

DnrD – Regulador da Redutase do Nitrito

DO – Densidade Ótica

DT – Ditionito de Sódio

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EMS – *Eau de Mer Synthétique*

Euk-NR – Redutase do Nitrato Eucariótica

FAD – Dinucleótido de Flavina-Adenina

FNR – Regulador da Redutase do Fumarato e Nitrato

FnrP – Sensor do Oxigênio

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*

G+C – Guanina + Citosina

GTP – Guanosina Trifosfato

h – horas

HMW – *High Molecular Weight*

ICP – Plasma acoplado indutivamente (do inglês, *Inductively-Coupled Plasma emission*)

K_{av} – Coeficiente de partição
LMW – *Low Molecular Weight*
Ma. – *Marinobacter*
MAD – Difração Anômala a Múltiplos Comprimentos de Onda
min – minutos
MM – Massas Moleculares
MV – Metil-viologénio
 N_2 – Azoto Molecular
 N_2O – Óxido Nitroso
 N_2OR – Redutase do Óxido Nitroso
 N_2OR_{FP}/N_2OR_{micro} – Redutase do Óxido Nitroso de massa celular obtida em condições microaerófilas
 $N_2OR_{D_2}/N_2OR_{ana}$ – Redutase do Óxido Nitroso de massa celular obtida em condições anaeróbias estritas
 NO_2^- – Nitrito
NAP – Redutase do Nitrato Periplasmática
NAR – Redutase do Nitrato
NAS – Redutase do Nitrato Assimilatória
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NEDA – *N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride*
NIR – Redutase do Nitrito
Nnr – Sensor do Óxido Nítrico
NO – Óxido Nítrico
 NO_x – Óxido de Azoto
NOR – Redutase do Óxido Nítrico
Pa. – *Paracoccus*
PAGE – *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
PHB – Poli- β -hidroxibutirato
pI – ponto Isoelétrico
ppb – Partes por bilião
ppm – partes por milhão
Ps. – *Pseudomonas*
rDNA 16S – Ácido Desoxirribonucleico correspondente à cadeia 16S do ribossoma
RPE – Ressonância Paramagnética Eletrónica

rpm – rotações por minuto

RR – Ressonância de Raman

s - segundos

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

Sec – Sistema Secretório Geral

Tat – Motivo *twin-arginine*

TMBZ – 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

Transportadores ABC – *ATP-Binding Cassette transporters*

U – $\mu\text{mol}_{\text{N}_2\text{O}}/\text{min}$

UA – Unidades Arbitrárias

UV – UltraVioleta

V_e - Volume de eluição

V_0 - Volume “morto”

V_t - Volume total

vvm – Volume de ar por volume de meio por minuto

Wo. – *Wolinella*



CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Marinobacter (Ma.) hydrocarbonoclasticus foi isolada próximo da costa Mediterrânea Francesa, perto de uma refinaria de petróleo^{[1],[2]}. É uma bactéria marinha Gram-negativa, extremamente halotolerante e moderadamente halofílica^{[1],[3]-[5]}, em forma de bastonete (0,3-0,6 µm de largura e 2-3 µm de comprimento na fase exponencial de crescimento), não forma esporos e move-se por meio de um flagelo polar (este flagelo é, no entanto, inexistente em meios de crescimento que apresentem uma concentração de NaCl fora do intervalo entre 0,2 e 1,0 M). *Ma. hydrocarbonoclasticus* é capaz de crescer em meios de cultura que possuam uma concentração de NaCl compreendida entre 0,08 e 3,5 M (sendo que a concentração ótima é de 0,6 M), numa gama de temperatura entre 10 °C e 45 °C, com temperatura ótima de crescimento a 32 °C e num intervalo de pH 6-9,5 (sendo o pH ótimo 7-7,5)^[1]. O crescimento anaeróbio ocorre na presença de nitrato, succinato, citrato ou acetato (mas não na presença de glucose), e é considerada uma bactéria desnitrificante, por utilizar o nitrato, em alternativa ao oxigénio, como aceitador de eletrões na cadeia respiratória, com produção de azoto molecular, ou seja, o seu genoma codifica para todas as enzimas da via metabólica da desnitrificação. Para além disso, é ainda capaz de degradar diversos hidrocarbonetos e utilizá-los como fontes de carbono e energia, e possui resistência a vários antibióticos, tais como novobiocina, tetraciclina, oleandomicina, estafilomicina e agente vibriostático O/129, sendo suscetível à penicilina G, canamicina, estreptomomicina, cloranfenicol, eritromicina, entre outros^{[1],[5]}. Esta bactéria é também, considerada como tendo um elevado potencial para a biorremediação de hidrocarbonetos, uma vez que é capaz de formar biofilmes na interface água-hidrocarboneto, dado que um dos maiores problemas da biodegradação dos hidrocarbonetos é a sua fraca

solubilidade em água^{[3],[6]}. Esta bactéria forma colónias em meio sólido, de cor branca que se tornam bege rosado após 48 h de incubação^[1].

A análise da sequência do rDNA 16S de *Ma. hydrocarbonoclasticus* mostrou que esta bactéria pertence à subclasse γ (gama) do grupo das *Proteobactérias*^{[1],[5]}. Este estudo evidenciou também a sua proximidade filogenética com outras espécies, tais como *Marinomonas vaga*, *Oceanospirillum linum*, *Halomonas elongata* e *Pseudomonas aeruginosa*. Devido à dificuldade de se encontrar uma única espécie significativamente mais próxima que estas inumeradas anteriormente, *Ma. hydrocarbonoclasticus* foi classificada, por Gauthier e colaboradores em 1992, como um novo género. A estirpe tipo foi depositada na *American Type Culture Collection* como ATCC 49840^[1]. No entanto, esta bactéria foi, inicialmente, classificada por Baumann *et al.* (1972), como *Pseudomonas (Ps.) nautica* através de um estudo de caracterização taxonómica de bactérias gram-negativas, flageladas, não fermentativas e de origem marinha, obtidas da costa de Oahu, Hawaii. Com base na caracterização fisiológica e nutricional, as estirpes foram associadas a diferentes grupos assentes em semelhanças fenotípicas (substratos orgânicos usados como fontes de carbono e energia, o conteúdo G+C do DNA e a capacidade de degradar hidrocarbonetos, bem como, ser uma bactéria desnitrificante)^{[7],[8]}. Deste estudo, *Ps. nautica* foi considerada como incapaz de acumular PHB (poli- β -hidroxibutirato) como produto intracelular de reserva^[7] e que necessita de sódio para o seu crescimento, sendo a presença simultânea de sódio e magnésio um requisito para se obter crescimento máximo^[9]. A desnitrificação embora considerada um processo anaeróbio, em *Ps. nautica* ocorre, também, na presença de oxigénio (O₂)^[10]. No entanto, o oxigénio afeta, de modo diferente, a atividade de cada uma das enzimas envolvidas no processo da desnitrificação. Roberston e Kuenen (1984), aquando do estudo deste processo noutras espécies, confirmaram esta afirmação, a desnitrificação pode ocorrer na presença de oxigénio^[10].

Segundo Baumann *et al.* (1972), eram necessários mais estudos a fim de obter as características adequadas que permitissem dividir este conjunto de organismos em géneros bem definidos^[7]. De facto, a reclassificação desta espécie foi realizada, mais tarde, por Spröer *et al.* (1998), fazendo um estudo comparativo entre as espécies *Ps. nautica* descrita por Baumann *et al.* (1972) e *Ma. hydrocarbonoclasticus* classificada por Gauthier *et al.* (1992). Esta nova análise baseou-se na comparação das sequências dos seus rDNA 16S, composição base do DNA genómico e hibridação DNA-DNA destas duas bactérias, as quais evidenciaram um elevado grau de homologia (cerca de 99,5%). Esta comparação foi confirmada através das suas propriedades fenotípicas e portanto, foi proposta a unificação das duas espécies^[11]. Assim sendo, transferiu-se a espécie *Pseudomonas nautica* para *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (ATCC 49840^T)^{[3],[11]}.

Um ano depois, Kita-Tsukamoto *et al.* (1999), vieram corroborar esta transferência, tendo em conta as suas necessidades nutricionais e suscetibilidade a antibióticos^[12].

Mais tarde, as espécies *Ma. hydrocarbonoclasticus* (Gauthier *et al.*, 1992) e *Ma. aquaeolei* (bactéria moderadamente halofílica isolada de uma plataforma petrolífera do Vietname do Sul), caracterizada por Huu *et al.* (1999), foram, também revistas por Márquez e Ventosa (2005), tendo sido, então, classificadas como sendo a mesma espécie^{[2],[5]}.

No presente trabalho utilizar-se-á a denominação de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (sinónimo de *Ma. aquaeolei*), uma vez que foi a primeira espécie descrita. A estirpe utilizada neste trabalho foi a *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617 (anteriormente designada por *Pseudomonas nautica* 617), sendo que a análise genética é baseada no genoma que se encontra depositado na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), como sendo de *Marinobacter aquaeolei*.

1.2. Ciclo do azoto

O azoto é um elemento essencial para os organismos vivos, isto porque é um elemento necessário para sintetizar macromoléculas biológicas como os ácidos nucleicos, os aminoácidos e, ainda, muitos cofatores de proteínas^[13]. Na biosfera, podemos encontrar compostos em que este elemento pode apresentar uma carga formal que pode ir desde +5 no nitrato (composto mais oxidado), à carga formal -3 na amónia (composto mais reduzido), sendo que, em compostos biológicos apresenta-se, quase exclusivamente, no seu estado totalmente reduzido. As interconversões destas espécies constituem o ciclo biogeoquímico global do azoto (Figura 1.1.), sustentado por processos biológicos que são realizados por enzimas que, por isso, desempenham um papel fundamental em cada etapa do ciclo^{[14]-[17]}.

O ciclo do azoto, integra reações de oxidação e redução, reações estas que, nas bactérias, estão relacionadas com sistemas de transporte de eletrões e, conseqüentemente, com a síntese de ATP (à exceção da reação de fixação de azoto que necessita de quantidades substanciais de energia)^{[18],[19]}. Logo, o ciclo é composto por reações de hidrólise e produção de ATP, sendo as primeiras pertencentes à via assimilativa (Fixação de Azoto) e as de produção de energia pertencentes à via dissimilativa (Nitrificação, Desnitrificação, Amonificação)^[19].

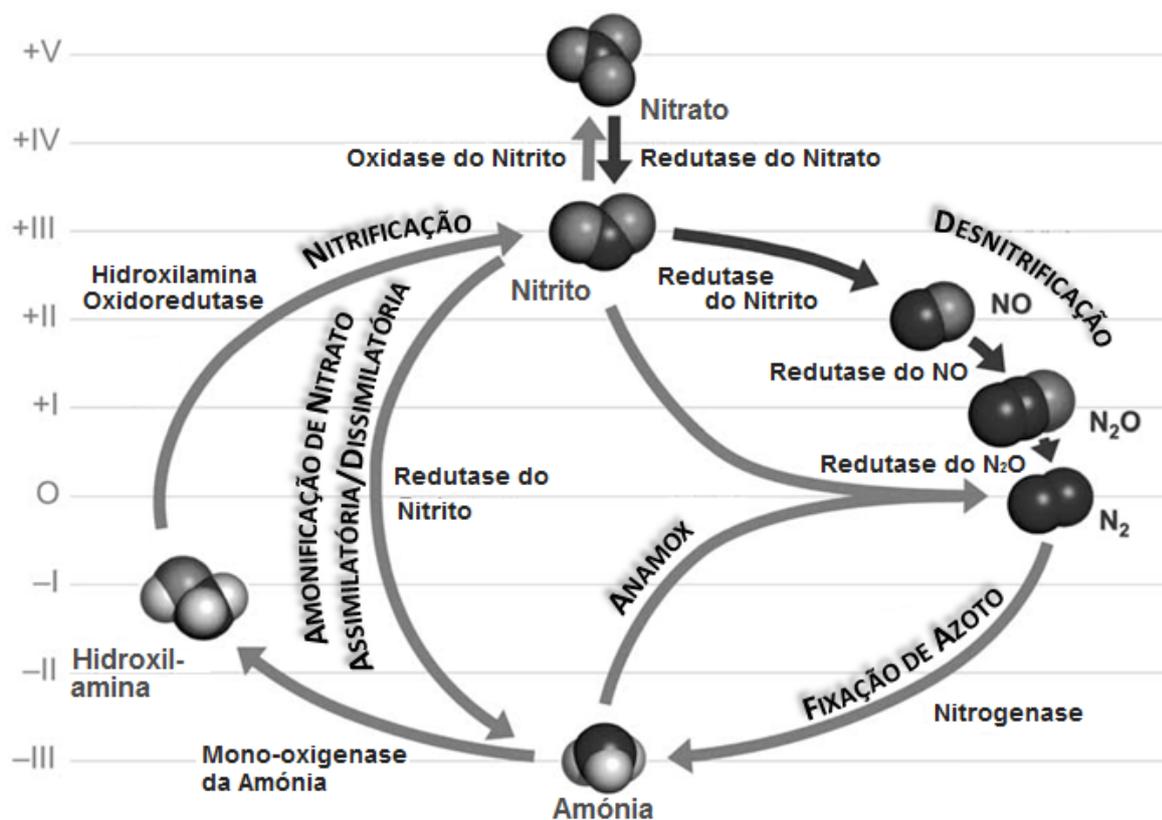


Figura 1.1. Ciclo biogeoquímico do Azoto indicando cada uma das enzimas que são responsáveis por cada reação. As setas representam as reações catalisadas por cada uma das enzimas. Na margem esquerda estão representados os números de oxidação do azoto de cada composto. NO – Óxido Nítrico, N₂O – Óxido Nitroso, N₂ – Azoto Molecular, ANAMOX – do inglês *ANAerobic AMmonia OXidation*. As setas que se encontram representadas de cima para baixo, dizem respeito aos processos de redução; as setas no sentido inverso (de baixo para cima) correspondem aos processos de oxidação. Adaptado de^{[14],[15]}.

Dos processos biológicos do ciclo do azoto (ver Figura 1.1.), a fixação de azoto que gera amónia, é realizada por procariotas, mas já a redução do nitrato é realizada por bactérias, fungos, algas e plantas superiores, sendo que, alguns procariotas podem obter energia através de processos redox que envolvem compostos de azoto, como a nitrificação e a desnitrificação. A nitrificação realizada por bactérias autotróficas, é um processo constituído por duas etapas, a conversão de amónia em nitrito (através da hidroxilamina) e a oxidação do nitrito a nitrato (pela oxidase do nitrito), que devido à necessidade de oxigénio é um processo, normalmente, considerado como obrigatoriamente aeróbio (embora na literatura haja a descrição de um exemplo em que este processo, aparentemente, ocorra na ausência de oxigénio Mulder *et al.*). A desnitrificação é um processo respiratório através do qual o nitrato é sucessivamente reduzido a nitrito, óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) e azoto molecular (N₂), que ocorre, predominantemente, em condições anaeróbias por bactérias anaeróbias facultativas^{[14]-[18],[20],[21]}. A amonificação é a redução dissimilatória do nitrato a amónia (processo que está envolvido na libertação de amónia a partir de compostos de azoto orgânico)^{[14],[20]}. A via

metabólica da desnitrificação é ativada por dois parâmetros ambientais, disponibilidade de um óxido de azoto (NO_x) e baixa tensão de oxigénio^[20].

Durante algum tempo, a desnitrificação foi considerada como o único mecanismo de produção de N_2 nos oceanos, contudo, mais recentemente foi descoberto que a conversão de compostos azotados (nitrato, nitrito e amónia) a N_2 , em larga escala, também podia ocorrer através da oxidação anaeróbia de amónia (ANAMOX, do inglês, *ANAerobic AMmonia OXidation*), que não é mais do que a reação que produz N_2 por redução do nitrito e oxidação da amónia em condições anaeróbias. Este processo, foi a mais recente descoberta no âmbito do ciclo biogeoquímico do azoto, e tem elevada relevância ecológica, em especial em ambientes marinhos^{[14],[15],[22]}.

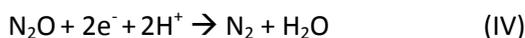
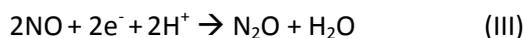
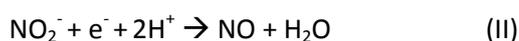
Muito do azoto antropogénico é perdido para o ar, água e terra, o que causa uma série de problemas ambientais e de saúde humana, pelo que a redução de nitrato desempenha um papel fundamental no ciclo do azoto e tem importantes implicações para a agricultura, ambiente e saúde pública^{[15],[16],[23]}. Embora cerca de 80% da atmosfera terrestre seja constituída por N_2 , a disponibilidade de azoto é geralmente o fator limitante para a produção de biomassa vegetal. Este elemento, encontra-se principalmente disponível para consumo na forma de nitrato, sendo que esta fonte de azoto tem sido usada na agricultura de forma intensiva^[24]. O uso excessivo de fertilizantes nas atividades agrícolas levou à acumulação significativa de nitrato nos solos, nas águas superficiais e na água potável. De facto, os nitratos e os nitritos são, atualmente, os maiores poluentes da água e uma grande preocupação é o facto do nitrato ter que ser removido antes da água ser fornecida aos consumidores. Aos elevados níveis de nitrato têm sido associadas doenças devido à formação de compostos altamente tóxicos. Contudo, estimativas preveem que apenas cerca de metade do azoto que é utilizado como adubo é assimilado em biomassa, enquanto a outra metade é perdida através de processos biológicos, dos quais a desnitrificação bacteriana é o mais importante^{[15],[24]}. Portanto, é de grande interesse o estudo de vias metabólicas bacterianas que podem efetivamente reduzir o nitrato a N_2 , em especial em organismos que podem ser encontrados em sedimentos de água doce ou do mar^[21]. Sendo, portanto, o ciclo do azoto fundamental para todos os ecossistemas, com particular importância no meio marinho. A fixação de azoto é o processo biológico fundamental, através do qual o novo azoto é adicionado nos oceanos^{[21],[24]}. Assim sendo, a principal ameaça para o meio ambiente vem da eutrofização dos ecossistemas aquáticos. A redução de nitrato, um importante foco de investigação, pode ser realizada com três finalidades diferentes: a utilização de nitrato como fonte de azoto no metabolismo (amonificação assimilatória), a geração de energia metabólica usando nitrato como aceitador final de eletrões (respiração, desnitrificação), e a dissipação do

poder redutor em excesso para o equilíbrio redox (amonificação dissimilatória). Com efeito, a desnitrificação é um dos passos utilizados para remover o azoto de esgotos e de águas residuais^{[16],[25]}.

1.2.1. Desnitrificação

O metabolismo de redução de nitrato a azoto molecular, ou desnitrificação, é um processo anaeróbio utilizado por algumas bactérias para a produção de energia^{[15],[25],[26]}. Contudo, este processo pertencente ao ciclo global do azoto, também pode ocorrer na presença de oxigénio^[26]. A desnitrificação é crucial em vários processos ambientais, tais como a acumulação de nitrato e a libertação de óxido nitroso (N₂O) para a atmosfera. O N₂O é um potente gás de efeito de estufa (tal como o CO₂ e CH₄, mas com uma eficiência superior), com tempo de meia-vida na atmosfera de 114 anos, e responsável pela depleção da camada do ozono (na atualidade, é mesmo o maior responsável por este problema ambiental). Este gás possui uma concentração troposférica de aproximadamente 300 ppb (partes por bilião) por volume, tendo-se observado um aumento da sua concentração de cerca de 20% nos últimos 100 anos. As emissões globais do N₂O para a atmosfera têm vindo a aumentar consideravelmente, sobretudo desde a introdução do processo *Haber-Bosch* que levou ao uso frequente e cada vez mais abundante de fertilizantes azotados^{[13],[15],[16],[20],[25],[27]–[29]}.

A reação global da desnitrificação, redução do nitrato a azoto molecular com a participação de 10 eletrões e 12 prótons ($2\text{NO}_3^- + 10\text{e}^- + 12\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$), é realizada por quatro metaloenzimas diferentes:



A equação (I), redução de nitrato a nitrito, é catalisada pela redutase do nitrato contendo um centro ativo de molibdénio (NAR); a reação apresentada na equação (II), redução do nitrito a óxido nítrico, pode ser catalisada por dois tipos de redutase do nitrito (NIR), citocromo *cd*₁ ou uma enzima contendo dois centros de cobre, em (III) duas moléculas de óxido nítrico são conjugadas para formar óxido nitroso e água, reação que é catalisada pela enzima redutase do óxido nítrico, que contém centros de ferro não-hémico e hemo *c* e *b* (NOR) e, por fim, a última reação da desnitrificação, correspondente à equação (IV), redução do óxido nitroso a azoto molecular, catalisada pela enzima em que se foca este trabalho, a redutase do óxido nitroso (N₂OR), a qual possui dois centros de cobre distintos (centro CuA e centro CuZ). Por ser a

responsável pelo último passo da desnitrificação, é uma enzima de elevada importância por contribuir para a diminuição do efeito de estufa (diminuição da concentração de óxido nítrico), evitando a toxicidade do óxido nítrico, tanto para as células como para o ambiente^{[15],[17],[25]}.

De salientar, ainda, que a redução direta do nitrato a amónia também é possível em alguns organismos. Neste caso, uma redutase do nitrito penta-hémica é responsável pela redução de seis eletrões do nitrito a amónia^[25].

A Figura 1.2., representa esquematicamente o processo de desnitrificação que ocorre no periplasma de bactérias desnitrificantes, em que a redutase do nitrito é o citocromo *cd*₁, que é a enzima presente em *Ma. hydrocarbonoclasticus*, organismo que será usado neste trabalho.

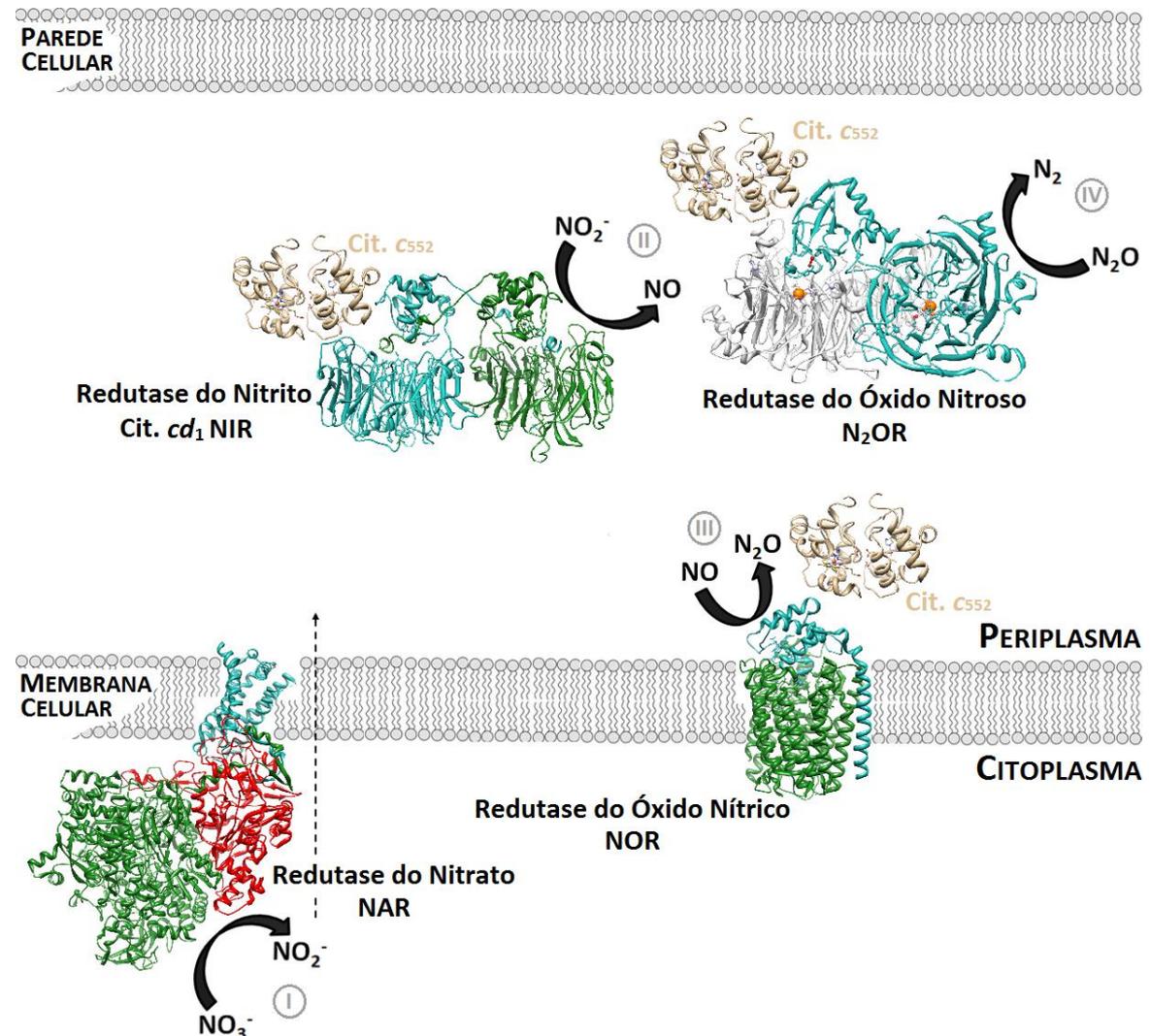


Figura 1.2. Esquema da desnitrificação em bactérias gram-negativas desnitrificantes, adaptado para o que acontece no periplasma da bactéria em estudo, *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas e na presença de nitrato. Apesar de não estar representada, a peroxidase do citocromo *c* também está presente. NAR – redutase do nitrato; NIR – redutase do nitrito ou citocromo *cd*₁; NOR – redutase do óxido nítrico; N_2OR – redutase do óxido nítrico e cit. *c*₅₅₂ – citocromo *c*₅₅₂. Códigos do PDB: NAR – 1Y4Z, NIR – 1NIR, NOR – 3OOR, N_2OR – 1QNI e Cit. *c*₅₅₂ – 1CNO (apenas as últimas duas estruturas são de enzimas isoladas de *Ma. hydrocarbonoclasticus*). Adaptado de^{[16],[27],[30]}.

1.2.1.1. Redutase do nitrato

As redutases do nitrato (NAR) catalisam a redução do nitrato a nitrito (equação (I)). A maioria destas enzimas contendo molibdênio estão presentes em diversos organismos vivos e, para além do centro ativo constituído por molibdênio, possuem um centro redox adicional que medeia as reações de transferência eletrónica entre o doador e o aceitador eletrónico (nitrato), cofatores de ferro-enxofre e hémicos. As NARs estão classificadas em quatro grupos diferentes, redutases do nitrato eucarióticas (Euk-NR), redutases do nitrato assimilatórias (NAS), redutases do nitrato respiratórias (NAR) e redutases do nitrato periplasmáticas (NAP). As NAR são enzimas membranares envolvidas, exclusivamente, na desnitrificação, apresentando três subunidades, NarG (α), NarH (β) e NarI (γ). A subunidade NarG possui o centro ativo da enzima, ao passo que as outras subunidades contêm centros de transferência eletrónica. O complexo NarGH está localizado no citoplasma; contudo, permanece na superfície interna da membrana citoplasmática através da subunidade transmembranar (ou proteína integral de membrana), NarI^{[15],[25],[31]}.

As NAR podem ser purificadas com e sem a subunidade NarI, dependendo do processo de purificação. A subunidade catalítica, NarG (α), possui um centro de molibdênio e um *cluster* de [4Fe-4S], sendo o átomo de molibdênio coordenado por quatro átomos de enxofre e pela cadeia lateral de um resíduo de aspartato. A subunidade NarH (β) contém um *cluster* de [3Fe-4S] e três de [4Fe-4S], e a subunidade NarI (γ) tem dois hemos do tipo *b*^{[15],[25]}.

1.2.1.2. Redutase do nitrito

A redutase do nitrito (NIR) é a enzima chave para ativar as quatro redutases responsáveis pela desnitrificação e catalisa a redução do nitrito a óxido nítrico, (ver equação (II)). Em bactérias desnitrificantes existem dois tipos de redutases do nitrito, o citocromo *cd*₁, um homodímero, e uma enzima de cobre trimérica (CuNIR), sendo que ambas possuem dois centros localizados em dois domínios estruturais diferentes, um centro de transferência eletrónica e um centro catalítico^[25].

Estas duas redutases do nitrito diferem nos seus grupos prostéticos. O citocromo *cd*₁ contém dois domínios hémicos, um que possui o hemo tipo *c* ligado covalentemente e que controla a transferência eletrónica, enquanto que o hemo tipo *d*₁ é o centro catalítico da enzima. Quando ambos os centros estão na forma oxidada, o ferro do hemo *d*₁ é coordenado axialmente pela cadeia lateral de um resíduo de tirosina e outro de histidina. Aquando da redução são visíveis alterações na esfera de coordenação de ambos os hemos, *c* e *d*₁. A cadeia lateral de

tirosina deixa de coordenar o átomo de ferro, ficando este com um local de coordenação vazio, para ligação do substrato ao hemo d_1 ^{[25],[32]}. O nitrito liga-se através de um átomo de azoto ao átomo de ferro, e já se observou, através de cristalografia de raios-X, uma forma da enzima com o produto da reação, óxido nítrico, ligado ao hemo d_1 . O hemo c também sofre alterações na esfera de coordenação – quando ambos os hemos estão oxidados, o hemo c está coordenado por duas histidinas, sendo que, após redução, se torna coordenado pela cadeia lateral de uma metionina e uma histidina, o que indica que ambos os hemos agem de forma coordenada^[32]. A transferência eletrônica inter- ou intramolecular pode controlar a taxa de redução do nitrito a óxido nítrico, dependendo do pH. Para valores de pH mais ácidos, a velocidade de transferência eletrônica intramolecular é limitante (sendo o doador de elétrons, o citocromo c_{552} ^{[32],[33]}), o que evita a formação de Fe(II)-NO. Contudo, à medida que se altera o valor de pH para valores mais básicos, a constante de velocidade para a transferência eletrônica intramolecular diminui e torna-se cada vez mais limitante, permitindo a formação de Fe(II)-NO^[33].

Na forma oxidada, o hemo c possui bandas de absorção máxima aos comprimentos de onda de 520 e 411 nm, enquanto o hemo d_1 possui uma banda alargada ao comprimento de onda de, aproximadamente, 470 nm e uma banda a 640 nm. Na forma reduzida, o hemo c sofre alteração nos máximos de absorção observando-se, neste caso, bandas aos comprimentos de onda de 548, 520 e 417 nm, sendo as bandas de absorção a 650 e 456 nm características do hemo d_1 ^[25].

A CuNIR é um trímero com dois tipos de centros cobre: um centro de cobre Tipo I e outro Tipo II. O centro de cobre Tipo I, com uma geometria tetraédrica distorcida. A esfera de coordenação do cobre está completamente preenchida por 4 ligandos, duas histidinas, uma cisteína e uma metionina, e corresponde ao centro de transferência eletrônica. O centro de cobre do Tipo II é coordenado por três resíduos de histidina e uma molécula de água. Este centro está localizado entre dois monómeros, correspondendo ao centro catalítico da enzima. Este último centro é facilmente identificado por conter a molécula de água como quarto ligando e, assim, possuir a esfera de coordenação completamente preenchida. A CuNIR altera o local onde ocorre a redução do substrato, sendo que a molécula de água que coordena o centro catalítico pode facilitar a ligação do mesmo, pois sendo a água um ligando fraco, pode facilmente ser substituída pelo substrato^{[25],[32]}.

É de salientar, ainda, que as CuNirs foram classificadas em dois grupos diferentes, tendo em consideração as propriedades espectroscópicas do centro de cobre do tipo I: as Redutases Azuis, as quais exibem uma banda de absorção bastante intensa a um comprimento de onda aproximado de 590 nm e sinal de RPE (Ressonância Paramagnética Eletrônica) axial, e as

Redutases Verdes que possuem duas bandas de absorção máxima aos comprimentos de onda de 460 e 600 nm, e um sinal de RPE rômboico^[25].

Embora a maior parte das estirpes desnitrificantes estudadas contenham redutases do nitrito hémicas (citocromo *cd₁*), as redutases do nitrito de cobre (CuNIR) estão presentes num maior número de géneros^[25].

1.2.1.3. Redutase do óxido nítrico

A redutase do óxido nítrico (NOR) catalisa a redução do óxido nítrico a óxido nitroso (Equação (III)). É uma enzima integral de membrana, existindo três classes de NOR identificadas em bactérias, cNOR, qNOR e qCuNOR, as quais diferem, sobretudo, nos doadores eletrónicos e no tipo e número de centro de transferência eletrónica presentes na enzima.

A cNOR possui como doadores eletrónicos um citocromo *c* solúvel ou uma cupredoxina, sendo composta por duas subunidades, NorB (subunidade catalítica) e NorC (subunidade de transferência eletrónica). A primeira é uma subunidade maior (56 kDa) e possui dois hemo tipo *b* e um ferro não-hémico. Por sua vez, a subunidade NorC, a mais pequena (17 kDa), contém um hemo tipo *c*. As redutases do óxido nítrico presentes na bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* pertencem a esta classe^{[15],[25],[31]}.

A qNOR possui apenas uma subunidade, sendo que, através da observação da sua estrutura, foi proposto que esta é formada pela fusão das subunidades NorB e NorC acima descritas. A qNOR recebe eletrões a partir de quinóis, pelo que é proposto que ao longo da evolução, esta enzima tenha perdido o hemo *c* e ganho um local de ligação ao quinol^[25].

A terceira classe de redutases do óxido nítrico é a qCuNOR, formada por duas subunidades. A subunidade catalítica, maior, que é semelhante à NorB (pertencente à cNOR), enquanto que a subunidade mais pequena não possui o hemo tipo *c*, mas possui um centro CuA para transferir os eletrões para a subunidade catalítica. Os doadores eletrónicos desta enzima são a menaquinona ou o citocromo *c₅₅₁*^[25].

1.2.1.4. Redutase do óxido nitroso

O último passo da desnitrificação, redução do óxido nitroso a azoto molecular e água, com a participação de dois eletrões e dois protões (Equação (IV)), é catalisado pela enzima em estudo, redutase do óxido nitroso (N₂OR). Esta reação é extremamente exergónica ($\Delta G^{\circ} \approx -340$ kJ.mol⁻¹), devido à estabilidade do produto final da mesma (N₂) e, visto o óxido nitroso ser cineticamente inerte bem como pelo facto do cobre ser um fraco metal de transição

(propriedades de σ -doador e π -aceitador fracas), é um desafio para ser levada a cabo por uma metaloenzima^{[34],[29]}. Contudo, a N_2OR é a única enzima que possui, como função principal, a catálise desta reação^[29]. Esta enzima já foi isolada e caracterizada de vários organismos que realizam a via completa da desnitrificação, sendo que todas elas possuíam apenas cofatores de cobre^{[15],[25],[31]}.

Devido ao facto do trabalho realizado para esta dissertação ser sobre a enzima Redutase do Óxido Nitroso, faremos, seguidamente, uma descrição mais detalhada da mesma.

1.3. A enzima redutase do óxido nitroso (N_2OR)

1.3.1. Cobre, cofator da redutase do óxido nitroso

A N_2OR , que é o foco principal deste trabalho, é a responsável por catalisar o último passo da desnitrificação, a redução do óxido nitroso a azoto molecular ($N_2O + 2e^- + 2H^+ \rightarrow N_2 + H_2O$). Esta enzima requer cobre para a sua atividade e, portanto, conta com as propriedades deste elemento para o êxito do último passo da desnitrificação^[13].

Nas bactérias, ainda não foi identificado nenhum sistema de armazenamento de cobre (com exceção de algumas bactérias metanotróficas que excretam compostos quelantes de cobre), como acontece para o ferro, em que muitas bactérias possuem formas para quelar o ferro de modo a extraí-lo do meio ambiente, tais como sideróforos. Este elemento pode ainda ser armazenado dentro das células no interior de proteínas, como as ferritinas, de modo a evitar que reaja com o oxigénio gerando produtos que possam ser tóxicos para o DNA, como exemplo. Deste modo, a disponibilidade do cobre para a célula, depende da sua concentração no meio externo. Este facto, foi comprovado em experiências laboratoriais através das quais, em meios com deficiência de cobre se observa grande emissão de N_2O por comparação com meios com concentrações suficientes de cobre. Pelo que se concluiu que a N_2OR é uma enzima dependente deste elemento, o cobre^{[13],[27]}.

O ião cobre quando se encontra livre é extremamente tóxico^{[13],[35]}, pois reage com várias moléculas, como o peróxido de hidrogénio, formando radicais hidróxilo. Em contrapartida, é um elemento essencial em sistemas vivos, pois é um cofator de várias proteínas envolvidas em reações de oxidação/redução e de transporte de oxigénio. Um exemplo, é a enzima terminal da cadeia de transporte de eletrões, oxidase do citocromo *c*, que catalisa a redução de oxigénio a água (respiração aeróbia)^{[36],[37]}. Por sua vez, é também essencial para a respiração anaeróbia de bactérias desnitrificantes, pois é o cofator de proteínas transportadoras de eletrões, como a azurina e as enzimas da via da desnitrificação, a redutase do nitrito (NIR) e a redutase do óxido nitroso (N_2OR)^[37]. Segundo Enwall *et al.* (2010)^[38], existe uma relação positiva entre o teor de

cobre do solo e da abundância dos genes NirK, que codificam para este tipo de redutases do nitrito^[13]. Pelo que, o cobre é um elemento chave na desnitrificação já que é essencial para a redução completa do óxido nitroso a azoto molecular, e em algumas bactérias para a redução do nitrito^{[13],[27]}.

1.3.2. Sequência primária da redutase do óxido nitroso

O alinhamento da sequência primária de N₂ORs de estruturas conhecidas (Figura 1.3.), mostra uma grande homologia, entre a N₂OR de *Ac. cycloclastes* e *Pa. denitrificans* (cerca de 88%), sendo que, a N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* apresenta menor identidade relativamente à enzima destas duas espécies anteriores (aproximadamente 57% e 58%, respetivamente). É de salientar, que tendo em consideração a sequência primária de N₂OR de *Ps. stutzeri*, a enzima que apresenta maior homologia com esta, é a N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (aproximadamente 74%). A comparação das sequências primárias revela a presença de vários resíduos conservados, que na sua maioria, são resíduos envolvidos na coordenação dos dois centros redox da enzima, os centros CuA e CuZ, mas também resíduos que têm sido propostos como estando envolvidos na transferência eletrónica entre o centro CuA e o centro catalítico, CuZ^{[29],[40]–[42]}. De facto, através do alinhamento apresentado na Figura 1.3., pode-se salientar o facto de na região N-terminal se encontrarem sete resíduos de histidina conservados, que dizem respeito aos resíduos que coordenam o centro CuZ, enquanto que na região C-terminal, existem duas histidinas e cisteínas, uma metionina e um resíduo de triptofano conservados, que estão envolvidos na coordenação do centro CuA, como se poderá observar na secção 1.3.4. do presente capítulo. Os outros resíduos igualmente conservados, realçados a roxo, correspondem aos resíduos propostos como estando envolvidos na transferência eletrónica, que ocorre do centro intermediário da transferência, CuA, para o centro CuZ, centro catalítico da enzima em estudo, N₂OR^[29].

A análise da sequência primária destas enzimas, representada na Figura 1.3., revela ainda a presença de um péptido sinal na região N-terminal (entre 35 a 40 resíduos), contendo o motivo conservado de *twin-arginine*^{[29],[41]}, que é reconhecido pelo sistema de translocação dependente de uma dupla arginina (*twin-arginine translocation-Tat system*) e que, em proteobactérias, é definido pelos resíduos SRRXF/L (no qual, os resíduos consecutivos de argininas são praticamente invariáveis ao contrário dos outros aminoácidos, que são encontrados com uma frequência de aproximadamente 50% e onde o X representa qualquer aminoácido polar). Este sistema de translocação *Tat* é responsável pelo movimento das proteínas *folded* para o periplasma, através da membrana citoplasmática^{[41],[42]}.

```

Ma.h MKKRDDLTKDTPPEVSEG-GLSRRREFMGAAA-----LAGVAG-----ATGLGTSVMSRETWAAAABEARKAHVAPCELDVEYCYGFWSGGHGQEVRLGVPSMRELMRIPFNVDSATGW 107
Ps.s MSDKD--SKNTPQVPEKLGSRRGFLGASA-----VTGAAVA-----ATALGGAVMTRESMAQAVKESKQKIHVGPPELDQDYYGFWSGGHGQEVRLGVPSMRELMRIPFNVDSATGW 107
Ac.c MESKE-----HK-GLSRRALFSATAGSAILAGTVG-----PAALSGLGAAGLATPARA-----ATGADGVSVAPKGLDDYYGFWSGGGTGEMRIILGISMRELMRVFNVRCSATGW 99
Pa.d MESKQ-----EK-GLSRRALDGATAGAAVAGAFGRLLAGPALGGTAGVATVAGSNAALAAASGDGVSVAPQDLDDYYGFWSGGSGEMRIILGISMRELMRVFNVRCSATGW 109
Wo.s -----GORLLKQSLAVTASLLALGTASLAS-----SDLQTIKKERKLTAKVQSPISGSGQSLLVVYGVSRMRKYYKYGVTPEPWWQGY 95
          * : : : : : : : : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Ma.h GITNESKEILG-----GDOXXLNGDCHHPHISMTDGRYDGKYLEINDKANTRVARIRLDIMKTDKITHIPNPQAIHGLRLQXVKPTNVPVFCNAEVIPOPNGDQDFSLD-- 211
Ps.s GLTWESRHMVG-----DSAKFLNGDCHHPHISMTDQKDGKYLEINDKANTRVARIRLDIMKDKMIVTVPVQAIHGLRLQXVPHTKYFANAEEIIPHPNDGKVFDLQDE 213
Ac.c GQTNESIRIHHORTMTEKTKQLAAANGKIHHDGDLHHVHMSFTDGKDGRLFWNDKANTRVARVRCVDMKTDALILEIPNAKGIHMERPOXWFRSNVYFCNGEDAPLVNDGSTMTDVA-- 218
Pa.d GQTNESIRIHERTMSERTKHHLAANGKRIHDGDLHHVHMSFTDGKDGRLFWNDKANTRVARVRCVDMKCDALILEIPNAKGIHGLRPOXWFRSNVYFCNGEDAPLVNDGSTMTMEDVA-- 228
Wo.s GFDSDSRKRLRQ-----GDIRGREINWGDTHHEPNTEKNGEVGDYLEINDKANPRIAVVLHDFTTQIAVNPIMKSEGG--SFVTPNTEVYIEASQYAAPLDHDQYHPTEEYEA 204
          * : * : * : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          ** * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Ma.h NSYTFETAIDAEITMDVAWQVIVDG-----NLDNTDADYTGKYATSITCNSERAVD-----LAGTMRNDRDWWVFNVERIAAIAVKAAG-NFKTTIGDSKVPVVDGREG-- 308
Ps.s NSYTYNAIDAETMEMAFQVIVDG-----NLDNTDADYTGFRFAAATCYNSEKAFP-----NLDNTDADYTGFRFAAATCYNSEKAFP-----LGGMNRNERDWWVFNVERIAAIAVKAAG-DEITIGDSEKTPVLDRGKDGKDSK 314
Ac.c TYVNIFTAVDADKWEVAMQVIVSG-----NLDNCADAYEGKWAFSTINSEMGMT-----LEEMTKSEMDHVVFNFAEIAEKAKAG-QYEELING--VKVVDGRKE--AKSL 315
Pa.d NYVNVFTAVDADKWEVAMQVIVSG-----NLDNCADAYEGKWAFSTINSEMGMT-----LPEMTRAEMDHIVFNFAEIAEKAKAG-DYQELNG--VKVVDGRKE--ASSL 325
Wo.s VFRGAVTLMKRFDYAKGIDEKAKASFLEFPYMQDLSDAKGSESFGWAFSTINSEMGMT-----LPEMTRAEMDHIVFNFAEIAEKAKAG-DYQELNG--VKVVDGRKE--ASSL 325
          * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Ma.h FTRYIPVKNPHGLNTSDPKYFIFANGKLSFTVSVIAIDKLLDLFDKIE-----LRDITVAEDELGLGPLHTFDGGR-GNAYTTLFIDSQVCKWNIADAKHYNGDKNVYIR 415
Ps.s FTRYVVPKNPHGNTSDGKYFIAAGKLSPTCSMIAIDKLLDFAGKLA-----PRDIVGEEDELGLGPLHTFDGGR-GNAYTTLFIDSQVCKWNIADAKHYNGDKNVYIR 422
Ac.c FTRYIPVKNPHGCMAPRKHLCVAGKLSFTVTVLVDVTFKDALFYDNAE-----PRSAVVAEDELGLGPLHTFDGGR-GNAYTSLFLDSQVCKWNIADAKHYNGDKNVYIR 422
Pa.d FTRYIPVKNPHGCMAPRKHLCVAGKLSFTVTVLVDVTFKDALFYDNAE-----PRSAVVAEDELGLGPLHTFDGGR-GNAYTSLFLDSQVCKWNIADAKHYNGDKNVYIR 432
Wo.s ALFLIPEKSPHGVDVSDGRYIVVGGKLDTHASVIDFRKIKQLIDRKEFIGADPYGPIILDMMKTLHGQVGLGPLHTFYDAQGGIIYTSLYVDQIVRWDKNKL-----VL 430
          * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Ma.h QKLDVYQPGHNHASLESRDADGKWLVLSKFSKDRELFVGPHLHPNDQLIDISGEMKLVHDGPT--YAEPHDCILVRRQIK--TKKIERNDRDYFASCRQAEKKGVTLES--DNKVIR 532
Ps.s QKLDVHYQPGHLHASLCETNEADGKWLVLSKFSKDRELFVGPHLHPNDQLIDISGEMKLVHDGPT--YAEPHDCIMARRQIK--TKKIMRDNDFPAPVTEMAKKDGINLDT--DNKVIR 539
Ac.c DKLDVYQPGHLKVTMGETLDAANDWLVLCKFSKDRELAVNPPKLPENDQLIDISGOKMVLVHDGPT--FABPHDALAVPSILPNIRSVWRKKLDETRKAQAEADVDIDEWTEAVIR 541
Pa.d DKLDVHYQPGHLKVTMGETLDATNDWLVCLSKFSKDRELAVNPPKLPENDQLIDISGOKMVLVHDGPT--FABPHDALAVPSILPNIRSVWRKKLDETRKAQAEADVDIDEWTEAVIR 551
Wo.s DRVVHNYIGHLDSMEGKSAKPKGKYALALDLSIDRENFVGPHLHPQHLDIDIGGPKMELLYDLPILGEPHDVISIAADKLK-----PQVTPMGTNSRTKQHEAMTLAG--QERVER 544
          * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Ma.h DGNKRVYMTSVAPQYGMTDFVKKEGDEVTVYITNLDMVGDVTEGFCMVNHGVSMEISPOQTASVTFTAGKPGVYYCNFCHALHEMGRMLVEKA-----631
Ps.s DGNKRVYMTSVMAPAFGYQBETVKQGEDEVTVYITNIQIEDVSGFVVVNHGVSMEISPOQTASVTFTAGKPGVYYCNFCHALHEMGRMLVEKA-----638
Ac.c DGNKRVYMTSVAPFPSQPSFTVKKEGDEVTVYITNLDEIDDLTGFTMGNHGVAMEVPOQTSSVTFEAANPGVYYCQNFCHALHEMGRMLVEPKA-----642
Pa.d DGNKRVYMTSVAPFPSIESFTVKKEGDEVTVYITNLDEIDDLTGFTMGNHGVAMEVPOQTSSVTFEAANPGVYYCQNFCHALHEMGRMLVEPKA-----652
Wo.s KGNBEVKIYGTLIRSHNPEHVTNVKGDKVTFYLTLNERAQDETFGFVSVGNVHASVEPKTAVTFTADEEGVPFYYCTECSALHEMGRMLYLVDPKKKYESKLKQKMSKEQLE 664
          * : : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Wo.s SEYKKVIATNKATDDVIQSVVKFLKRNYAKYPKVSLVEDALDQYKGIGEVKAKADESYRKKGDVNGAILMEYQVWQVMKATADVGLRAKNLAKELATPMKPAAQKGEAYLKGCG 784
Wo.s HVIGQVSSGPDLTCVLSENHEANAKEWVEDFIKNPAKYBEDVYKTMINYNLRPMQHMDQELRDIIBYLKWIDENAGLF-----864

```

Figura 1.3. Alinhamento da sequência primária de N₂ORs de estruturas conhecidas. A verde e azul são destacados os resíduos do CuA e CuZ, respectivamente. O motivo de ligação do hemo tipo c está a vermelho. A roxo os resíduos envolvidos na transferência eletrônica. O *tat-motif* a amarelo. Ma.h *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, Ps.s *Pseudomonas stutzeri*, Ac.c *Achromobacter cycloclastes*, Pa.d *Paracoccus denitrificans*, Wo.s *Wolinella succinogenes*. *, ;, . identidade, alta conservação e preservação de aminoácidos, respectivamente. Comparação de sequências com software de alinhamento múltiplo ClustalW2^{[13],[14]}. Adaptado de^[29].

No alinhamento de sequências está representada, ainda, a sequência de um outro tipo de N₂OR, o qual possui um domínio C-terminal extra, contendo cerca de 200 resíduos. Em *Wolinella (Wo.) succinogenes*, pertencente ao grupo das ϵ -Proteobactérias, este domínio adicional contém um motivo de ligação do hemo tipo *c*, -CXXCH- que forma duas ligações tioéster com o hemo (no qual, X é correspondente a qualquer resíduo), destacado a vermelho na Figura 1.3.^{[40],[43]}. Da análise da sequência primária da N₂OR deste último organismo, observa-se um péptido sinal *Sec* (sistema secretório geral conservado). Este outro tipo de N₂OR, com o domínio adicional, requer um sistema de maturação do citocromo *c* periplasmático para a sua biossíntese^{[29],[43],[46]}. Considerando todas as sequências primárias de N₂ORs utilizadas para o alinhamento apresentado na Figura 1.3., a N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* é a que apresenta maior homologia com a sequência de *Wo. succinogenes* (cerca de 31% de identidade). Sendo, ainda, de salientar, que todos os resíduos que coordenam os centros CuA e CuZ são conservados, com a única exceção do triptofano situado entre as duas cisteínas que coordenam o centro CuA, que é inexistente na sequência do organismo pertencente às ϵ -Proteobactérias, *Wo. succinogenes*^{[26],[29]}.

1.3.3. Genes e regulação da redutase do óxido nitroso

Os genes que codificam para a N₂OR e para outras proteínas essenciais para a correta inserção do centro CuZ na enzima, estão organizados num operão, cuja organização génica é conservada na maioria dos organismos que possuem o gene *nosZ*. Assim, embora a maioria dos estudos sobre a biogénese do centro CuZ tenham sido realizados em *Ps. stutzeri*, a organização do *cluster* do gene *nosZ*, nas diferentes subdivisões das proteobactérias e em algumas bactérias gram-positivas, partilham vários aspetos (Figura 1.4.). Estes genes estão, normalmente, localizados dentro de um único *locus*, sendo a organização *nosRZDFYL* frequente para a maioria dos organismos. Neste *locus*, *nosR* codifica para uma proteína que está ligada à membrana e que é essencial para a expressão de *nosZ*, os genes *nosDFY* são responsáveis pela incorporação de cobre na N₂OR e o gene *nosL*, que é proposto codificar para uma proteína de cobre, é normalmente encontrado como parte do grupo de genes *nosDFY*, tendo um papel fundamental no processo de maturação da enzima. O produto do gene *nosF* é uma proteína de ligação ao ATP/GTP (adenosina trifosfato/guanosina trifosfato), que possui uma sequência semelhante à da família de proteínas de transportadores ABC (do inglês, *ATP-binding cassette transporters*), pelo que, se supõe que a biossíntese da N₂OR é dependente de energia^{[45],[46]}.

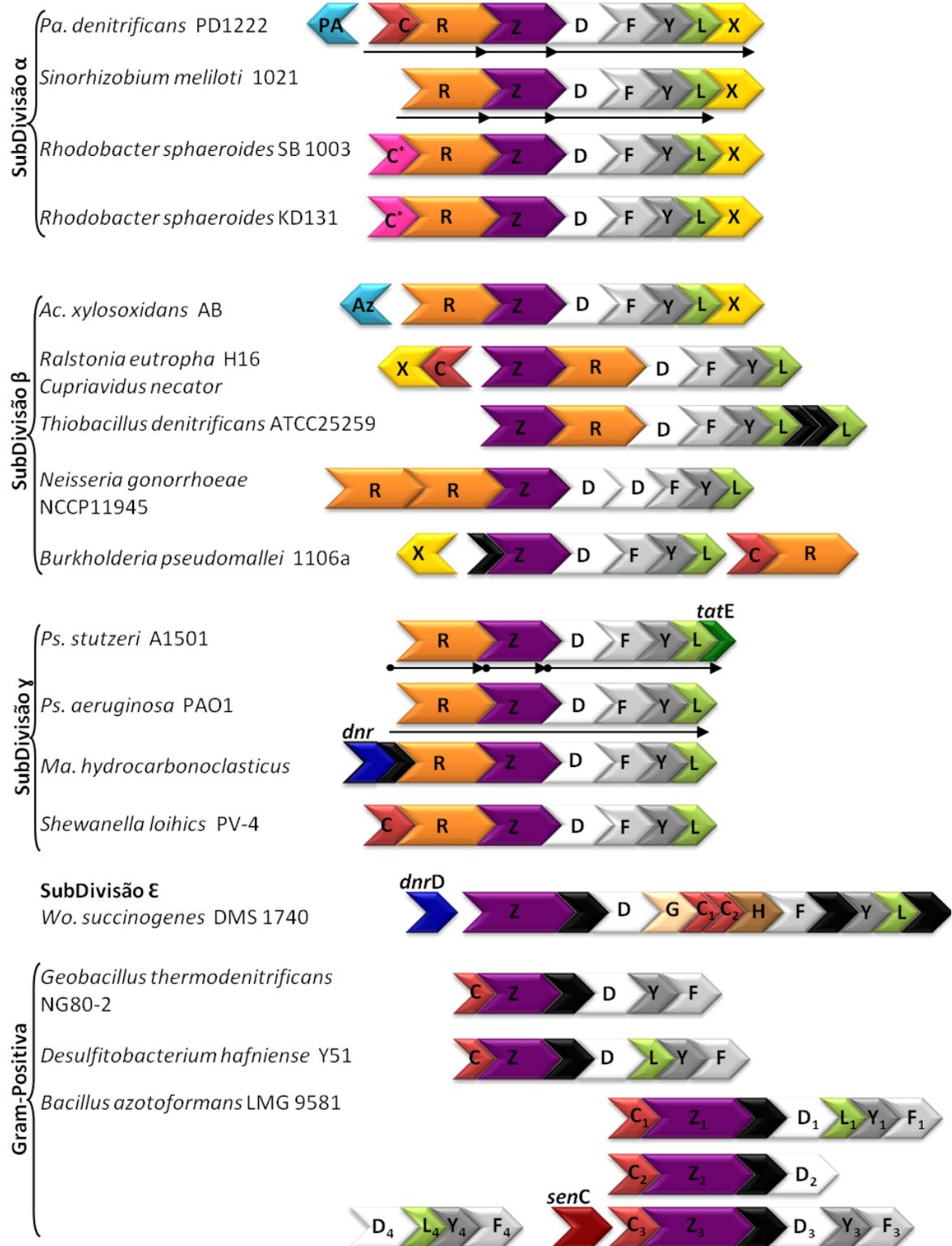


Figura 1.4. Organização do *cluster* dos genes *nos* de diferentes divisões de Proteobactérias e três bactérias Gram-positivas identificadas como desnitrificantes completas. As unidades transcricionais estudadas e as regiões promotoras estão identificadas com setas e pontos, respetivamente. PA – Pseudoazurina, Az – Azurina, C – Proteína que contém motivo de ligação do hemo tipo *c* – CXXCH, ou proteína semelhante à tiorredoxina, C* – Proteína de tamanho semelhante à identificada por C mas sem motivo de ligação do hemo, identificada como uma tiorredoxina putativa, *dnr* – Regulador da respiração dissimilativa de nitrato, *tat* – motivo *twin-arginine*, *senC* – essencial para inserção de cobre. Os genes coloridos a preto dizem respeito a proteínas hipotéticas. Adaptado de^{[29],[47]}.

Na Figura 1.4. pode, ainda, observar-se que em algumas bactérias (com maior incidência no grupo das α -Proteobactérias), os genes *nosRZDFYL* são seguidos ou precedidos pelo gene *nosX*. Para além deste gene, a localização do gene *nosR* é, também variável, uma vez que pode ser encontrado após o gene *nosZ* ou no fim do *cluster*^[29]. Outra característica é a presença, na periferia deste *locus*, de pequenas proteínas de transporte de eletrões, quer citocromos do tipo c ou proteínas de cobre do tipo I, tendo possivelmente como função doar eletrões para a N₂OR.

Sendo que, o número de unidades de transcrição, transcritas a partir do *cluster* de genes da N₂OR diferem de organismo para organismo^[29]. De facto, no caso da *Pseudomonas aeruginosa*, os genes *nos* estão organizados num único operão hexacistrónico, *nosRZDFYL*^[48], enquanto que noutros sistemas estudados, existem três unidades transcricionais. Realmente, em *Ps. stutzeri*, foram identificados três transcritos – *nosR*, *nosZ* e *nosDFYLtatE*. *TatE* é um componente da maquinaria de translocação *Tat*, que assegura o processamento completo bem como a exportação da N₂OR para o periplasma^{[45],[46],[49]}. Uma organização génica semelhante à de *Ps. stutzeri* foi proposta para *Sinorhizobium meliloti* (anteriormente denominado por *Rhizobium meliloti*)^[50], compreendendo os genes *nosCR*, *nosZ* e *nosDFYLX* tal como no caso de *Pa. denitrificans*, como mostra a Figura 1.4^{[29],[50]}.

A regulação dos genes *nos* não foi caracterizada em todos os organismos, no entanto, foi demonstrado, em *Ps. aeruginosa*, que o N₂O não induz a expressão dos genes *nos*, contrariamente ao que se observa para o NO, que regula fortemente o promotor de *nosRZDY*. Neste organismo, o fator de transcrição Dnr (regulador da respiração dissimilativa de nitrato), um regulador relacionado com o FNR (regulador da redutase do fumarato e nitrato), que controla a expressão dos genes da desnitrificação, é necessário para a transcrição dos genes *nos*, com dependência de NO (pelo que, conduz à síntese de N₂OR antes da acumulação de N₂O). De facto, a região do promotor a montante dos genes *nosR* tem uma sequência semelhante ao motivo de ligação consenso FNR (normalmente denominado FNR-*box*, TTGAT-N₄-ATCAA), o que sugere que os genes *nos* estão sob o controlo de um regulador do tipo FNR, neste caso do fator Dnr^{[51],[52]}. O mecanismo de regulação do Dnr faz-se através da ligação específica de NO ao hemo, no domínio efetor do Dnr, que induz uma alteração conformacional na proteína, aumentando a sua afinidade para a região promotora e ativando a transcrição dos genes *nos*^[29]. Em *Ps. stutzeri* e *Pa. denitrificans* foram identificados genes homólogos do Dnr, DnrD e Nnr (regulador da redutase do nitrito e do óxido nitroso), respetivamente, através dos quais se conseguiu comprovar que Dnr deveria ser uma proteína hémica^[53]. Em *Pa. denitrificans* a transcrição do gene *nosZ* para além de ser regulada pelo Nnr, um sensor de NO, também é regulada por um sensor de oxigénio, FnrP^[54]. Já no caso de *Ps. stutzeri*, a transcrição de *nosZ* é dependente de

nosR, que também está envolvido na transcrição do operão *nosDFYltatE*^{[54],[57],[58]}. O gene *nosR* é conservado em todos os organismos, com exceção das bactérias pertencentes ao grupo das ϵ -Proteobactérias e bactérias Gram-positivas (Figura 1.4.).

O gene *nosR* de *Ps. stutzeri* é uma flavoproteína contendo vários centros ferro-enxofre posicionados em lados opostos da membrana citoplasmática. O cofator flavina está ligado covalentemente a um resíduo conservado de treonina, existente no domínio periplasmático, e o domínio citoplasmático é uma poli-ferredoxina, ao qual é proposto ligarem-se dois centros [4Fe-4S]^{[29],[57]}. O gene *nosR* é essencial para a plena atividade de N₂OR *in vivo* e para a inserção correta dos centros CuA e CuZ. De facto, é possível que a proteína codificada por *nosR* esteja envolvida em diferentes aspetos da biossíntese e atividade da N₂OR, uma vez que o domínio flavínico é essencial para a redução de N₂O na célula^[55]. O gene *nosR* apresenta um motivo CX₃CP conservado, localizado no C-terminal da proteína. Este gene pode estar envolvido na permanência da N₂OR no estado redox ativo, isto porque, aquando da realização de um estudo da enzima com o *nosR* modificado no domínio membranar CX₃CP ou sem o C-terminal onde se encontra este motivo, se observou que a N₂OR isolada destas células apresenta o centro CuZ alterado, ou seja, no estado CuZ*, forma redox e cataliticamente inativa (ver secção 1.3.4., 1.3.5. e 1.3.6. do presente capítulo)^{[29],[57]}.

A co-expressão do outro grupo de genes conservados, *nosDFY*, é essencial para a correta formação do centro CuZ, e assim a enzima N₂OR é obtida com as características espectrais correspondentes a ambos os centros, CuA e CuZ. Sendo que, a sua função poderá estar mais relacionada com o fornecimento de enxofre do que com a inserção de cobre, visto que, o centro CuA pode ser reconstituído, *in vitro*, na apoproteína a partir de cobre exógeno, ao contrário do centro CuZ em que isto não é possível. Este facto pode ser explicado pela ausência de uma fonte de enxofre adequada. O enxofre poderá ser, portanto, fornecido através de um transportador ABC formado pelos genes *nosDFY*^[57]. Portanto, uma vez que a inserção de cobre não parece ser dependente destes genes, foi proposto que este sistema está envolvido no transporte de enxofre e sua inserção no centro CuZ da N₂OR^[29]. Embora não seja essencial para o centro CuZ, *nosL* é na maioria dos organismos co-transcrito com *nosDFY*, destacando-se o seu envolvimento na maturação de *nosZ*. *NosL* é uma lipoproteína de 20 kDa localizada na membrana exterior, que se liga especificamente a um Cu⁺ tendo propriedades e funções idênticas a um chaperone de cobre^{[57]-[59]}.

A análise da Figura 1.4., mostra que há outro gene que se encontra conservado no operão da *nosZ* em α -Proteobactérias e algumas β -Proteobactérias, o *nosX*. Este gene codifica para uma flavoproteína periplasmática de 34 kDa, que está envolvida de forma semelhante ao

nosR, não na maturação do centro CuZ em si, mas, provavelmente, na permanência de N₂OR num estado funcional (cataliticamente ativo). A bactéria *Pa. denitrificans*, além de possuir o gene *nosX* no operão *nosZ*, tem também um homólogo *nirX* (como parte do *cluster nirSIX*), assim, a fim de estudar o efeito deste gene nas propriedades espectroscópicas da N₂OR, foi utilizado um duplo mutante *nosXnirX*. Nesta estirpe mutante, verificou-se que a enzima N₂OR é isolada com o centro CuZ sob a forma de CuZ*, redox inerte e que as células não têm atividade de redução de N₂O, apesar de a atividade específica *in vitro* da enzima isolada ser idêntica à da estirpe selvagem, sendo que esta última possui o centro catalítico na forma CuZ (ver secção 1.3.4. e 1.3.6.)^{[60],[61]}. O gene *nosX* codifica para uma proteína semelhante à proteína ApbE periplasmática, que afeta a síntese de centros Fe-S e o transporte pelo sistema *Tat*, o que sugere que *nosX* é exportado ligado a um cofator redox, FAD (dinucleótido de flavina-adenina), podendo ser essencial para a manutenção do ciclo catalítico da N₂OR, possivelmente por meio de doação de elétrons para a enzima, mantendo o centro CuZ num estado cataliticamente ativo^{[61],[62]}.

Em ε-Proteobactérias, mais precisamente em *Wo. succinogenes*, o *locus* que codifica para N₂OR para além de conter os genes convencionais acima identificados, possui alguns genes adicionais, dois homólogos à desidrogenase do quinol NapHG, *nosH* e *nosG*, e outros dois que codificam para citocromos do tipo *c* (*nosC₁* e *nosC₂*), como se pode observar na Figura 1.4. Os genes *nos* de *Wo. succinogenes* codificam para um sistema de transporte de elétrons completo que estão envolvidos na redução de N₂O por menaquinona, um caminho de transferência eletrónica que pode ser, também, relevante para outras bactérias. A sequência primária de *nosH* e *nosG* revela a presença de motivos de cisteína conservados que ligam centros [4Fe-4S]. Portanto, estes genes podem ter uma função semelhante ao gene *nosR*, utilizando a menaquinona para transferir elétrons para a N₂OR através dos dois citocromos do tipo *c* que são codificados neste *cluster* de genes^{[29],[63]}.

A bactéria gram-positiva *Bacillus azotoformans*, possui três *clusters* que incluem o gene *nosZ*, e cada construção génica difere de *cluster* para *cluster* (Figura 1.4.). Algumas dessas diferenças podem estar relacionadas com conformações distintas da proteína e/ou transporte desigual. Embora se observem muitos genes conservados idênticos aos das construções das outras divisões de Proteobactérias, é observável, pela Figura 1.4., que a montante do gene *nosC₃*, se encontra um *senC* que foi implicado na inserção de cobre (CuA), estando envolvido na ligação deste elemento. Nos micro-organismos Gram-positivos, a redutase do óxido nitroso está associada com a membrana celular. Na análise dos genes funcionais da desnitrificação, foram detetadas novas enzimas que se esperam funcionais (foram previstas três N₂ORs diferentes)^[47].

1.3.4. Redutase do óxido nitroso e sua estrutura

A estrutura da N_2OR foi determinada pela primeira vez em 2000, com uma resolução de 2.4 Å por difração anómala a múltiplos comprimentos de onda (MAD). A enzima usada na cristalização foi a isolada de *Ma. hydrocarbonoclasticus*^[64]. Este estudo revelou que a enzima era um dímero, em que cada monómero era composto por dois domínios distintos, o domínio N-terminal constituído por folhas β , e o domínio C-terminal com estrutura semelhante à cupredoxina. A enzima apresenta dois centros de cobre diferentes, um centro do tipo CuA composto por dois íons cobre ligados a duas cisteínas e histidinas, uma metionina e um grupo carbonilo derivado de um triptofano; e o centro CuZ composto por quatro átomos de cobre formando um tetraedro distorcido, ligados a sete resíduos de histidina e a um átomo de transição, identificado como um átomo de oxigénio no centro dos quatro átomos de cobre^{[64],[65]}. A natureza deste átomo em ponte foi desde cedo posta em causa, devido a estudos anteriores, nomeadamente de dicroísmo circular magnético (DCM), ressonância de Raman (RR) bem como de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrónica (RPE) que sugeriam, a presença de um átomo de enxofre^{[34],[66],[67]}, o que levou a que a densidade eletrónica do centro ativo, CuZ, fosse reanalisada tendo-se efetuado, também, a determinação de enxofre inorgânico nestas amostras^[65].

De facto, em 2003 foi determinada a estrutura da redutase do óxido nitroso de *Paracoccus (Pa.) denitrificans* a maior resolução, 1.6 Å, que a conseguida, anteriormente, para a N_2OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, através da qual se confirmou e identificou o átomo em ponte como um enxofre ao invés do considerado, inicialmente, átomo de oxigénio (Figura 1.5. A)^{[65],[68]}. E, mais recentemente, a estrutura da N_2OR foi também resolvida para a enzima isolada de *Achromobacter (Ac.) cycloclastes* (Figura 1.5. B.I), em 2006, a 1.86 Å. Esta última estrutura, veio confirmar as características estruturais já identificadas. Contudo, é de salientar que para além da estrutura da forma nativa foi também determinada uma estrutura de uma forma inibida com iodeto, tendo-se verificado que o iodeto se encontra ligado ao centro de cobre CuZ entre Cu_{IV} e Cu_I (Figura 1.5. B.II)^[69].

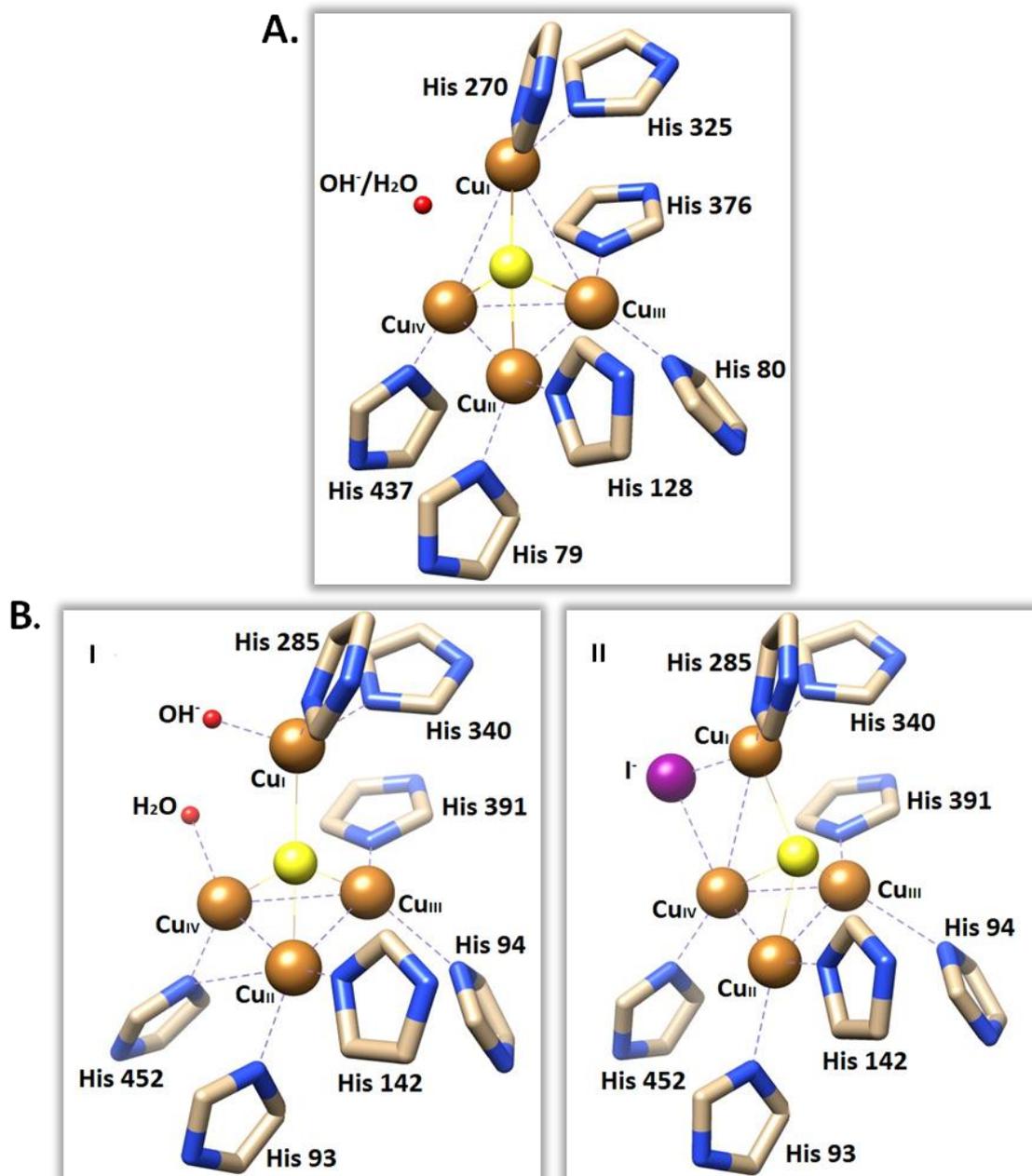


Figura 1.5. Estrutura do centro catalítico, CuZ, da N_2OR de *Pa. denitrificans* (A) e de *Ac. cycloclastes* (B). B.I – Forma nativa com presença de uma molécula de água e um íon hidróxido ente Cu_{IV} e Cu_I , B.II – Forma inibida com íon iodeto entre Cu_{IV} e Cu_I . Os centros têm os seus ligandos coloridos de acordo com o elemento. O íon enxofre está representado com uma esfera amarela e o íon iodeto a roxo. A figura foi gerada com o programa Chimera^[70] utilizando as coordenadas do PDB 1FWX (A), 2IWF (B.I) e 2IWK (B.II).

Todavia, todas as estruturas resolvidas são semelhantes. A N_2OR é um homodímero (Figura 1.6. A), em que cada monómero tem 65 kDa^{[26],[66],[67],[71]}. Estudos espectroscópicos e a determinação da sua estrutura revelaram a presença de dois centros de cobre distintos localizados em dois domínios da enzima. O centro Cu_A , semelhante ao já conhecido para a oxidase do citocromo *c* (COX), é um centro binuclear de cobre em que cada íon de cobre está coordenado por duas cisteínas e dois resíduos de histidina, enquanto que o terceiro ligando é

um oxigênio do grupo carbonilo de uma metionina ou de um resíduo de glutamato (Figura 1.6. B.I). O centro CuA está localizado no domínio C-terminal, e tem a função de aceitar elétrons de proteínas de transferência eletrônica e transferi-los para o centro catalítico, CuZ, que se encontra no domínio N-terminal da enzima. O outro centro de cobre identificado foi o CuZ, que é um centro tetranuclear de cobre e é o sítio catalítico da redutase do óxido nitroso (Figura 1.6. B.II)^{[20],[67],[71],[73]}.

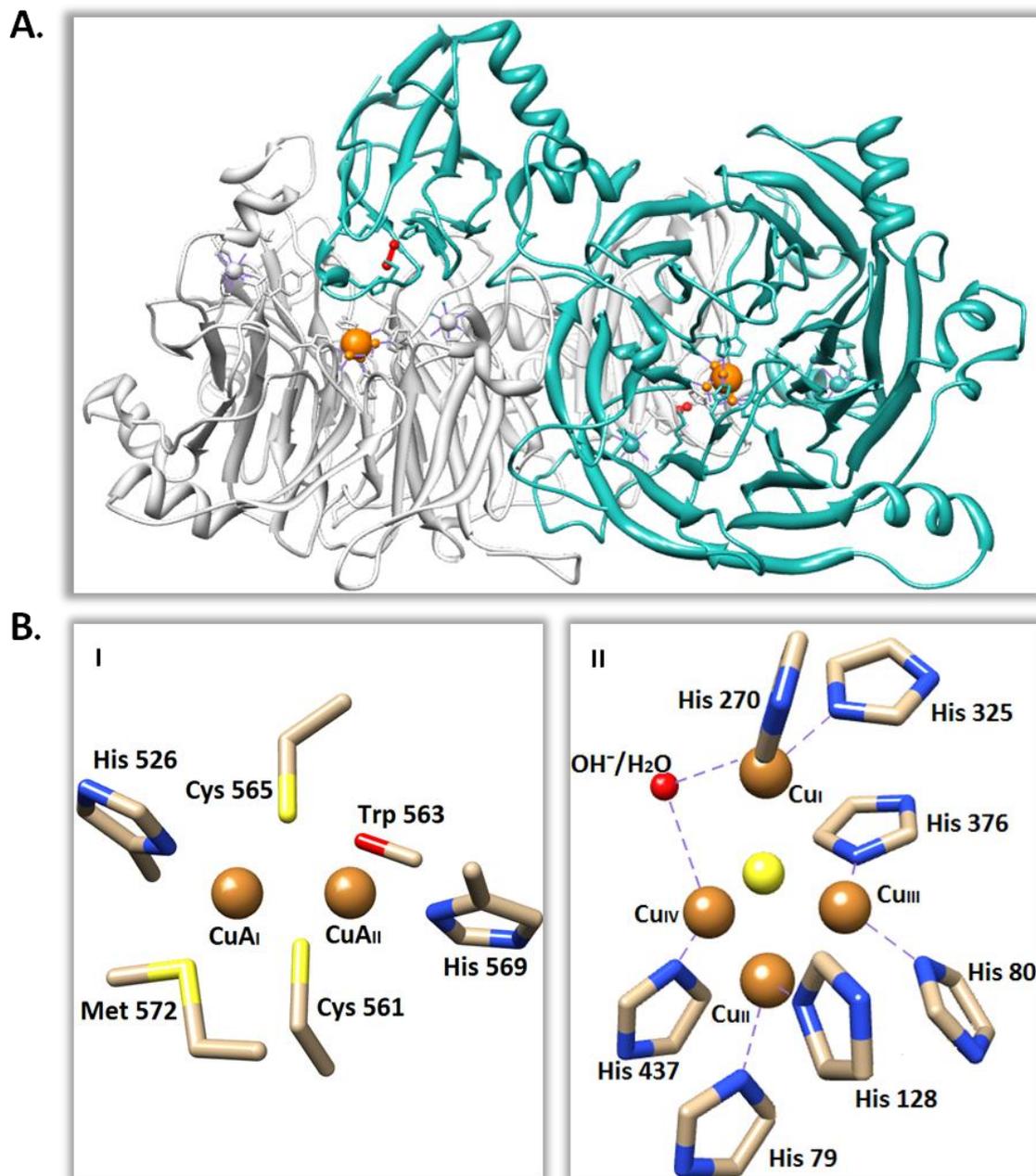


Figura 1.6. Estrutura da N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e respectivos centros. A – Representação do dímero funcional redutase do óxido nitroso. O dímero está colorido de acordo com as subunidades. Um dos monômeros está representado a azul e o outro a cinza. Ambos os centros, CuA e CuZ, estão representados a vermelho e laranja, respetivamente. B.I – Centro CuA e B.II – Centro CuZ no estado [1Cu²⁺-3Cu⁺], na forma CuZ*. Os centros têm os seus ligandos coloridos de acordo com o elemento. O íon enxofre está representado com uma esfera amarela. A figura foi gerada com o programa Chimera^[70] e utilizando as coordenadas do PDB 1QNI.

A sua estrutura revelou, ainda, que a sua conformação homodimérica é funcional visto que a transferência de eletrões entre o centro CuA e o centro CuZ terá que ser efetuada entre os centros localizados em subunidades diferentes. Isto porque, a distância entre o centro CuA e o centro CuZ do mesmo monómero é $\sim 40 \text{ \AA}$, o que não é apropriado para uma eficiente transferência eletrónica^[72]. Enquanto que a distância entre o centro CuA e o centro CuZ de subunidades diferentes é de $\sim 10 \text{ \AA}$, distância a que é considerada uma eficiente transferência eletrónica. Por este motivo, diz-se que a N₂OR é um dímero funcional^{[66],[70],[71]}.

Nas três estruturas descritas foi observada a presença de um ligando em ponte, no centro CuZ, entre o Cu_{IV} e o Cu_I (cuja natureza ainda está sob discussão). Na estrutura da N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e de *Pa. denitrificans* apenas um átomo de oxigénio de um grupo hidróxilo ou de uma molécula de água foi observado a fazer ponte entre o Cu_{IV} e o Cu_I, enquanto que em *Ac. cycloclastes* foram "modelados" dois átomos de oxigénio, atribuídos a uma molécula de água e a um grupo hidróxilo (ver Figura 1.6. B.II). Para além disso, e no caso desta última bactéria, *Ac. cycloclastes*, foi também nesta posição que se observou a ligação do inibidor iodeto anteriormente referido^{[65],[68],[69]}.

É, ainda de salientar que estas primeiras estruturas da N₂OR foram obtidas, todas, com o centro CuZ como CuZ*, ver Figura 1.6. B.II (também designado por *resting* CuZ), forma esta caracterizada por ser redox e cataliticamente inativa, e com o centro CuA reduzido ou oxidado^{[73],[75]}. No caso da N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus*^[64] semelhante à de *Pa. denitrificans* o centro CuA encontrava-se reduzido^[68], enquanto que na N₂OR de *Ac. cycloclastes*, o centro CuA encontrava-se na forma oxidada^[69]. De facto, a partir da primeira purificação da enzima N₂OR de *Pseudomonas stutzeri*, na altura denominada por *Pseudomonas perfectomarina*, tornou-se claro, que a enzima podia ser isolada em distintas formas, com o centro CuZ em diferentes estados redox dependendo das condições de purificação^{[74],[75]}.

Recentemente, foi resolvida a estrutura da forma *purple* da N₂OR de *Ps. stutzeri* (com 1.7 Å e 2.1 Å de resolução), na qual o centro CuZ foi isolado na forma totalmente oxidada [2Cu²⁺-2Cu⁺] que, contrariamente ao CuZ* isolado nas estruturas precedentes, é redox ativo, e em que o CuA também está oxidado. Contudo, não é cataliticamente competente, uma vez que a atividade da enzima com o centro CuZ neste estado redox, assim como no estado CuZ* é muito baixa, comparativamente à atividade observada para a enzima quando o centro CuZ se encontra no estado completamente reduzido [4Cu⁺]^{[75],[76],[77]}.

A esfera de coordenação da N₂OR de *Ps. stutzeri* obtida na forma completamente oxidada (centro CuA oxidado e centro CuZ na forma [2Cu²⁺-2Cu⁺]), ou seja, na forma *purple*, é idêntica à das outras enzimas, porém, esta estrutura apresenta um centro CuA binuclear de

cobre coordenado por duas cisteínas, uma metionina, um triptofano e apenas uma histidina (ao invés das duas histidinas observadas nas outras estruturas obtidas), sendo que a histidina 583 está presente na estrutura mas não coordena o CuA_I . No entanto, pode observar-se a ligação ao CuA_I , quando o centro CuZ se encontra parcialmente degradado aquando da exposição a oxigénio, ou quando o substrato, N_2O , se encontra ligado. Esta estrutura apresenta, ainda, um átomo de enxofre em ponte entre o Cu_{IV} e Cu_I do centro CuZ , Figura 1.7. A e B. Tem sido proposto que as diferentes propriedades redox do centro CuZ e CuZ^* se devem a esta diferença de coordenação^{[29],[77],[78]}.

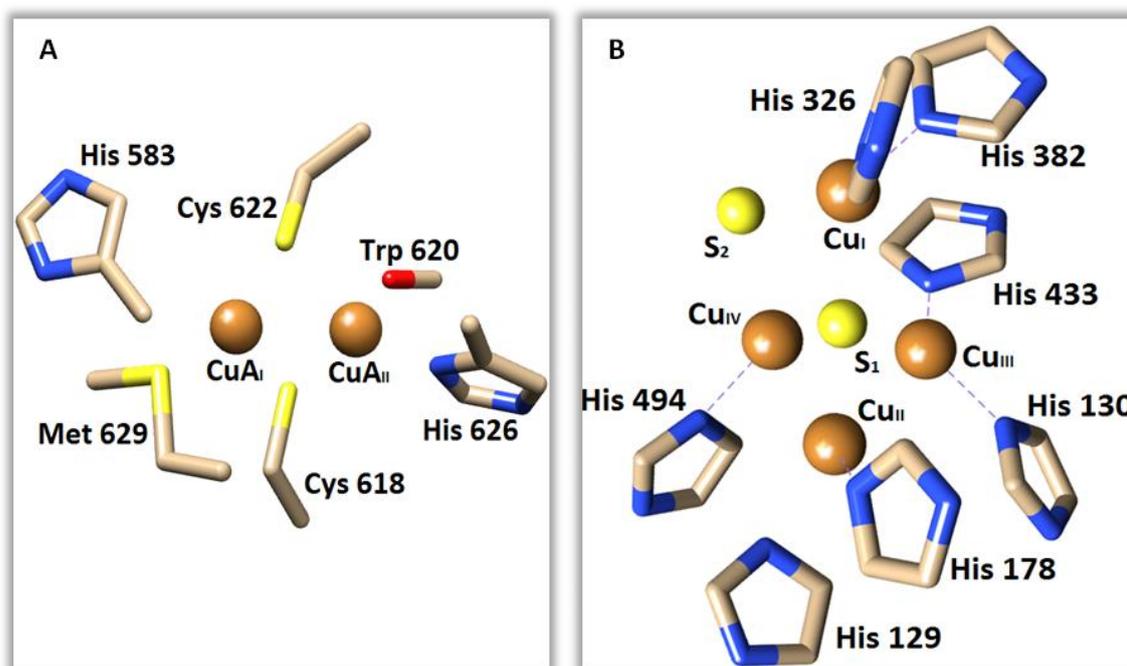


Figura 1.7. Representação dos centros CuA (A) e CuZ (B) da N_2OR de *Ps. stutzeri*. Os ligandos estão coloridos de acordo com o elemento. O centro CuZ está no estado $[\text{2Cu}^{2+}\text{-2Cu}^+]$. Os iões enxofre estão representados com uma esfera amarela. A figura foi gerada com o programa Chimera^[70] e utilizando as coordenadas do PDB 3SBQ.

1.3.5. Caracterização espectroscópica da redutase do óxido nítrico

A N_2OR foi isolada pela primeira vez em 1972 a partir de *Alcaligenes faecalis* (Matsubara *et al.* (1972)^[79]), tendo sido classificada como um tipo de proteína de cobre, no entanto, a sua função ou atividade enzimática só foi estabelecida mais tarde^[29]. Posteriormente, uma proteína com um espectro de visível semelhante foi isolada de *Ps. stutzeri* (denominada na altura como *Ps. perfectomarina*) e foi realizado o primeiro ensaio da redução de N_2O a N_2 utilizando metilviologénio como doador de eletrões^[79]. Desde então, a N_2OR tem sido isolada e caracterizada de diferentes bactérias desnitrificantes. Devido aos seus complexos e invulgares centros de cobre e,

dependendo do procedimento usado no seu isolamento, foram identificadas diferentes formas redox da enzima.

As diferentes formas da N₂OR foram denominadas de acordo com a cor da solução de proteína isolada e refletem o estado redox dos centros CuA e CuZ (Tabela 1.I.). Embora alguns autores se refiram às diferentes formas da enzima segundo a cor que apresentam aquando do seu isolamento, esta classificação é subjetiva. Nesta dissertação vamos referir-nos às formas da N₂OR pelo estado redox de cada centro de cobre.

Tabela 1.I. Diferentes formas redox da enzima redutase do óxido nitroso (N₂OR) e máximos de absorvância característicos de cada centro. Adaptado de^{[29],[75]}.

| | CENTRO CuA | CENTRO CuZ | CENTRO CuZ* |
|--|---|--|--|
| MÁXIMOS DE ABSORVÂNCIA (nm) | 480, 540, 800 | 550, 635 | 640 |
| DIFERENTES FORMAS REDOX DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO | | | |
| COMPLETAMENTE OXIDADA/ <i>AS-ISOLATED</i> (FORMA <i>PURPLE</i>) | [Cu ^{1.5+} -Cu ^{1.5+}] | [2Cu ²⁺ -2Cu ⁺] | |
| REDUZIDA COM ASCORBATO | [Cu ⁺ -Cu ⁺] | [2Cu ²⁺ -2Cu ⁺] | |
| REDUZIDA COM DITIONITO | [Cu ⁺ -Cu ⁺] | [1Cu ²⁺ -3Cu ⁺] | |
| COMPLETAMENTE OXIDADA/ <i>AS-ISOLATED</i> (FORMA <i>PURPLE/PINK</i>) ^I | [Cu ^{1.5+} -Cu ^{1.5+}] | | [1Cu ²⁺ -3Cu ⁺] |
| REDUZIDA COM DITIONITO/ASCORBATO (FORMA <i>BLUE</i>) ^{II} | [Cu ⁺ -Cu ⁺] | | [1Cu ²⁺ -3Cu ⁺] |
| COMPLETAMENTE REDUZIDA/FORMA ATIVADA ^{III} | [Cu ⁺ -Cu ⁺] | | [4Cu ⁺] |

^I Alguns autores denominam este estado como forma *purple*.

^{II} Na forma *blue*, o centro CuZ é encontrado, sobretudo, no estado CuZ*, também denominado de *resting* CuZ (forma redox e cataliticamente inativa)^[71]. As duas formas reduzidas com ditionito são diferentes, embora possuam o mesmo estado redox.

^{III} Até ao momento, mostrou-se que esta forma apenas aparece a partir de CuZ*.

Com o intuito de estudar as propriedades eletrónicas dos centros da N₂OR, foram adquiridos uma série de dados espectroscópicos utilizando diferentes técnicas^[71]. A sobreposição de bandas espectroscópicas, na região do UltraVioleta-visível (UV-visível) de ambos os centros de cobre da N₂OR, CuA e CuZ, dificulta a análise individual das características dos mesmos. Por esse motivo, e devido ao facto do centro CuA (centro binuclear de cobre com valência mista) ser idêntico ao encontrado na oxidase do citocromo *c* (COX), as características eletrónicas e espectroscópicas deste centro têm vindo a ser mais extensivamente estudadas não só na N₂OR como na COX^{[29],[71],[80]}.

As primeiras purificações de N₂OR foram realizadas na presença de oxigénio, e a análise dos espectros de UV-visível das enzimas isoladas, indicam a presença do centro CuA na forma completamente oxidada [Cu^{1.5+}-Cu^{1.5+}] e o centro CuZ no estado redox inativo [1Cu²⁺-3Cu⁺], denominado de CuZ*. O centro CuA contribui para o espectro UV-visível, com bandas de absorção

máxima aos comprimentos de onda de 480 nm, 540 nm e 800 nm, enquanto que o centro CuZ* tem uma única banda de absorção característica a 640 nm (Figura 1.8. A.ii). Esta forma da enzima, com o centro CuA no estado completamente oxidado e o centro CuZ como CuZ*, redox inerte, foi nomeado, por diferentes autores, como forma *purple/pink* ou *pink* (ver Tabela 1.1.). Em alguns casos, a forma *blue* também foi isolada (Tabela 1.1.), sendo que nesta forma o centro CuZ está no estado CuZ* e o centro CuA está reduzido, pelo que o seu espectro de UV-visível é caracterizado por uma única e intensa banda de absorção ao comprimento de onda de 640 nm (Figura 1.8. A.iii).

Aquando do isolamento da enzima na ausência de oxigénio observou-se um outro estado redox da enzima, a forma *purple*, Tabela 1.1., em que o centro CuZ está no estado redox $[2\text{Cu}^{2+}-2\text{Cu}^+]$, que é redox ativo (mas não cataliticamente competente *in vitro*, ver secção 1.3.6.)^{[75],[83]-[86]}. O espectro na região do visível da N₂OR neste estado redox é a soma das contribuições dos dois centros de cobre, centro CuA, com bandas de absorção aos comprimentos de onda de 480 nm, 540 nm e 800 nm e o centro CuZ, com bandas de absorção a 550 nm e um ombro a 635 nm (Figura 1.8. A.i).

Como acima referido, algumas bandas espectroscópicas de ambos os centros da enzima sobrepõem-se, sendo que, para se conseguir observar apenas as características do centro CuZ sem contribuição do centro CuA tem de se reduzir este último centro (CuA) com uma quantidade equimolar de ascorbato de sódio (Tabela 1.1., 2ª linha e Figura 1.8. A.i'), sendo que o centro CuZ não é afetado. No entanto, a redução da enzima com ditionito de sódio, ocorre em duas etapas distintas. Uma primeira, mais rápida em que a absorvância ao comprimento de onda de 540 nm diminui e a banda a 800 nm desaparece, devido à redução do centro CuA (igual à forma obtida pela redução com ascorbato de sódio). A segunda e última etapa é caracterizada por ser mais lenta e identificada pela diminuição acentuada da banda de absorção ao comprimento de onda de 550 nm e, por sua vez, um aumento da banda de absorção a 640 nm, que corresponde à redução do CuZ do estado $[2\text{Cu}^{2+}-2\text{Cu}^+]$ para o estado $[1\text{Cu}^{2+}-3\text{Cu}^+]$, (Tabela 1.1., 3ª linha)^{[29],[75]}.

O espectro desta forma da enzima (forma *purple*, com centro CuA oxidado e centro CuZ na forma $[2\text{Cu}^{2+}-2\text{Cu}^+]$ – Tabela 1.1., 1ª linha), obtido por espectroscopia de RPE, é caracterizado por um sinal axial com $g_{\parallel} = 2,18$ e $g_{\perp} \sim 2,03$ e pela presença de um desdobramento de 7 linhas hiperfinas bem definidas com contante de acoplamento hiperfina $A_{\parallel} = 38$ G da contribuição do centro CuA. Isto porque, como o centro CuZ se encontra no estado $[2\text{Cu}^{2+}-2\text{Cu}^+]$, foi demonstrado, por dicroísmo circular magnético, que era diamagnético ($S = 0$) e portanto, o sinal de RPE da contribuição do centro CuZ neste estado redox é silencioso, (Figura 1.8.

B.i)^{[29],[68],[69],[76],[77]}. Assim, neste estado, o centro CuA encontra-se num estado de valência mista $[\text{Cu}^{1.5+}-\text{Cu}^{1.5+}]$, apresentando um eletrão não emparelhado, com spin de $S = 1/2$, e spin nuclear de $I = 3/2$ ^{[73],[85]}.

Como já foi mencionado, quando a enzima é isolada na presença de oxigénio o estado redox do centro CuA pode variar, tendo-se já obtido a N_2OR com este centro oxidado e reduzido, na forma *purple/pink* e *blue*, respetivamente (ver Tabela 1.1.). Nestas condições, quando o centro CuA se encontra reduzido e o centro CuZ na forma CuZ^* , o espectro de RPE é caracterizado por um sinal alargado em que as linhas do desdobramento hiperfino estão pouco resolvidas correspondente ao centro CuZ no estado redox inativo, CuZ^* $[\text{1Cu}^{2+}-3\text{Cu}^+]$ (caracterizado por quatro linhas hiperfinas), com valores de g de 2,16 e 2,04^{[67],[75]} (Figura 1.8. B.iii), que mascara as sete linhas hiperfinas características do centro CuA no estado oxidado, Figura 1.8. B.ii^{[26],[29],[69],[75]}.

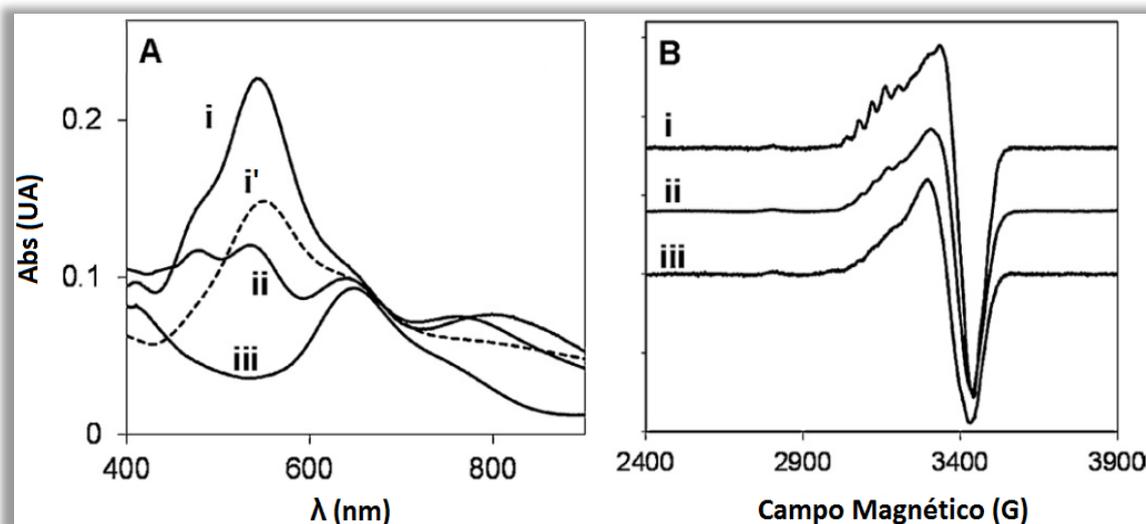


Figura 1.8. A – Espectro de UV-Visível e B – Espectro de RPE das diferentes formas redox da N_2OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus*. i – N_2OR com o centro CuA completamente oxidado e o centro CuZ na forma redox ativa $[\text{2Cu}^{2+}-\text{2Cu}^+]$, i' – N_2OR igual à forma i mas reduzida com ascorbato de sódio, com o centro CuA reduzido e o centro CuZ, igualmente, no estado $[\text{2Cu}^{2+}-\text{2Cu}^+]$, ii – N_2OR com o centro CuA oxidado e o centro CuZ na forma de CuZ^* , redox inativo $[\text{1Cu}^{2+}-\text{3Cu}^+]$ e iii – N_2OR com o centro CuA reduzido e o centro CuZ na forma de CuZ^* , $[\text{1Cu}^{2+}-\text{3Cu}^+]$. O espectro de RPE foi adquirido a 30 K e com uma frequência de micro-ondas de 9,66 GHz. Adaptado de^[29].

É importante salientar que até à data não se encontra reportado na literatura o isolamento de N_2OR em que o centro CuZ esteja num único estado redox^{[26],[68],[69],[75]}. Ou seja, normalmente o centro CuA encontra-se reduzido ou oxidado, enquanto que o centro CuZ é uma mistura de ambos os estados, CuZ e CuZ^* . Sendo que, geralmente, é mais rico em CuZ quando a enzima é isolada na ausência de oxigénio, ou a própria enzima ou as células antes da purificação não sofreram muitos ciclos de congelação/descongelação^{[29],[75]}.

De facto, no caso de *Ps. stutzeri*, quando a N₂OR é isolada sob condições anaeróbias^[67], a quantidade de CuZ* é muito pequena, enquanto que a enzima isolada a partir de *Pa. pantotrophus*, em condições semelhantes, apresenta uma razão entre CuZ* e CuZ_{total} de 0,29, sendo que, aquando do seu isolamento na presença de oxigénio, esta razão aumenta para 0,66^[73], o que vem confirmar a observação de que em condições aeróbias a enzima é mais rica em CuZ* do que em CuZ.

O estado redox inativo, CuZ*, pode ser obtido através da redução da enzima, com ascorbato ou ditionito de sódio. Contudo, o processo de redução de CuZ e CuZ* com ditionito ainda não está completamente esclarecido. Na enzima contendo só CuZ* a redução apenas afeta o centro CuA, uma vez que o centro CuZ está no estado redox inativo, [1Cu²⁺-3Cu⁺] (Tabela 1.1.). No entanto, para a N₂OR contendo o centro catalítico como CuZ, a redução ocorre em duas etapas cinéticas distintas, como referido acima^{[29],[75]}. A forma reduzida resultante tem um espectro na zona do visível diferente do característico da forma CuZ* [1Cu²⁺-3Cu⁺], uma vez que o máximo de absorção é deslocado de um comprimento de onda de 640 nm para valores mais elevados (680 nm para a N₂OR de *Pa. pantotrophus*, ou 660 nm para N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus*^[77]), sendo esta banda de absorção muito mais larga (espectro não apresentado). Além disso, o comportamento redox também é diferente, uma vez que o CuZ* no estado [1Cu²⁺-3Cu⁺] não pode ser oxidado, enquanto que o CuZ no estado [1Cu²⁺-3Cu⁺] pode ser reoxidado por um agente oxidante, como por exemplo, o ferricianeto de potássio^{[29],[75],[77]}.

Além das espectroscopias de UV-visível e RPE, outras técnicas, tais como ressonância de Raman, Dicroísmo Circular Magnético e Espectroscopia de Raios-X, têm sido importantes para a identificação e caracterização dos diferentes estados de oxidação de ambos os centros, CuZ e CuA, da enzima^{[68],[69],[75],[88]-[91]}. Além disso, a caracterização de vários mutantes de N₂OR de *Ps. stutzeri* foi essencial para a atribuição das características espectroscópicas dos centros CuA, CuZ e CuZ*^[90].

1.3.6. Atividade enzimática da redutase do óxido nitroso

Vários tipos de ensaios enzimáticos foram desenvolvidos para testar a atividade da redutase do óxido nitroso quer com a enzima isolada quer a partir de extratos celulares, sendo que o ensaio mais usado foi o desenvolvido por Kristjansson e Hollocher (1980), no qual se determina a velocidade de oxidação do radical metil- ou benzil-viologénio após a adição de N₂O^[91]. De facto, a caracterização e identificação dos intermediários que são capazes de ligar e reduzir o N₂O, são dos aspetos mais importantes para a compreensão do ciclo catalítico e consequentemente da atividade da enzima N₂OR.

Como referido na secção 1.3.5., o centro CuZ na forma de CuZ*, [1Cu²⁺-3Cu⁺], não pode ser reduzido ou oxidado (por ditionito ou ferricianeto, respetivamente), sendo por isso denominado de redox inativo ou inerte. Contudo, o ensaio de atividade após incubação prolongada, com excesso de metil-viologénio reduzido sugere que o centro CuZ* na forma [1Cu²⁺-3Cu⁺] é reduzido ao estado totalmente reduzido que é ativo, CuZ super reduzido, em que o centro CuZ está no estado redox [4Cu⁺], ver Tabela 1.1., última linha. Este estado do centro CuZ, totalmente reduzido, é caracterizado por um sinal de RPE silencioso, sendo que, também não são detetadas quaisquer contribuições para a absorção na região do visível. Na verdade, ensaios de atividade realizados demonstraram que a atividade da enzima aumenta com o aumento do tempo de incubação, e que este aumento da atividade está diretamente relacionado com a diminuição da intensidade do sinal de RPE e bandas de absorção. Tendo sido proposto que esta forma redox é necessária para a ligação e catálise da redução de dois eletrões, do N₂O a N₂^{[92],[93]}.

A N₂OR de *Ps. stutzeri*, *Pa. pantotrophus*, *Pa. denitrificans* e mais recentemente de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, pode ser isolada com o centro CuZ na forma [2Cu²⁺-2Cu⁺]^{[68],[75],[77],[89]}. O centro CuZ nesta forma é considerado redox ativo, no entanto, a sua atividade catalítica é muito pequena e semelhante à determinada para a enzima com o centro CuZ como CuZ*^[73]. Com efeito, foi demonstrado que a atividade da enzima de *Ac. cycloclastes*, sobretudo com o centro CuZ na forma [2Cu²⁺-2Cu⁺] aumentou de 8 para 125 U.mg⁻¹, após a incubação com metil-viologénio, demonstrando que esta forma da enzima também requer a ativação para alcançar a atividade máxima através da redução completa do centro CuZ^[93].

Deste modo, podemos afirmar que a N₂OR isolada quer na presença ou ausência de oxigénio requer, sempre, um processo de ativação, precedente ao ensaio de atividade, para reduzir totalmente o centro CuZ, [4Cu⁺], visto ser apenas desta forma que se consegue obter uma atividade específica máxima da enzima, N₂OR.

1.3.6.1. Ciclo catalítico

Para clarificar o mecanismo de redução do N₂O, foram realizados vários estudos cinéticos, através dos quais se utilizaram doadores eletrónicos quer fisiológicos (uma proteína de cobre tipo I ou um citocromo do tipo c), quer artificiais (metil-viologénio ou benzil-viologénio).

Nos primeiros ensaios relatados, a enzima foi incubada com metil ou benzil-viologénio reduzido, sendo o ensaio iniciado pela adição de substrato. Contudo, recentemente procedeu-se a uma alteração ao ensaio, que permitiu a separação do processo de ativação da atividade catalítica, sendo, neste caso o ensaio iniciado pela adição da enzima ativada (tendo em conta

que os agentes redutores utilizados para a ativação, são removidos previamente ao ensaio cinético por *desalting*, numa câmara de luvas)^[43].

Embora a maioria dos parâmetros cinéticos tenham sido obtidos utilizando doadores de elétrons artificiais, várias proteínas, tais como citocromos do tipo *c*, quer fisiológicos ou não fisiológicos (citocromo *c* mitocondrial), também têm sido utilizados como doadores de elétrons competentes para a N₂OR em ensaios *in vitro*^[94]. No caso da N₂OR isolada a partir de *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans*, *Ma. hydrocarbonoclasticus* e *Pa. pantotrophus*^{[29],[73],[96],[98]}, o doador fisiológico proposto é um citocromo *c* periplasmático, sendo que a N₂OR de *Pa. pantotrophus* também pode aceitar elétrons de uma proteína periplasmática de cobre, a pseudoazurina^[95] e a partir do citocromo *c* de coração de cavalo^[94]. No caso da N₂OR de *Ac. cycloclastes*, o citocromo *c* de coração de bovino é capaz de reduzir a enzima^[96], no entanto, o seu doador de elétrons fisiológico é a pseudoazurina. Apesar da N₂OR de *Wo. succinogenes* ter um domínio adicional de ligação ao hemo tipo *c* com função de transferência eletrônica, pode aceitar elétrons de um citocromo tipo *c* periplasmático isolado do mesmo organismo, que é por isso considerado um putativo doador de elétrons^{[29],[73]}.

No caso da N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, através de uma análise cinética comparativa entre o citocromo *c*₅₅₂, o doador de elétrons fisiológico, e o metil-viologénio, o doador não-fisiológico, usado também como agente redutor que é necessário para a ativação da enzima, verificou-se que esta pequena molécula é o doador de elétrons mais eficiente^[43].

Visto que o citocromo *c*₅₅₂ reduzido é capaz de doar elétrons ao centro CuA mas não é capaz de reduzir completamente o centro CuZ quando este está no estado [1Cu²⁺-3Cu⁺], CuZ*, confirma-se que este estado é inerte e não faz parte do ciclo catalítico, uma vez que a sua redução é muito lenta (o que requer um processo de ativação na presença de agentes redutores fortes). O que também está de acordo com o facto de todas as formas de N₂OR isoladas, apresentarem atividade catalítica muito baixa, a menos que submetidas a um mecanismo de ativação prolongada^[71].

Verificou-se, ainda, que no caso do uso do citocromo *c*₅₅₂, a transferência eletrônica é o passo limitante da reação, ao passo que, aquando da utilização do metil-viologénio o passo limitante é a redução de N₂O, que se verifica mais lenta do que a transferência eletrônica quando se utiliza este doador artificial comparativamente ao doador fisiológico, citocromo *c*₅₅₂. Outra diferença observada foi na dependência do pH da atividade catalítica, a qual é mais elevada a valores de pH básicos para o metil-viologénio, enquanto que para o citocromo *c*₅₅₂ é superior para valores mais ácidos. Sendo o pH ótimo obtido, para grande parte das N₂ORs, entre 8,0 a 9,5 aquando da utilização do metil-viologénio. A diferença observada na atividade

pode ser relacionada com o tipo de interação do metil-viologénio com a enzima, em particular devido à redução direta do centro CuZ que ultrapassa o fluxo de eletrões entre o centro CuA e CuZ da N₂OR^{[43],[74],[95]}.

1.3.6.2. Intermediários do ciclo catalítico

A reação enzimática catalisada pela N₂OR é um processo constituído por diversas etapas, em que cada uma (e os intermediários que delas fazem parte), é crucial para a realização de todo o ciclo catalítico. Tendo em conta que a N₂OR requer uma incubação prolongada para se obter a forma super reduzida, sendo que neste estado o centro CuZ, [4Cu⁺], é a forma cataliticamente ativa da enzima, esta pode ser considerada como um ponto de partida no ciclo catalítico.

Inicialmente foi proposto que o ciclo catalítico consistia numa série de etapas de protonação e um passo de redução eletrónica até ao retorno do centro CuZ à forma super reduzida, [4Cu⁺]^[97].

Mais recentemente, Dell'Acqua *et al.* (2010), através da reação direta da forma ativa da N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* com uma quantidade estequiométrica de N₂O, permitiu a identificação de um novo intermediário do ciclo catalítico, denominado CuZ^o^[98].

Esta nova espécie tem o centro CuA no estado oxidado, com bandas de absorção características aos comprimentos de onda de 480 nm e 540 nm, e o centro CuZ no estado [1Cu²⁺-3Cu⁺], com uma única banda de absorção característica a 680 nm. À primeira vista, poderia dizer-se que é um estado muito semelhante ao do CuZ*, contudo, a sua atividade catalítica é idêntica à observada para a enzima no estado super reduzido. Esta espécie tem um tempo de meia-vida muito curto (0,3 min⁻¹), e o seu desaparecimento está relacionado com o declínio da atividade catalítica e consequente aumento da banda de absorção a 640 nm, característica do centro CuZ na forma de CuZ*. Como já mencionado, o centro CuZ na forma CuZ^o encontra-se no mesmo estado redox que o centro CuZ na forma CuZ*, [1Cu²⁺-3Cu⁺], sendo diferenciado deste apenas por exibir atividade elevada, e pequenas diferenças nas suas propriedades espectroscópicas^[98]. No entanto, informações estruturais das formas super reduzida e CuZ^o ainda são inexistentes e representam uma meta importante para futuras pesquisas.

Assim, com a identificação desta nova espécie, CuZ^o, como um intermediário do ciclo catalítico da N₂OR, o mecanismo de redução, catálise e inativação da enzima foi revisto, Figura 1.9.

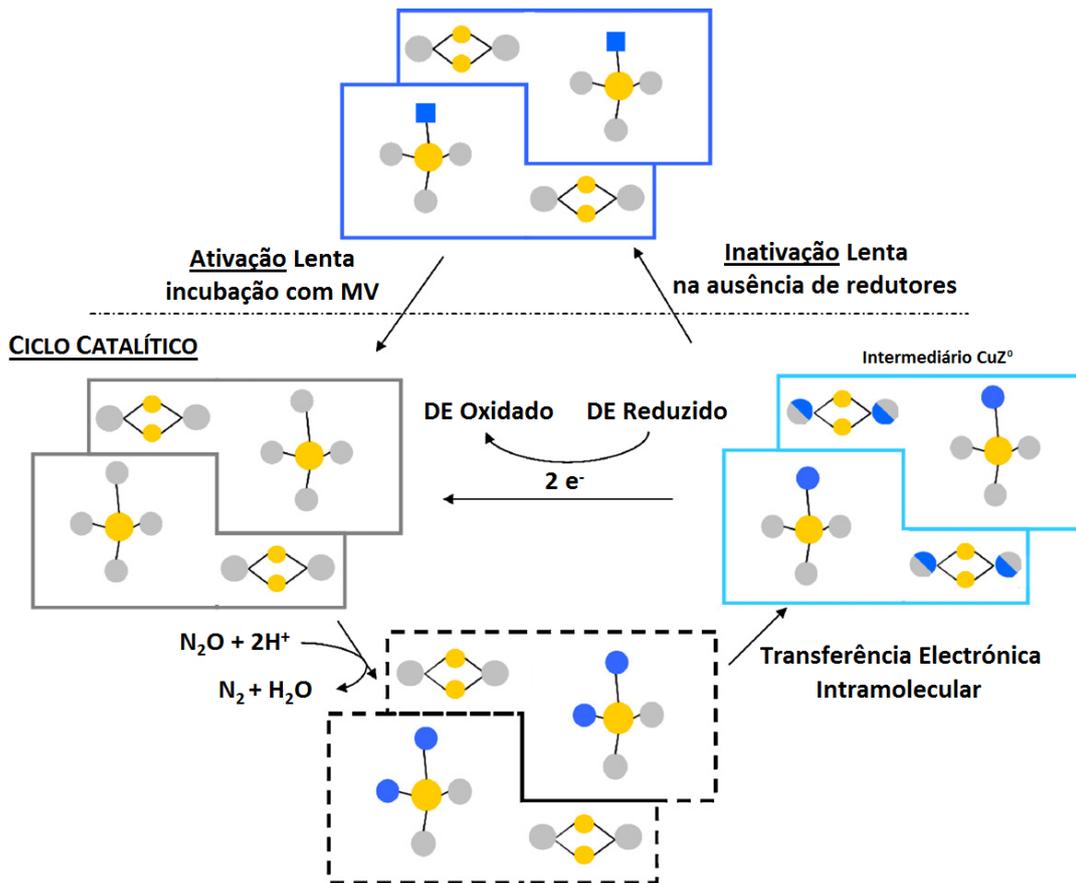


Figura 1.9. Mecanismo de ativação e ciclo catalítico proposto para a N₂OR com o centro CuZ na forma de CuZ*. Os íons cobre no estado de oxidação (II) estão representados com um círculo azul, e com um círculo cinzento no estado de oxidação (I). Na forma CuZ*, o Cu²⁺ está representado com um quadrado azul (para indicar que é redox inativo). Contudo, em ambos os centros CuZ e CuA, os elétrons desemparelhados são deslocalizados dentro do *cluster* através dos átomos de enxofre, representados a círculos amarelos. DE – Doador de Elétrons. Adaptado de^{[29],[71]}.

Tal como representado na Figura 1.9. (linha preta a tracejado), o primeiro intermediário após a redução do óxido nitroso, apresenta-se na forma [2Cu²⁺-2Cu⁺]. No entanto, este intermediário ainda não foi detetado nestas condições, provavelmente porque a rápida transferência de um elétron do centro CuA para o centro CuZ, torna o tempo de vida desta forma (CuZ oxidado), muito curto. O estudo cinético deste intermediário-chave do ciclo será, certamente, um passo importante na caracterização do ciclo catalítico da enzima N₂OR^{[29],[71]}.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O óxido nitroso é um potente gás de efeito de estufa responsável pela depleção da camada do ozono. As emissões globais deste gás para a atmosfera têm vindo a aumentar consideravelmente, sobretudo desde a introdução do processo *Haber-Bosch* que levou ao uso frequente de fertilizantes azotados. Segundo Bakken *et al.* (2012)^[24] a razão $N_2O/(N_2+N_2O)$ é controlada pelo pH, pelo que a acidificação contínua dos solos agrícolas através do uso excessivo de fertilizantes aumenta drasticamente as emissões de N_2O .

Deste modo, a primeira parte do trabalho laboratorial conducente a esta dissertação teve por objetivo estudar a influência do pH na produção da redutase do óxido nitroso. Para o efeito, foram realizados crescimentos de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* com controlo de pH aos valores de 6,5, 7,5 e 8,5, num biofermentador de 2 L. Monitorizou-se a densidade celular, atividade de redução do óxido nitroso, bem como a quantidade de nitritos ao longo dos crescimentos nestas três condições.

Um dos objetivos principais desta tese era a purificação da enzima desses mesmos crescimentos celulares para se comparar as propriedades bioquímicas e espectroscópicas da enzima. No entanto, só foi possível realizar o isolamento da N_2OR de células obtidas a pH 7,5 em duas condições distintas: microaerófilas e anaeróbias estritas, na presença de nitrato. As enzimas isoladas de cada crescimento foram caracterizadas em termos da sua massa molecular aparente, do seu conteúdo em cobre, espectroscopia de UV-visível (determinação do coeficiente de extinção molar), e atividade de redução do óxido nitroso.

CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Crescimento de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617 em biofermentador (2 L e 10 L)

2.1.1. Meio de cultura

A cultura de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* foi preparada em meio EMS (do francês, *Eau de Mer Synthétique*, água do mar sintética). A composição do meio utilizado está descrita no Anexo I. A solução A foi preparada através da mistura de todos os constituintes descritos (NaCl, KCl e NH₄Cl da *Panreac*, MgSO₄.7H₂O, Tris-base (tris(hidroximetil)aminometano, com a fórmula (HOCH₂)₃CNH₂), e Na-Lactato 60% (m/v) da *Sigma-Aldrich*[®], Extrato de levedura da *Scharlau*), sendo posteriormente ajustado o valor de pH a 6,5, 7,5 ou 8,5 (dependendo da condição pretendida) com HCl 37% (m/m) da *Riedel-de-Haën*[®]. Esta solução, conjuntamente com as soluções B (K₂HPO₄, *Scharlau*) e C (CaCl₂.7H₂O, *Scharlau*), foram autoclavadas durante 20 minutos, a uma temperatura de 120 °C e pressão de 1 bar. As soluções D (FeSO₄.7H₂O, *Sigma-Aldrich*[®]) e E (Oligoelementos *Starkey*), foram esterilizadas por filtração à chama (usando um filtro com um diâmetro de $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) e mantidas, posteriormente, a 4 °C.

2.1.2. Preparação dos biofermentadores

2.1.2.1. Biofermentador de 10 L

De modo a facilitar a esterilização do biofermentador, *B-Braun* modelo *BIOSTAT PLUS* (Figura 2.1.), dividiram-se os 9 L de solução A do meio *EMS* em dois, 5 L no fermentador e 4 L num frasco de *Schott*. A esterilização destas duas soluções foi efetuada em separado, uma vez que têm tempos de esterilização diferentes. O frasco de *Schott* contendo a solução A foi autoclavado durante 20 minutos, a uma temperatura de 120 °C e pressão de 1 bar, enquanto

que o fermentador, contendo os 5 L de solução A, foi a autoclavar durante 1 hora (com a tampa desapertada, de modo a permitir que a pressão dentro deste iguale a que se faz sentir dentro da autoclave, evitando a sua explosão).

Após a esterilização, a adição dos 4 L de solução A ao fermentador foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica (Figura 2.1. C). O inóculo de 1 L, juntamente com as soluções necessárias ao crescimento (B, C, D, E – Anexo I, e a solução de NaNO_3 100 g.L^{-1} da *Merck*, necessária para que o crescimento ocorra em condições desnitrificantes), foram posteriormente adicionados através de uma das entradas no topo do fermentador (ver Figura 2.1. A), finalizando-se, assim, a montagem do biofermentador (Figura 2.1. D).

As soluções que são usadas para ajustar o pH durante o crescimento, NaOH 1 M e HCl 1 M (ambos da *Riedel-de-Haën*[®]) – Figura 2.1. B, bem como uma solução de H_2SO_4 a 20% (v/v) da *Riedel-de-Haën*[®], utilizada como armadilha de escape de pressão, durante o funcionamento do biofermentador, e a solução de anti-espuma da *Sigma-Aldrich*[®] (durante o crescimento são adicionados pequenos volumes desta solução de modo a evitar a formação de espuma), também foram esterilizadas na autoclave.

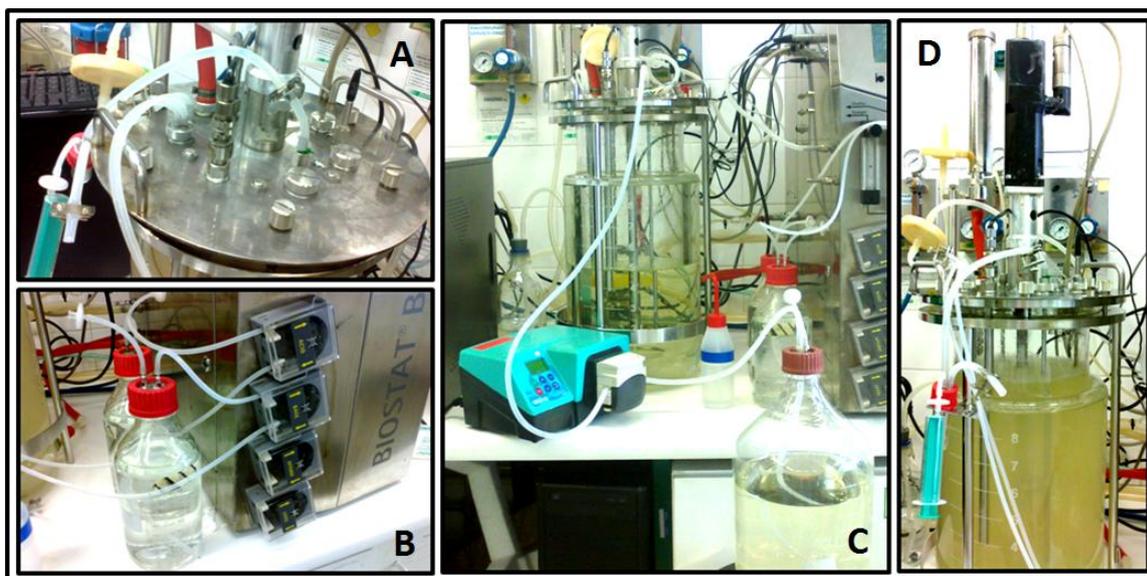


Figura 2.1. Esquema de montagem do Biofermentador de 10 L, utilizado na obtenção de massa celular de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas na presença de nitrato, usando o meio EMS. A – Tampa do Fermentador, B – Frascos de *Schott* de ácido, HCl 1 M e base, NaOH 1 M (caso se monitorize a adição de um anti-espuma, este seria colocado no seguimento do ácido e da base), C – Adição dos 4 L de Solução A ao Fermentador, com o auxílio de uma bomba peristáltica, D – Fermentador totalmente montado, já com os 9 L de Solução A e pré-inóculo de 1 L, $V_{\text{total}} = 10 \text{ L}$. O reator de 2 L é exatamente igual ao ilustrado na Figura.

2.1.2.2. Biofermentador de 2 L

No caso do fermentador de 2 L, a esterilização dos 1,8 L de solução A do meio EMS foi, igualmente, efetuada numa autoclave durante 20 minutos, a 120 °C e à pressão de 1 bar. O mesmo método foi utilizado para a esterilização dos frascos de *Schott* que contêm o ácido e a base, bem como da armadilha de escape e do frasco com anti-espuma. Devido ao volume consideravelmente mais pequeno, toda a solução A é esterilizada dentro do fermentador devidamente montado e com os cuidados evidenciados anteriormente na secção 2.1.2.1. dos Materiais e Métodos.

Todo o procedimento seguinte foi idêntico ao descrito para o biofermentador de 10 L, à exceção do inóculo que, sendo para um crescimento de menor volume, é de 200 mL. No entanto, a sua adição (tal como das restantes soluções necessárias ao crescimento) à solução A foi, igualmente, efetuada por uma das entradas na tampa do fermentador (ver Figura 2.1.).

2.1.3. Preparação dos pré-inóculos

Para a realização do crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 617 (tanto no fermentador de 10 L como no fermentador de 2 L), foi efetuada uma série consecutiva de pré-inóculos. Uma colónia de *Ma. hydrocarbonoclasticus* crescida numa placa de meio EMS sólido (Anexo II), conservada a 4 °C, foi utilizada para inocular à chama 5 mL do meio EMS, em duplicado, e em *Erlenmeyer* de 25 mL. Ambos os pré-inóculos foram incubados a 30 °C, com agitação orbital contínua de 210 rpm, durante 24 horas. Estes pré-inóculos foram, posteriormente, usados para inocular 50 mL de meio EMS, em *Erlenmeyer* de 250 mL, tendo sido incubados nas mesmas condições, durante, aproximadamente, 24 horas. Posteriormente, cada pré-inóculo de 50 mL foi utilizado para inocular, em duplicado, 500 mL de meio (em dois frascos de *Erlenmeyer* de 2 L), que foram incubados como descrito anteriormente. Finalmente, estes dois pré-inóculos constituem o inóculo final de 1 L para adicionar ao fermentador de 10 L. Em relação ao fermentador de 2 L, de um desses pré-inóculos de 500 mL foram usados 200 mL como inóculo final.

Embora os pré-inóculos consecutivos tenham sido preparados usando 0,12% (m/v) de lactato como fonte de carbono (Anexo I), a concentração de lactato nos vários fermentadores foi de 0,75% (m/v).

2.1.4. Condições de crescimento nos biofermentadores

A cultura foi incubada no fermentador durante, aproximadamente, 48 horas, a 30 °C, mantendo-se o pH constante aos diferentes pHs em estudo (6,5; 7,5 e 8,5) e sob agitação contínua de 150 rpm até a percentagem de O₂ atingir os 0%, altura em que se alterou a agitação para 50 rpm. O caudal de ar foi mantido durante todo o procedimento a 0,2 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto).

Recolheram-se amostras ao longo do tempo (hora a hora) para registo da densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}). Estas amostras foram armazenadas a -20 °C e -80 °C, para posterior quantificação de nitrito e ensaios de atividade de redução do óxido nitroso das células (em triplicado), respetivamente, como descrito nas secções 2.2.1. e 2.2.3 do presente Capítulo.

As amostras recolhidas foram armazenadas de diferente formas, uma vez que, como referido na Introdução, a enzima altera o seu estado redox ao ser sujeita a vários ciclos de congelação/descongelação, pelo que, para os ensaios de atividade de redução do óxido nitroso, o armazenamento das amostras é realizado a -80 °C e em triplicado.

2.2. Caracterização dos crescimentos a diferentes pHs

2.2.1. Quantificação de nitrito

A quantificação de nitrito nas amostras recolhidas ao longo do crescimento foi efetuada pelo método colorimétrico de *Griess*, que deteta a presença de nitrito, tendo sido primeiramente descrito por Peter Griess em 1858. O método de *Griess* deteta a formação de um azo-composto de coloração rosada que se forma após a reação do nitrito com o reagente de *Griess*. Quando é adicionado o ácido sulfanílico, o nitrito forma um sal de diazónio que, após adição do *dihidrocloreto de n-(1-naftil)etilenodiamina* (NEDA) gera um produto rosado^[99].

Como padrão usou-se uma solução de NaNO₂ 1 mM numa gama de concentrações entre 0 µM e 50 µM, que foi preparada em água Milli-Q.

Como qualquer outro método colorimétrico, é necessário a realização de uma reta de calibração, como mostra a Figura 2.2.

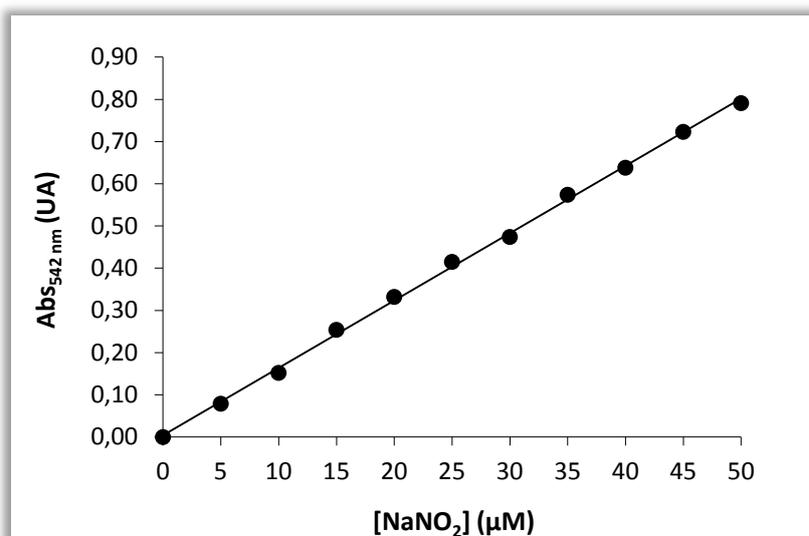


Figura 2.2. Retas de calibração usando o método de *Griess* para quantificação total de nitritos. A equação da reta é dada por $Abs_{542\text{ nm}} = 0,0159.[NaNO_2] (\mu M) + 0,0042$, com um $R^2 = 0,999$. Curvas de calibração semelhantes foram utilizadas em todos os ensaios efetuados a pHs diferentes. O padrão utilizado foi uma solução de $NaNO_2$, nitrato de sódio (solução *stock* a 1 mM).

O procedimento consiste na adição de 300 µL de amostra ou padrão (diluídos em água Milli-Q), 300 µL de ácido sulfanílico 69,7 mM (1,2 g de Sulfanilamida da *Merck* em 100 mL de HCl 30% (m/m), da *Panreac*) e 300 µL de NEDA 23 mM da *Sigma-Aldrich*[®] que, posteriormente, são incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente. A *cuvette* ficou, portanto, com um volume final de 900 µL e a leitura da absorvância foi feita a um comprimento de onda (λ) de 542 nm. As duas soluções (ácido sulfanílico e NEDA) devem estar ao abrigo da luz e a 4 °C.

2.2.2. Quantificação de Proteína

A quantificação de proteína das amostras retiradas ao longo dos crescimentos foi realizada através do método de *Lowry*, um método colorimétrico, caracterizado pela reação do reagente Biureto (reação esta que se traduz na redução de cobre, de Cu^{2+} a Cu^+). Neste método, a detecção de Cu^+ é realizada através da reação do reagente *Folin-Ciocalteau* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) que, quando reduzido, forma um complexo com forte absorção a um comprimento de onda de 750 nm^[100].

A proteína padrão utilizada foi a albumina de soro bovino (ASB) da *Sigma-Aldrich*[®], com a qual se fez uma reta de calibração numa gama de 0 a 0,30 mg/mL, preparada em água Milli-Q, de acordo com o apresentado no gráfico da Figura 2.3. As amostras recolhidas ao longo do crescimento foram, também, diluídas com água Milli-Q.

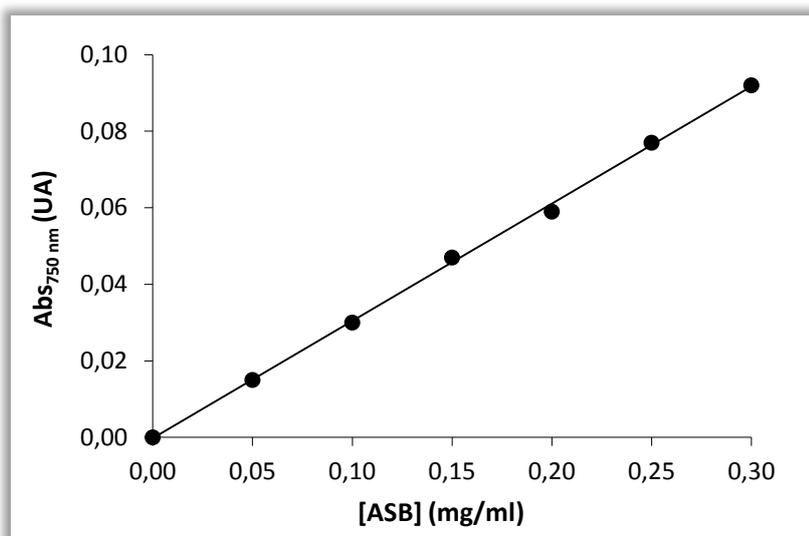


Figura 2.3. Retas de calibração usada para quantificação total de proteína através do método de *Lowry*. A equação da reta é dada por $Abs_{750\text{ nm}} = 0,3064.[ASB] \text{ (mg/ml)} - 0,0003$, com um $R^2 = 0,999$. Retas semelhantes foram utilizadas em todos os ensaios efetuados a pHs diferentes. O padrão utilizado foi uma solução de ASB (solução *stock* a 1 mg/mL).

O procedimento do método de *Lowry* consiste em adicionar 400 μL do reagente Biureto (composição no Anexo III) a 100 μL de amostra (proteína padrão e amostras em estudo), agitar e incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida, adicionar 3,5 mL de Na_2CO_3 2,3% (m/v) da *Panreac*, agitar e adicionar, por fim, 100 μL do reagente *Folin-Ciocalteu* (*Merck*). Agitar novamente e incubar durante 30 minutos, à temperatura ambiente e, após este período, medir a absorvância ao comprimento de onda de 750 nm, ao qual o complexo formado absorve.

Este método foi também utilizado na quantificação de proteína das amostras obtidas de crescimentos de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas e anaeróbias, ambos na presença de nitrato. Esta quantificação é necessária para a determinação do coeficiente de extinção molar, bem como para a determinação das atividades de redução do óxido nitroso.

2.2.3. Ensaios de atividade de redução do óxido nitroso

Os ensaios que permitiram determinar a atividade específica ao longo dos crescimentos (aos diferentes pHs em estudo) foram realizados em condições anaeróbias, tendo por isso sido efetuados numa câmara de luvas, *Braun*. Para o efeito, todas as soluções *stock* utilizadas são previamente desarejadas com argón – metil-viologénio (MV) 40 mM (*Sigma-Aldrich*®) em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,6 e ditionito de sódio (DT) 20 mM (*Sigma-Aldrich*®), também diluído no mesmo tampão mas preparado somente dentro da câmara com tampão desarejado. A solução de óxido nitroso é preparada saturando água Milli-Q desarejada com o gás óxido nitroso.

A determinação da atividade de redução do óxido nitroso nas amostras retiradas ao longo do crescimento é realizada numa *cuvette* de quartzo, sob agitação constante e sem incubação, utilizando um espectrofotômetro *TIDAS diode array*. A atividade é determinada por monitorização da oxidação do MV através do decaimento da absorvância ao comprimento de onda de 600 nm. Inicialmente, adicionou-se 40 µL de células (diluição 1:25) a 90 µM MV e 45 µM DT, sendo a reação iniciada com a adição de 1,25 mM N₂O, num volume final de 1 mL. A atividade é monitorizada a um comprimento de onda de 600 nm e determinada através do declive inicial desta curva de decaimento.

Os ensaios de atividade utilizando a enzima redutase do óxido nitroso (N₂OR) purificada foram realizados de três formas distintas:

1. Incubação da enzima durante 3 h com metilviologénio reduzido como doador de eletrões. O ensaio de atividade é realizado como descrito anteriormente;

2. Com pré-ativação da N₂OR durante 5 h (ver secção 2.2.3.2.), com metil-viologénio reduzido como doador de eletrões (Figura 2.4. B). Os agentes redutores, utilizados para a sua ativação, são removidos através de uma coluna de filtração em gel NAP-5 *Sephadex™ G25* equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, para troca de tampão. O ensaio de atividade é realizado como descrito anteriormente; contudo, a enzima é adicionada após adição do substrato;

3. Com pré-ativação da N₂OR durante 5 h e usando como doador de eletrões o citocromo c₅₅₂ reduzido ao invés do metil-viologénio (Figura 2.2. A). A enzima é adicionada ao ensaio de atividade após o substrato, ou seja, a reação é iniciada pela adição da N₂OR ativada (ver secção 2.2.3.1.) à *cuvette* que já contém tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, citocromo c₅₅₂ com uma concentração aproximada de 10 µM, bem como 1,25 mM N₂O.

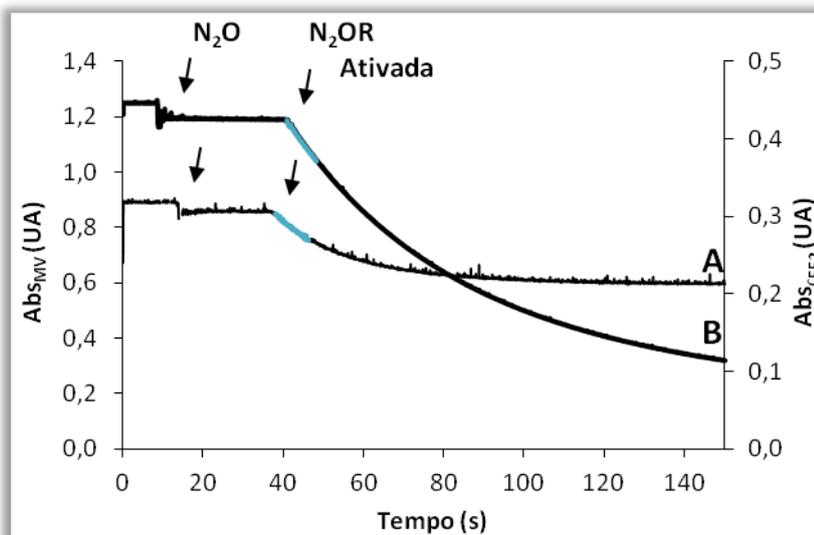


Figura 2.4. Ensaios enzimáticos usando o citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (A) ou metil-viologênio (B), como doadores de elétrons. Os ensaios são iniciados pela adição de $\sim 15 \mu\text{M}$ da enzima, a uma solução contendo $1,25 \text{ mM}$ N_2O saturado, tampão 100 mM Tris-HCl, pH 7,6 e $\sim 10 \mu\text{M}$ citocromo c_{552} / $\sim 90 \mu\text{M}$ metil-viologênio. A absorvância é lida a 552 nm (A) e 600 nm (B). A azul está representado o declive da curva de decaimento, utilizado no cálculo da atividade específica.

Os ensaios de atividade da redutase do óxido nitroso foram efetuados com, aproximadamente, 35 nM N_2OR (por dímero), sendo a concentração final confirmada pelo espectro com os coeficientes de extinção molar calculados para cada enzima.

2.2.3.1. Ensaios de atividade da redutase do óxido nitroso com o doador fisiológico, citocromo c_{552}

Nos ensaios de atividade com o doador fisiológico, citocromo c_{552} , este foi reduzido com ascorbato de sódio (*Alfa Aeser*[®]) aproximadamente numa proporção de 1 (c_{552}) : 4 (ascorbato) em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, o excesso de redutor foi removido através de uma cromatografia de exclusão molecular, usando uma coluna NAP-5 *Sephadex*[™] G25 equilibrada com tampão 100 mM Tris-HCl, pH 7,6.

Neste caso, a atividade enzimática foi monitorizada a um comprimento de onda de 552 nm , característico da banda α (alfa) do citocromo reduzido.

2.2.3.2. Ativação da redutase do óxido nitroso

A enzima em estudo, N_2OR , foi ativada em condições de exclusão de oxigênio (dentro de uma câmara de luvas) com metil-viologênio reduzido com ditionito de sódio, ambos da *Sigma*-

Aldrich[®]. A enzima, com uma concentração final de 30 μ M, foi incubada à temperatura ambiente na presença de 3 mM MV e 1,5 mM DT em tampão 100 mM Tris-HCl, pH 7,6^[43] num volume final de 500 μ L, durante 5 horas.

Todas as soluções utilizadas foram previamente desarejadas com árgon e preparadas como descrito na secção 2.2.3. do presente Capítulo.

Após a incubação, o excesso de redutores foi removido através de uma cromatografia de exclusão molecular usando, uma coluna NAP-5 *Sephadex*[™] G25 (*GE Healthcare*), equilibrada com tampão 100 mM Tris-HCl, pH 7,6.

2.3. Purificação da redutase do óxido nitroso

2.3.1. Obtenção de massa celular e extrato periplasmático

2.3.1.1. Obtenção de massa celular de crescimento em condições microaerófilas (crescimento realizado num biofermentador de 10 L)

A massa celular foi recolhida por centrifugação numa centrífuga *BECKMAN COULTER*[™] (*Avanti*[®] J-26 XPI), rotor JA-10, a 7930 x g, durante 10 minutos e à temperatura de 6 °C. As células foram ressuspensas em Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, numa proporção de aproximadamente 1 grama de células/mL de solução-tampão, e guardadas a -20 °C, enquanto que o sobrenadante foi descartado.

2.3.1.2. Obtenção da fração periplasmática

2.3.1.2.1. Extrato periplasmático de crescimento em condições microaerófilas na presença de nitrato (crescimento realizado num biofermentador de 10 L)

A massa celular obtida anteriormente foi descongelada e sujeita a uma diluição de cinco vezes com água destilada previamente arrefecida, na presença de 0,5 mM EDTA (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*), e incubada sob agitação contínua durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Foram, ainda, adicionados inibidores de proteases (*Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche*), de acordo com o procedimento fornecido pelo fabricante do produto. Após este período de incubação, centrifugou-se o extrato (*BECKMAN COULTER*[™] - *Avanti*[®] J-26 XPI, rotor JA-25.50), a 32816 x g, durante 1 hora, a 6 °C. O sedimento (composto

pelos esferoplastos) foi descartado e o sobrenadante (fração periplasmática) foi posteriormente usado para purificar a enzima em estudo, a redutase do óxido nitroso, e o citocromo c_{552} .

2.3.1.2.2. Extrato periplasmático de crescimento em condições anaeróbias estritas na presença de nitrato (crescimento realizado num fermentador de 300 L em Marselha)

A massa celular foi, de acordo com o descrito na secção 2.3.1.1. do presente Capítulo, descongelada e submetida a uma diluição de cinco vezes com água destilada previamente arrefecida, na presença de 0,5 mM EDTA, e incubada sob agitação contínua durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Já com inibidores de proteases adicionados, a mistura foi passada num homogeneizador manual, usando um pistão, de modo a eliminar grânulos visíveis. Após este período de incubação, centrifugou-se o extrato (*BECKMAN COULTER™ - Avanti® J-26 XPI*, rotor JA-14), a 3468 x g, durante 30 minutos, a 6 °C. O sobrenadante obtido neste passo foi, ainda, ultracentrifugado (*BECKMAN COULTER™*, rotor 45 Ti), a 151457 x g, durante 1 hora e 10 minutos, e a 4 °C. Os sedimentos (compostos pelos esferoplastos) foram ressuspensos em solução-tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 e o sobrenadante (fração periplasmática) foi, posteriormente, usado para purificar a enzima em estudo, a redutase do óxido nitroso, e o seu parceiro redox fisiológico, citocromo c_{552} , de forma igual ao referido na secção 2.3.1.2.1.

2.3.2. Purificação da redutase do óxido nitroso do extrato periplasmático de células obtidas em condições microaerófilas na presença de nitrato

A fração do periplasma obtida como descrito anteriormente (ver secção 2.3.1.2.1), contendo a redutase do óxido nitroso, foi purificada através de uma cromatografia de permuta aniónica usando uma resina *DEAE Fast Flow* da *GE Healthcare* com as dimensões de 28 cm x 2,6 cm \varnothing (aproximadamente 150 mL). A resina foi equilibrada com três volumes de coluna de 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, e a fração foi aplicada a um caudal de 3,0 mL/min. As proteínas que não ficaram adsorvidas à matriz foram eluídas com o mesmo tampão antes de se iniciar o gradiente. Efetuou-se um gradiente salino com NaCl entre 0 mM e 500 mM, em 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, durante aproximadamente 250 min (5 volumes de coluna), a um caudal de 3,0 mL/min.

A fração que continha a redutase do óxido nitroso foi, posteriormente, concentrada num *diaflo* (*Millipore*) sobre uma membrana YM30. No segundo passo de purificação foi utilizada uma

cromatografia de exclusão molecular, usando-se como matriz a *Superdex™ 75 pre-packed* da *GE Healthcare* (16 cm x 1,6 cm \varnothing), equilibrada com solução-tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, e contendo 150 mM NaCl. Após este passo cromatográfico, obtiveram-se duas frações da redutase do óxido nitroso. A fração mais pura foi conservada sob a forma de esferas, em azoto líquido (com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, foi-se deixando cair a proteína gota a gota em azoto líquido; as esferas, foram, posteriormente, colocadas em tubos de *Eppendorf* da *Nalgene*, e conservadas em azoto líquido).

2.3.3. Purificação da redutase do óxido nitroso do extrato periplasmático de células obtidas em condições anaeróbias estritas na presença de nitrato

O extrato periplasmático foi obtido como descrito anteriormente na secção 2.3.1.2.2. do presente Capítulo, e dialisado durante 16 horas (*overnight*) numa solução-tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, a 4 °C, tendo-se utilizado membranas de diálise (*cut-off* 3,5 kDa, *Medicell International Ltd*) previamente ativadas em água destilada fervente na presença de EDTA.

A purificação da redutase do óxido nitroso a partir deste extrato foi realizada em três passos cromatográficos: uma permuta aniônica de gravidade, seguida de outra permuta aniônica em sistema de FPLC (do inglês, *Fast Protein Liquid Chromatography*) e, por fim, uma cromatografia de exclusão molecular, igualmente em sistema de FPLC. A primeira cromatografia foi realizada com uma resina *DE-52* da *Sigma-Aldrich®* (dimensões da coluna: 30 cm x 5 cm \varnothing). A resina foi equilibrada com solução-tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, e, após a aplicação do extrato periplasmático, foi lavada com a mesma solução, de forma a eluir as proteínas que não adsorveram à matriz. As restantes proteínas foram eluídas com dois gradientes salinos em 10 mM Tris-HCl, pH 7,6: o primeiro compreendido entre 0 mM e 300 mM de NaCl e o segundo entre 300 mM e 600 mM de NaCl. A fração contendo a redutase do óxido nitroso, eluída a aproximadamente 250 mM de NaCl, foi dialisada como descrito anteriormente para o extrato periplasmático e aplicada numa coluna XK16 empacotada com a resina *SOURCE 15Q* da *GE Healthcare* (volume total da coluna: 150 mL), equilibrada com 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, a um fluxo de 2 mL/min. Tal como anteriormente, após a aplicação do extrato celular, as proteínas que não adsorveram foram eluídas com a solução-tampão usada para equilibrar a coluna. As proteínas adsorvidas foram eluídas com um gradiente de força iónica compreendido entre 10 e 500 mM NaCl, em 10 mM Tris-HCl, pH 7,6.

No final da purificação obtiveram-se quatro frações de N₂OR com diferentes razões de pureza. Estas frações foram concentradas num *diaflo* (*Millipore*) sobre uma membrana YM30 (*cut-off* 30 kDa). Finalmente, foram aplicadas na última coluna utilizada no processo de purificação, uma *Superdex*[™] 200 (*GE Healthcare*) de 300 mL, equilibrada com 150 mM NaCl em 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, com um fluxo de 2 mL/min. Através deste último passo de purificação, obtiveram-se quatro novas frações da redutase do óxido nitroso. Três dessas frações foram conservadas sob a forma de esferas, em azoto líquido, como descrito anteriormente para a redutase do óxido nitroso obtida de um crescimento em condições microaerófilas na presença de nitrato (secção 2.3.2. do presente Capítulo). A última fração foi congelada a -80 °C.

A pureza das frações foi analisada através do espectro de absorção e também por SDS-PAGE, 12,5% em poliacrilamida (m/v).

2.4. Purificação do citocromo c₅₅₂

O citocromo c₅₅₂ foi purificado em dois passos cromatográficos. A primeira cromatografia realizada foi a permuta iónica, na qual o citocromo c₅₅₂ não adsorve. Esta fração foi concentrada e purificada por cromatografia de filtração em gel, *Superdex*[™] 75 da *GE Healthcare* (volume total da coluna: 300 mL), equilibrada com 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, e contendo 150 mM NaCl. Após este passo cromatográfico, o citocromo c₅₅₂ apresentava uma razão de pureza de 5,8 e 6,7, para o citocromo obtido de um crescimento em condições microaerófilas e anaeróbias estritas (ambos na presença de nitrato), respetivamente. Efetuou-se a troca de tampão para 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, através de uma cromatografia de filtração em gel usando uma coluna PD10 *Sephadex*[™] G25 (*GE Healthcare*). A fração do citocromo c₅₅₂ assim obtida foi armazenada em pequenas aliquotas a -80 °C em *Eppendorfs* de 2 mL com rosca.

Todas as colunas utilizadas no processo de purificação da redutase do óxido nitroso e do citocromo c₅₅₂, à exceção da coluna de permuta aniónica de gravidade (utilizada no primeiro passo de purificação da redutase do óxido nitroso de um crescimento em condições anaeróbias estritas na presença de nitrato), encontravam-se ligadas a um sistema de FPLC, *ÄKTApurifier* da *GE Healthcare*, o que permitiu a monitorização da eluição ao comprimento de onda de 280 nm. Todo o processo de purificação foi realizado a 4 °C.

A presença e grau de pureza da redutase do óxido nitroso, bem como do citocromo c₅₅₂, foram confirmados através de espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-visível) e de géis de poliacrilamida 12,5% (m/v) em condições desnaturantes, corados com azul de *Coomassie* R-250 (ver composição no Anexo IV, Tabela A.IV.) ou com coloração para proteínas hémicas, no caso do citocromo c₅₅₂ (ver secção 2.5.3. do presente capítulo).

A razão de pureza do citocromo c_{552} , razão entre os valores das absorvâncias aos comprimentos de onda de 412 e 280 nm (Abs_{412nm}/Abs_{280nm}), foi calculada para as diferentes frações que foram recolhidas nos vários passos cromatográficos, considerando-se que este está puro quando a razão é de aproximadamente 6,2^[101].

2.5. Géis de poliacrilamida

2.5.1. SDS-PAGE

Os géis de poliacrilamida realizados em condições desnaturantes (SDS-PAGE, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), em solução-tampão Tris-Tricina, foram preparados como descrito no Anexo IV, Tabela A.II., sendo o gel de separação constituído por uma mistura acrilamida/bisacrilamida (*Merck*) a 12,5% (m/v) e o gel de concentração por 4% (m/v) dessa mesma solução.

As amostras foram previamente fervidas durante 5 minutos, já com o tampão de amostra adicionado (Anexo IV, Tabela A.III.) e, em seguida, aplicadas no gel. As eletroforeses foram realizadas durante 1 hora, a 150 V, usando-se uma solução de 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9 no ânodo, e outra de 0,1 M Tricina, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,25 e 0,1% SDS (m/v) no cátodo. Após finalizar a eletroforese, os géis foram corados para visualização das bandas de proteína por coloração com azul de *Coomassie* ou coloração para hemoss (ver secção 2.5.3.).

2.5.2. PAGE

Os géis nativos foram preparados como explicado anteriormente, com a exceção de não se ter adicionado o agente desnaturante (SDS) nem β -mercaptoetanol na preparação do gel, no tampão de amostra e na solução do cátodo, sendo a concentração do gel de poliacrilamida de 10% (m/v). Assim, tanto o gel de concentração como o de separação foram realizados com as mesmas soluções que em 2.5.1., à exceção do tampão em que foram preparados os géis que, neste caso, não contém SDS. A amostra não foi fervida antes da sua aplicação no gel e o tampão de amostra (Anexo IV, Tabela A.III.) não continha SDS nem β -mercaptoetanol.

A eletroforese foi realizada com uma solução de 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9, no ânodo e outra de 0,1 M Tris-HCl e 0,1 M Tricina, pH 8,25, no cátodo, durante 1 hora, a 150 V. Após finalizar a eletroforese, os géis foram corados para visualização das bandas de proteína (ver secção 2.5.3.).

2.5.3. Coloração dos géis

2.5.3.1. Azul de *Coomassie* – coloração de proteína

Os géis foram corados para determinação do conteúdo proteico com uma solução de Azul de *Coomassie* R-250 durante 30 minutos, e descorado com uma solução aquosa com ácido acético glacial a 7,5% (v/v) e metanol a 45% (v/v). Os géis, depois de corados, foram fotografados sob luz branca numa máquina fotográfica (*VWR GenoSmart*).

2.5.3.2. Coloração do grupo hémico

Os géis foram preparados como descrito anteriormente (secção 2.5.1. do presente Capítulo). No entanto, o tampão de amostra e a preparação das amostras foi diferente: as amostras não foram fervidas e o tampão de amostra não contém agente redutor, uma vez que este iria interferir com a coloração. A eletroforese foi realizada tal como descrito em 2.5.1.

O protocolo de coloração de hemoss^{[102],[103]} consistiu na incubação do gel numa solução contendo 0,03% (m/v) 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (*TMBZ*, *Sigma-Aldrich*®), preparado em 30% metanol (v/v) (*Panreac*) e 70% acetato de sódio (v/v), pH 5, durante 30 minutos. Após este período, foram adicionados 150 µL de uma solução de 30% H₂O₂ (v/v) da *Sigma-Aldrich*®, e incubou-se mais 10 minutos à temperatura ambiente. O gel foi finalmente lavado três vezes com uma solução de propanol a 30% (v/v) da *Merck* e acetato de sódio a 70% (v/v), pH 5. Todo o procedimento de coloração para hemoss é efetuado ao abrigo da luz.

2.6. Caracterização bioquímica da redutase do óxido nitroso

2.6.1. Espectroscopia de UltraVioleta-Visível

Foram traçados espetros entre os comprimentos de onda de 250 nm e 950 nm, num espectrofotómetro UV-1800 (*Shimadzu Spectrophotometer*). As amostras obtidas aquando das diferentes purificações foram diluídas em 10 mM Tris-HCl, pH 7,6. O espetro da redutase do óxido nitroso na forma completamente oxidada foi obtido por adição de uma solução de ferricianeto de potássio, enquanto que o espetro da proteína na forma reduzida foi obtido por adição de uma solução de ditionito de sódio.

No cálculo da concentração da redutase do óxido nitroso a partir do espetro de UV-visível foi utilizada a absorvância ao comprimento de onda de 640 nm da forma reduzida e o $\epsilon = 7,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (dímero)^[26]. Aquando do caso do doador fisiológico (citocromo *c*₅₅₂) foi utilizado o $\epsilon = 19,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[98] a 552 nm da forma reduzida.

2.6.2. Determinação da massa molecular

Para a determinação da massa molecular aparente da redutase do óxido nitroso, utilizou-se uma coluna de filtração em gel, *Superdex™* 200 de 24 mL (10/300), da *GE Healthcare*.

Para o efeito, foram usadas proteínas padrão da *GE Healthcare*, cuja massa molecular é conhecida, preparadas de acordo com o procedimento fornecido pela marca (Tabela 2.1.). Para esse fim, foram realizadas duas misturas de padrões: Mix A – Ferritina/Conalbumina e Mix B – Ribonuclease A/Aldolase/Ovalbumina.

A coluna foi equilibrada com 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 contendo 150 mM NaCl, e a eluição das proteínas padrão (1 mL de cada mistura) e da redutase do óxido nitroso de crescimentos em condições microaerófilas e anaeróbias estritas (100 µL de cada, aproximadamente 2 nmol) foi efetuada na mesma solução, a um caudal de 0,5 mL/min para todas elas. Para a determinação do volume “morto” da coluna, foi eluída, separadamente, uma amostra de Azul de Dextrano (que possuindo uma massa molecular bastante elevada (cerca de 2 000 kDa), não consegue penetrar nos poros da matriz, sendo automaticamente eluído).

Tabela 2.1. Proteínas do *kit* de calibração de filtração em gel (*HMW* e *LMW* da *GE Healthcare*), utilizadas para obtenção da reta de calibração para determinação da massa molecular aparente da enzima redutase do óxido nitroso.

| PROTEÍNA | MASSA MOLECULAR (kDa) | CONCENTRAÇÃO (mg/mL) |
|----------------|-----------------------|----------------------|
| RIBONUCLEASE A | 13,7 | 3 |
| OVALBUMINA | 44,0 | 4 |
| CONALBUMINA | 75,0 | 3 |
| ALDOLASE | 158 | 4 |
| FERRITINA | 440 | 0,3 |

A massa molecular da N_2OR foi determinada através da representação do K_{av} , coeficiente de partição, em função do logaritmo da massa molecular das proteínas-padrão. Este coeficiente foi obtido através da equação V (Anexo V):

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (V)$$

em que,

V_e - Volume de eluição das proteínas;

V_0 - Volume “morto” da coluna;

V_t - Volume total da coluna.

2.6.3. Quantificação de cobre

2.6.3.1. Método da biquinolina

O cobre foi quantificado através do método que se baseia na determinação de cobre reduzido, Cu^+ , por reação deste com o reagente 2,2'-biquinolina^[104]. A solução-padrão usada foi uma solução de acetato de cobre a 500 μM , sendo que a reta de calibração foi traçada numa gama de concentração compreendida entre 0 e 48 μM (Figura 2.5.). Para tal, adicionaram-se 100 μL de amostra a 300 μL de 20 mM ascorbato de sódio (*Alfa Aeser*[®]) preparado em solução-tampão 0,1 M fosfato de potássio, pH 6,0¹, e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 600 μL do reagente 2,2'-biquinolina da *Fluka*[®] (0,5 mg/mL, preparado em ácido acético glacial). A mistura foi incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente. Uma vez que o composto formado, após complexar com o Cu^+ , absorve fortemente a um comprimento de onda de 546 nm, a absorvância, tanto das soluções de redutase do óxido nitroso, como das soluções padrão, foi determinada a este comprimento de onda.

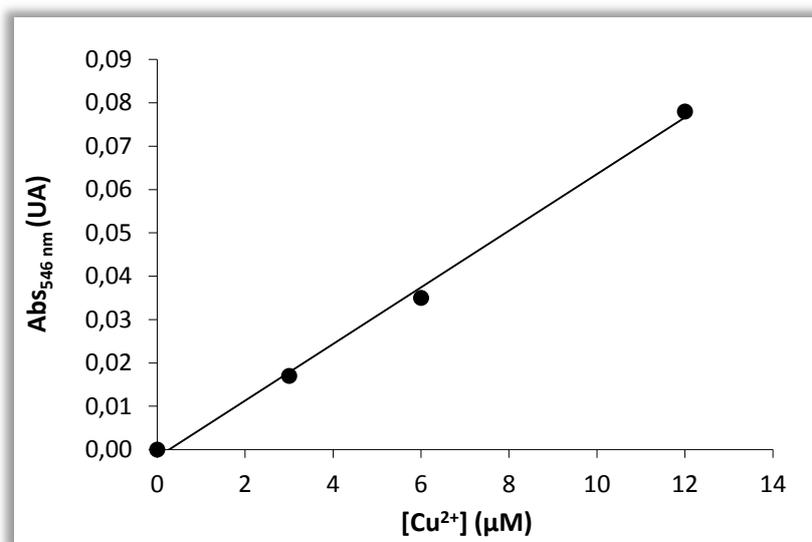


Figura 2.5. Reta de calibração usando o método da 2,2'-Biquinolina para quantificação de cobre. A equação da reta é: $\text{Abs}_{546 \text{ nm}} = 0,0065 \cdot [\text{Cu}^{2+}] (\mu\text{M}) - 0,0018$ com um $R^2 = 0,9966$. Retas semelhantes foram utilizadas em todos os ensaios efetuados para ambas as enzimas, isoladas de crescimentos em condições anaeróbias estritas e microaerófilas, ambos na presença de nitrato. O padrão utilizado foi uma solução de acetato de cobre (solução *stock* a 0,5 mM).

¹ Tampão Fosfato a pH 6,0 foi preparado pela junção de 21,925 mL de KH_2PO_4 com 3,075 mL de K_2HPO_4

2.6.3.2. Determinação de metais através de plasma acoplado indutivamente

O cobre também foi quantificado através de plasma acoplado indutivamente (ICP, do inglês, *Inductively Coupled Plasma*), para além do método descrito anteriormente, no aparelho *Jobin-Yvon – Ultima*. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Análises – *Serviço de Espectroscopia de Emissão Atómica*, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade Nova de Lisboa. A reta de calibração foi realizada com o composto *Reagecom 23 multielements ICP*, numa gama de concentrações compreendida entre 0 e 1,3 ppm.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimentos de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617 em biofermentador de 2 L

A massa celular da bactéria gram-negativa *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* foi obtida num biofermentador de 2 L, em condições microaerófilas (baixa taxa de arejamento) e na presença de nitrato (10 mM), o que deverá favorecer a desnitrificação^[27]. Foram efetuados diversos ensaios, os quais diferiam no valor do pH do meio de cultura (6,5, 7,5 e 8,5).

Realizou-se, ainda, um ensaio em que o meio de cultura foi mantido a pH 6,0. No entanto, e apesar de nos pré-inóculos, em que não há controlo de pH, a bactéria ter-se multiplicado sem problema (densidade ótica a 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$) era de 1,270 antes de se ter inoculado o meio no fermentador), verificou-se que após a inoculação do fermentador, a $DO_{600\text{ nm}}$ praticamente não aumentou, mantendo-se à volta de 0,270, e após 3 horas (h) de incubação era de aproximadamente 0,240. A percentagem de oxigénio decresceu até 0%, após aproximadamente 2 h, tendo aumentado após as 3 h para cerca de 25%, sendo que o aumento da agitação (maior taxa de arejamento) às 7 h de crescimento (quando se registava já 90% de oxigénio), não teve qualquer repercussão positiva no aumento da densidade celular.

Durante os outros 3 ensaios acima referidos foram recolhidas amostras do meio de cultura para monitorizar a progressão do aumento da massa celular (através da determinação da $DO_{600\text{ nm}}$), confirmar se o pH se mantinha estável e concordante com o indicado no monitor do fermentador, quantificar o nitrito e determinar a atividade enzimática de redução de N_2O .

Na Figura 3.1. apresentam-se as curvas de crescimento aos pHs em estudo.

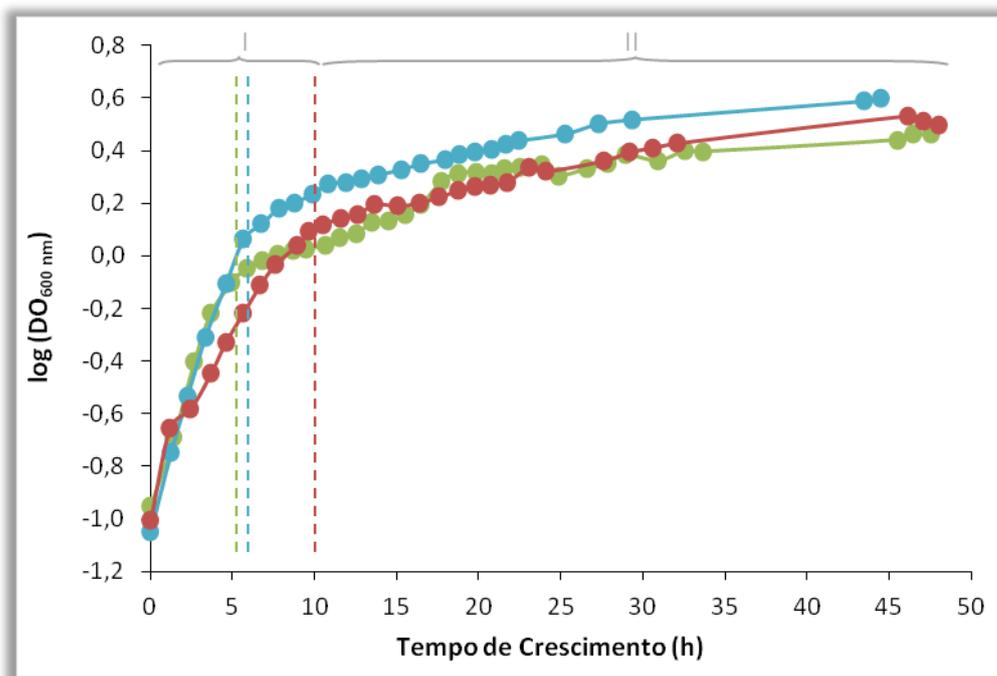


Figura 3.1. Curvas de crescimento de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617 num biofermentador de 2 L, em condições microaerófilas e na presença de nitrato. Representação do logaritmo da densidade óptica a 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$) em função do tempo de crescimento, para os crescimentos a pH 6,5 (verde), pH 7,5 (azul) e pH 8,5 (vermelho). As fases exponencial e estacionária estão identificadas pelos números I e II, respetivamente. As linhas a tracejado correspondem à duração da fase exponencial que dependendo do pH tiveram uma duração de 5h, 6h e 10h, aproximadamente para os crescimentos realizados a pH 6,5, pH 7,5 e pH 8,5, respetivamente.

Através da análise da Figura 3.1., podemos verificar que para os três ensaios, que tiveram uma duração de aproximadamente 48 horas, das quatro fases características do crescimento bacteriano (fase *lag*, exponencial, estacionária e morte), apenas se observaram duas – a fase exponencial e a fase estacionária. A fase de declínio ou morte não foi observada em qualquer dos crescimentos efetuados. No entanto, no crescimento efetuado a pH 8,5 podemos observar que, aquando do seu término se poderia estar perante o início desta fase. Contudo, apenas seria possível confirmar se a fase de morte teve início se se tivesse prolongado o ensaio. Deste modo, apenas se considerou a presença das duas fases de crescimento bacteriano acima referidas.

A fase de adaptação ou *lag*, não foi observável em nenhum dos três ensaios realizados, indicando que a adaptação às novas condições de crescimento foi imediata. De facto, a duração desta fase depende diretamente das condições de crescimento anteriores, sendo que a composição do meio de cultura no biofermentador é idêntica à do pré-inóculo, com exceção da fonte de carbono e energia, que no biofermentador se encontra numa concentração mais elevada, e da presença de 10 mM de nitrato de sódio. Verificando-se assim, que nem a alteração de pH teve influência na adaptação ao meio.

Quanto à fase exponencial, esta é maior quanto mais elevado for o pH, sendo de cerca de 5 horas para o crescimento a pH 6,5, 6 horas para o ensaio a pH 7,5, e aproximadamente de 10 horas para o crescimento a pH 8,5. Uma vez que as condições de crescimento são idênticas para todos os ensaios a não ser o pH do meio de cultura, a diferença observada na duração da fase exponencial deverá estar a ser influenciada por esse fator. A fase estacionária tem uma duração entre [38 – 43] horas nos três crescimentos, dependendo da duração da fase exponencial.

Pela Figura 3.1. e Tabela 3.I. podemos verificar que, embora a taxa de crescimento a pH 6,5 seja idêntica à observada para o ensaio a pH 7,5, a bactéria não consegue atingir a mesma $DO_{600\text{ nm}}$ ao final de 48 h de ensaio, pelo que a pH mais baixo deverá estar a ocorrer algum processo que inibe a multiplicação celular. No ensaio realizado a pH 8,5, embora a taxa de crescimento seja mais lenta, a fase exponencial foi mais longa, e a densidade ótica final do ensaio ligeiramente superior à do pH 6,5, pelo que seria de esperar uma maior massa celular que a pH 6,5.

Em conclusão, pode-se propor que será vantajoso efetuar o crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a valores de pH de, por exemplo, 7 e 8, para melhor perceção do comportamento da bactéria.

Tabela 3.I. Valores comparativos dos crescimentos a diferentes pHs realizados em condições microaerófilas na presença de nitrato.

| CRESCIMENTO | $DO_{600\text{ nm}_t=0}$ | $DO_{600\text{ nm}_FINAL}$ | TAXA DE CRESCIMENTO (h^{-1}) | MASSA CELULAR (g/L) |
|-------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| pH 6,5 | 0,112 | 2,880 | $0,21 \pm 0,02$ | 2,8 |
| pH 7,5 | 0,089 | 4,070 | $0,210 \pm 0,003$ | 11,4 |
| pH 8,5 | 0,099 | 3,135 | $0,098 \pm 0,006$ | 18,9 |

A densidade ótica de uma suspensão de células é proporcional ao número de células em solução, as quais contribuem para a turbidez da mesma. Através da análise da Tabela 3.I., verifica-se que a densidade ótica final do crescimento efetuado a pH 6,5 é inferior à dos outros crescimentos (embora estas diferenças não sejam muito significativas), verificando-se essa tendência em relação à massa celular obtida. Contudo, tendo em consideração os crescimentos a pH 7,5 e 8,5, o valor da densidade ótica final parece que não corresponde ao número de células em suspensão, uma vez que a massa celular obtida do ensaio a pH 7,5 é inferior à conseguida a pH 8,5 (Tabela 3.I.). Todavia, este resultado pode ser explicado pelo facto de que, a pH 8,5, a bactéria tende a formar um precipitado que interfere na $DO_{600\text{ nm}}$. Esta interferência

poderá não ser muito significativa uma vez que, este precipitado se deposita na base do biofermentador, e a densidade ótica está a ser medida da suspensão (contudo algumas partículas deverão estar também nesta suspensão). No entanto, é claro que este precipitado irá contribuir para o aumento do valor da massa celular, pois não foi possível separá-lo de forma eficiente, aquando da centrifugação do meio no final do ensaio. Deste modo, no ensaio a pH 8,5, a quantidade de massa celular está sobrestimada devido ao precipitado formado. Este precipitado não deverá corresponder a contaminação com outro micro-organismo visto ter sido observada nas duas tentativas de crescimento a este pH, e por a observação microscópica da cultura não indicar a presença de outro micro-organismo. Por estas razões pode-se colocar a hipótese de que o composto formado poderá estar a ser produzido pela *Ma. hydrocarbonoclasticus* quando exposta a este pH.

A partir da Figura 3.1. e Tabela 3.I., e tendo em conta que o pH foi monitorizado e mantido constante aos valores 6,5, 7,5 e 8,5, podemos concluir que o pH 7,5 é o pH ótimo de crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* no meio de cultura utilizado, e nas condições de fermentação, uma vez que para além da taxa de crescimento ser ligeiramente mais elevada é também nestas condições que se obteve maior massa celular ($DO_{600\text{ nm}}$ final mais elevada). De facto, é referido na literatura que quando esta bactéria é crescida em condições aeróbicas e em meio sintético com Tris a 1,23% (m/v), NH_4Cl a 0,37% (m/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 0,62% (m/v), $CaCl_2$ a 0,15% (m/v) e KCl a 0,075% (m/v) alterado com Bacto peptona a 0,5% (m/v) e, ainda com NaCl a diferentes concentrações (crescimento efetuado a diferentes temperaturas e pHs), a taxa de crescimento é maior para o ensaio a pH 7,5^[1]. Contudo, segundo Gauthier e colaboradores esta bactéria tolera crescimentos numa gama de pH de 6 a 9,5, o que corrobora o obtido pelo nosso estudo (ver curvas de crescimento da Figura 3.1.).

3.2. Caracterização dos crescimentos a diferentes pHs

3.2.1. Quantificação de nitrito – método de *Griess*

Com as amostras retiradas ao longo dos crescimentos a pH 6,5, 7,5 e 8,5, foi efetuada a quantificação de nitrito livre segundo o método de *Griess*, como referido nos Materiais e Métodos, secção 2.2.1.

A quantificação do nitrito livre ao longo da cultura celular permite-nos inferir sobre o desencadeamento do processo da desnitrificação, uma vez que nos possibilita determinar que quantidade de nitrato está a ser transformado em nitrito e também observar o seu desaparecimento (primeiro e segundo passo da via da desnitrificação, já que a redutase do nitrato, responsável pela catálise da primeira reação da desnitrificação, reduz o nitrato, presente

no meio de cultura aquando do crescimento no biofermentador, a nitrito, que por sua vez é reduzido a óxido nítrico pela redutase do nitrito, responsável pela segunda etapa da via da desnitrificação).

Assim, foi possível traçar o perfil de concentrações de nitrito ao longo do tempo (ver Figura 3.2.), verificando-se que a desnitrificação se encontrava ativa a aproximadamente 2 horas de crescimento para os ensaios efetuados a pH 6,5 e pH 7,5 (onde se começa a observar quantidades de nitrito livre na cultura, pelo que, o nitrato adicionado ao meio já começou a ser reduzido pela redutase do nitrato). A concentração máxima de nitrito livre coincidiu com o tempo de incubação em que se diminuiu a agitação do meio de cultura. A diminuição do oxigénio dissolvido no meio (por termos uma menor agitação temos uma menor taxa de transferência gasosa entre o ar e o líquido), e a acumulação de óxido nítrico, NO, (que está diretamente relacionada com a redução do nitrito, NO_2^- , a NO, e a sua conseqüente redução a óxido nitroso, N_2O), induzem a desnitrificação por induzirem a expressão dos genes que codificam para a NIR, NOR e N_2OR (de salientar que os genes que codificam para as duas primeiras enzimas são regulados pelo *NNR* que responde ao oxigénio e NO; já a N_2OR é regulada pelo *NNR* ou pelo *FnrP* que responde apenas à depleção de oxigénio, não necessitando, neste caso, de uma acumulação de NO para ser expressa)^{[24],[56],[108]} pelo que a enzima redutase do nitrito (NIR ou *cd₁*) é a enzima-chave deste processo^[27].

Para o ensaio a pH 8,5, embora a agitação tenha sido diminuída igualmente às 5 horas de crescimento, verifica-se um atraso em relação aos outros ensaios, tornando-se a desnitrificação ativa entre as 4 e as 5 horas após o início do crescimento, e observando-se um pico máximo de nitrito a cerca das 9 horas. De facto, pela curva de crescimento (Figura 3.1.) também se verifica que a taxa de crescimento é mais lenta.

Pelos perfis de nitrito livre apresentados na Figura 3.2., também se verifica que às 6 horas de crescimento para o ensaio a pH 7,5 e a aproximadamente 10 horas para os ensaios a pHs 6,5 e 8,5 a redutase do nitrito já reduziu todo o nitrito, formado pela redutase do nitrato, a óxido nítrico.

Para além de se quantificar os nitritos no meio de cultura, que estão diretamente relacionados com a atividade das enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito, determinámos também a atividade enzimática da N_2OR , a última enzima da via da desnitrificação. Para tal, para além de determinar a taxa de consumo do N_2O medida indiretamente através da taxa de oxidação do metil-viologénio, teve-se também de quantificar a proteína total, já que as unidades de atividade são determinadas por mg de proteína total. A quantificação de proteína total das amostras recolhidas ao longo do tempo de crescimento (para

os três ensaios realizados aos diferentes valores de pH), foi realizada segundo o método de Lowry, como referido nos Materiais e Métodos (secção 2.2.2.).

3.2.2. Ensaios de atividade da redutase do óxido nitroso

O perfil de atividade da N_2OR ao longo dos três crescimentos, juntamente com o perfil da quantificação de nitritos durante todo o ensaio dos crescimentos efetuados a pH 6,5, 7,5 e 8,5 de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, estão representados na Figura 3.2.

Pela análise da quantificação de nitrito da Figura 3.2., podemos verificar que, em todos os pHs testados, o nitrito que foi formado pela redutase do nitrato (NAR), é completamente reduzido a óxido nítrico pela redutase do nitrito (NIR), uma vez que existe um máximo de nitrito (como referido acima), que descrece para valores perto de zero e não volta a aumentar até ao término dos ensaios. Contudo, este máximo não pode ser considerado como o máximo de nitrato convertido em nitrito, uma vez que a desnitrificação é um processo contínuo e as reações vão ocorrendo em simultâneo, pelo que a primeira e a segunda reação do esquema da Figura 3.3. estão ambas a contribuir para este máximo. Por outras palavras, podemos verificar um máximo de aproximadamente 7 mM, 6 mM e 4 mM de nitrito para os ensaios a pH 6,5, 7,5 e 8,5 respetivamente, contudo, todo o nitrato adicionado ao meio de cultura (10 mM) poderá ter sido convertido a nitrito, uma vez que como não se mediu a quantidade de nitrato no meio, é possível que parte do nitrito formado já tenha sido reduzido a NO pela NIR (cujo gene que a codifica, *nirS*, é induzido pela acumulação de NO e depleção de oxigénio; e em *Pa. denitrificans* verificou-se que às 5 h de crescimento já está a ser transcrito).

Assim, o que podemos afirmar, pela Figura 3.2., é que o equilíbrio das duas primeiras reações da desnitrificação (realizadas pela NAR e NIR), têm uma duração de 8 horas, 4 horas e 5 horas para os ensaios a pH 6,5, 7,5 e 8,5 respetivamente, bem como afirmar que a redutase do nitrato e do nitrito estão presentes nas células.

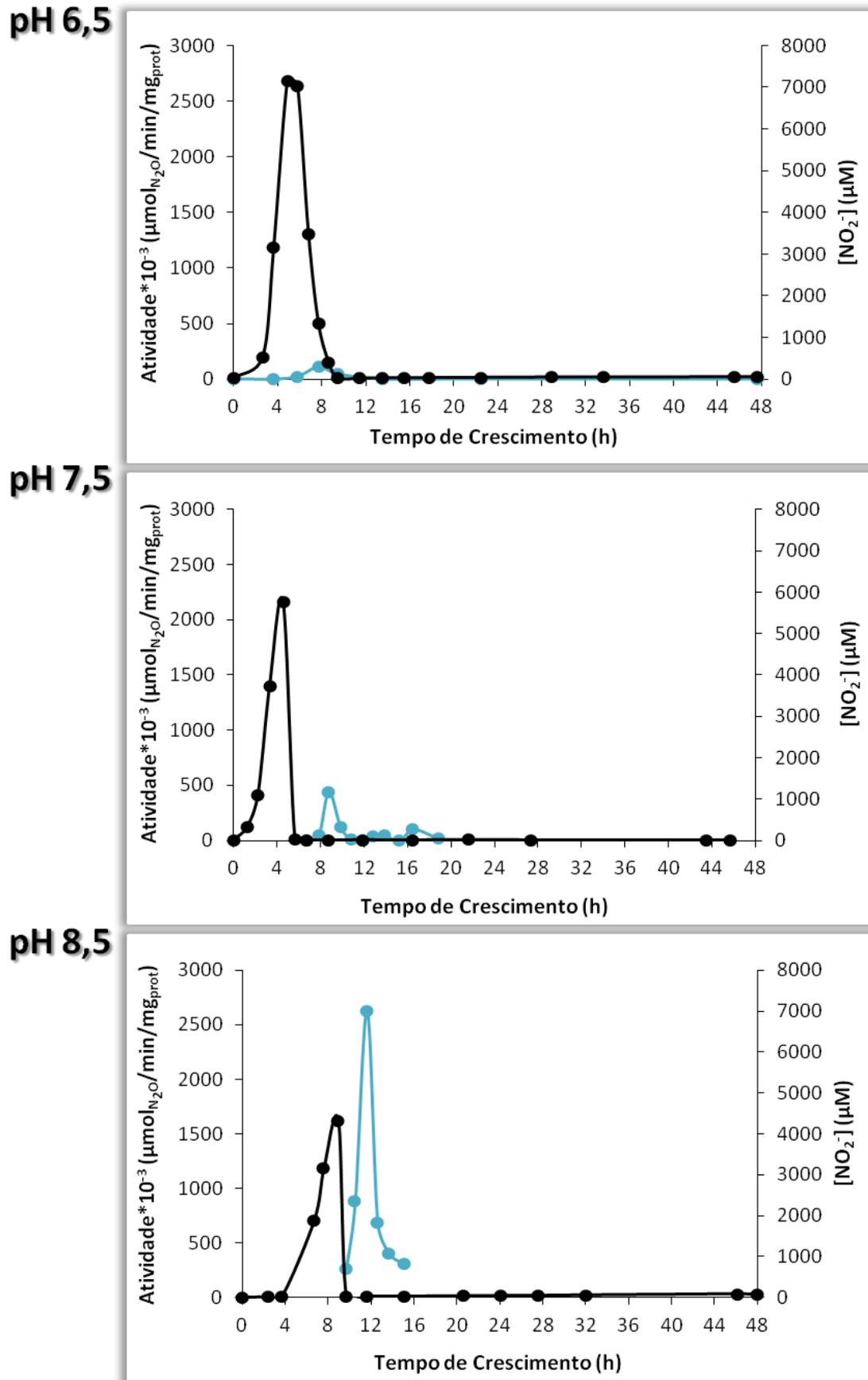


Figura 3.2. Quantificação de nitritos a preto (eixo vertical secundário) e variação da atividade de redução do N₂O a azul (eixo vertical principal), em função do tempo de crescimento a pH 6,5, pH 7,5 e pH 8,5.

Deste último facto, concluímos que a redutase do óxido nitroso também deverá estar presente, uma vez que a acumulação de NO induz os genes *nosZ* (genes que codificam para esta enzima). Assim sendo, faz sentido realizar os ensaios de atividade de redução do N₂O pela redutase do óxido nitroso, deste modo poderá concluir-se que a bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* realizou a desnitrificação completa.



Figura 3.3. Esquema simplificado da desnitrificação. A azul está representado o processo que ocorre no periplasma da bactéria. Nos quadrados encontram-se os elementos que são sucessivamente reduzidos ao elemento que o segue, pelas enzimas indicadas por cima das setas. NO₃⁻ – Nitrato, NO₂⁻ – Nitrito, NO – Óxido Nítrico, N₂O – Óxido Nitroso, N₂ – Azoto Molecular, NAR – Redutase do Nitrato, NIR – Redutase do Nitrito, NOR – Redutase do Óxido Nítrico e N₂OR – Redutase do Óxido Nitroso.

Em todos os crescimentos (Figura 3.2.) observa-se que, após a diminuição da quantidade de nitrito no meio de crescimento, inicia-se, o aumento da atividade de redução do N₂O (realizada pela redutase do óxido nitroso, N₂OR), como era expectável (ver esquema da Figura 3.3.).

De facto, estamos a contabilizar a concentração de nitrito (NO₂⁻) e sabe-se que a transcrição dos genes que codificam para as redutases da desnitrificação é controlada por reguladores transcricionais, os quais respondem a sinais intra- ou extracelulares de oxigénio ou óxidos de azoto, nomeadamente NO e NO₂⁻. Pelo que, se observamos um máximo de NO₂⁻ durante os crescimentos, faz sentido que o gene *nosZ* que codifica para a redutase do óxido nitroso, esteja a ser expresso^[24]. Na realidade, observamos que a enzima foi sintetizada e está ativa, pois temos um máximo de atividade nos perfis da Figura 3.2.

Aliás, segundo um estudo realizado em *Pa. denitrificans* por Bakken e colaboradores^[24], observou-se que o gene que codifica para a N₂OR é expresso antes do que codifica para a própria NIR e NOR, e possivelmente que a NAR, e assim faz sentido que quando a N₂OR reduz o N₂O (ensaios de atividade representados na Figura 3.2.), o nitrito já tenha sido reduzido pela redutase do nitrito, bem como, o óxido nítrico reduzido pela redutase do óxido nítrico. Logo, visto a via da desnitrificação ser um processo sequencial (esquema da Figura 3.3.), a redução do nitrito a óxido nítrico pela NIR (decréscimo do máximo de nitrito na Figura 3.2. linha preta), coincide com o aumento da atividade da N₂OR (Figuras 3.2., linha azul e 3.3.).

É de salientar, ainda, que, comparando todos os crescimentos, o ensaio realizado a pH mais ácido (pH 6,5) apresenta uma menor atividade de redução de N₂O, sendo que o ensaio a pH mais básico (pH 8,5), apresenta a maior atividade específica (ver Tabela 3.II.).

Estes resultados estão de acordo com a literatura e poderão explicar o facto de haver acumulação de N₂O nos solos a pHs ácidos. Uma das hipóteses para este facto será a não funcionalidade da N₂OR e, não necessariamente, devido à transcrição dos genes *nosZ*. De facto, mesmo que ocorra uma fraca transcrição de *nosZ* (como reportado por^{[106],[107]}), este gene estará a ser transcrito e, portanto, a N₂OR deverá estar presente nas células, mas poderá não estar ativa (Figura 3.2.), pelo que a menor atividade estará relacionada com uma menor quantidade de N₂OR nas células, que se deve não ao menor nível transcricional do gene que codifica esta enzima mas ao nível da sua pos-tradução, como por exemplo a introdução dos centros de cobre (de facto, Dell'Acqua e colaboradores mostraram que o pH baixo não influencia a atividade e por comparação com *Paracoccus* a transcrição não parece estar afetada.). Assim, haverá uma menor quantidade de enzima funcional que se traduz numa menor atividade enzimática (é de referir que os ensaios foram todos realizados ao pH ótimo da enzima, pH 7,6). O facto de se ter observado uma menor atividade enzimática da N₂OR a pH mais baixo, poderá explicar porque é que há libertação de N₂O de solos acídicos (salienta-se que o pH do periplasma deverá ser semelhante ao externo, por estarmos a lidar com bactérias Gram-negativas).

Por outro lado, a maior atividade observada a pH 8,5, pode também estar relacionada com o pH do ambiente em que esta bactéria se encontra (mar), sendo que o pH do mar é levemente alcalino, aproximadamente 8,2.

Tabela 3.II. Tabela resumo dos máximos de atividade obtidos para crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a diferentes pHs (6,5, 7,5 e 8,5), em condições microaerófilas e na presença de nitrato.

| CRESCIMENTO | ATIVIDADE ESPECÍFICA _{MÁX.} *10 ⁻³ (μmol _{N2O} /min/mg _{prot}) | | [NITRITO] (mM) | |
|-------------|---|--------------------------|------------------|----------------------|
| | METIL-VIOLOGÉNIO (DE) | TEMPO DE CRESCIMENTO (h) | MÁXIMO OBSERVADO | HORAS DE CRESCIMENTO |
| pH 6,5 | 111 | 8 | 7,2 | 5 |
| pH 7,5 | 441 | 9 | 5,8 | 5 |
| pH 8,5 | 2632 | 12 | 4,3 | 9 |

DE – Doador de Eletrões.

Assim, teria sido interessante isolar a enzima de crescimentos efetuados a estes dois valores de pH (6,5 e 8,5) para se comparar as propriedades espetroscópicas e bioquímicas da enzima. No entanto, devido a impossibilidades do uso do biofermentador de 10 L, não foi

possível obter massa celular suficiente para esse fim. Deste modo, procedeu-se ao estudo da enzima, mas apenas a pH 7,5, de dois crescimentos em condições distintas: microaerófilas ou anaeróbias estritas, ambos na presença de nitrato.

3.3. Purificação da redutase do óxido nitroso e do seu parceiro redox fisiológico, citocromo c_{552}

A segunda parte do trabalho consistiu na purificação da N_2OR e do citocromo c_{552} , o seu doador de eletrões fisiológico, a partir de massa celular que foi obtida dos crescimentos realizados em biofermentador de 10 L, em condições microaerófilas e na presença de nitrato (exatamente as mesmas condições utilizadas nos crescimentos acima discutidos), a pH 7,5. A purificação foi efetuada de massa celular obtida da fase estacionária, às 45 horas de crescimento (fase do crescimento que apresentava cerca de 0,024 mM de nitrito e uma atividade específica de aproximadamente $0,165 \mu\text{mol}_{N_2O}/\text{min}/\text{mg}_{\text{prot}}$, ver Anexo VI). Utilizaram-se, também, as células obtidas de crescimento em condições anaeróbias estritas desnitrificantes (crescimento realizado por colaboradores em Marselha, em biofermentador de 300 L), de forma a determinar se a forma redox da N_2OR é idêntica ou se depende das condições de crescimento da bactéria.

3.3.1. Confirmação da expressão das enzimas da desnitrificação

Antes de iniciar o processo de purificação, verificou-se se o extrato periplasmático continha redutase do nitrito ou citocromo cd_1 , o que indica que as enzimas da via da desnitrificação foram sintetizadas. De facto, a redutase do nitrito (que se faz acompanhar da enzima em estudo, redutase do óxido nitroso, uma vez que também está localizada no periplasma da bactéria, como referido na secção 1.2.1. da Introdução), é responsável pelo segundo passo da desnitrificação (primeiro passo que ocorre no periplasma), catalisando a redução do nitrito a óxido nítrico. Realmente, a acumulação de NO é responsável pela indução da desnitrificação (por indução dos genes *nosZ* e *nar*), pelo que a enzima redutase do nitrito (NIR ou cd_1) é a enzima-chave deste processo^{[27],[54]}. Uma vez presente no extrato periplasmático, significa que a expressão dos genes que codificam para as enzimas envolvidas no processo de desnitrificação foi, portanto ativada, pelo que é de esperar que a redutase do óxido nitroso, que é a enzima que catalisa o último passo da desnitrificação, redução do óxido nitroso a azoto molecular, também esteja presente.

Deste modo, faz sentido analisar o extrato periplasmático obtido a partir da massa celular de ambos os crescimentos (em condições microaerófilas e anaeróbias estritas, ambos na

presença de nitrato, ver secção 2.3.1., dos Materiais e Métodos), através de um gel SDS-PAGE corado para proteína (Figura 3.4. A.ii e B.ii). Além disso, o citocromo cd_1 tem um hemo do tipo-c, pelo que a sua presença pode ser identificada, também, através de um gel SDS-PAGE corado para conteúdo hémico (como descrito na secção 2.5.3.2., dos Materiais e Métodos), Figura 3.4. A.i e B.i.

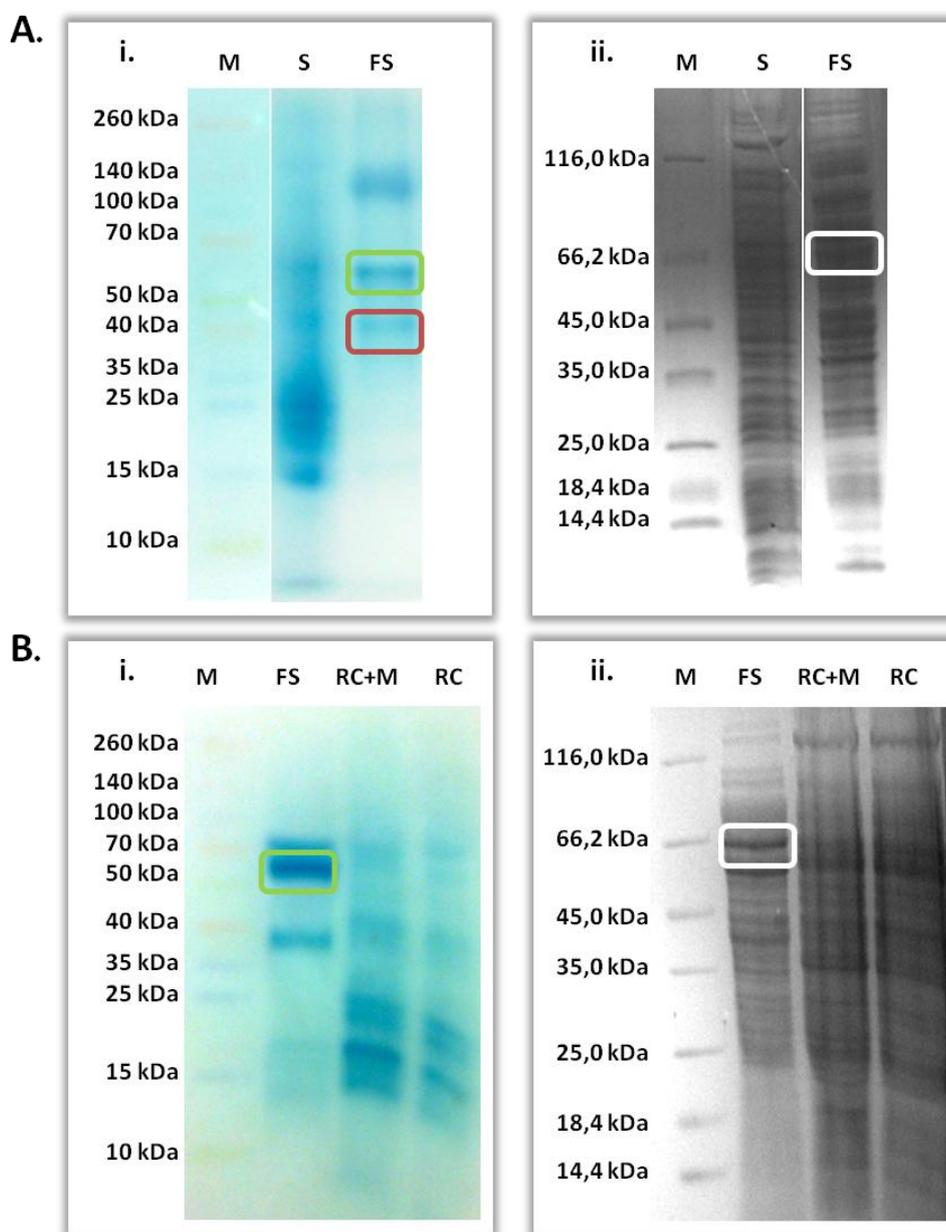


Figura 3.4. Análise do periplasma do crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas e na presença de nitrato (A) e em condições anaeróbias estritas igualmente na presença de nitrato (B). Em i. géis corados para hemos e em ii. géis corados para conteúdo proteico. M – Padrão de massas moleculares, S – Sedimento/Esferoplastos; FS – Fração Solúvel/Periplasma; RC+M – Restos Celulares + Membranas; RC – Restos Celulares. Os retângulos identificam a peroxidase do citocromo *c* (vermelho), citocromo cd_1 (verde) e a possível banda correspondente à redutase do óxido nítrico (branco). Géis desnaturantes de poliacrilamida 12,5% em tampão Tris-Tricina, e eletroforese realizada a 150 V durante 1 hora. Bandas de proteína visualizadas através da coloração com azul de *Coomassie*, e as coradas para conteúdo hémico seguiram os passos descritos nos Materiais e Métodos.

A Figura 3.4. A.i e B.i, mostra a presença da enzima redutase do nitrito (ou citocromo cd_1) e, ainda, a presença da peroxidase do citocromo c (CcP), uma vez que estas enzimas têm uma massa molecular de 60,6 kDa e de 36,5 kDa, respetivamente. Na verdade, em condições microaerófilas, a bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* 617 apresenta a CcP como uma proteína periplasmática de 36,5 kDa. Esta enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a água, tendo como doador fisiológico de eletrões o citocromo c_{552} ^{[108],[109]}. Esta reação protege as células da toxicidade de H_2O_2 ^{[30],[108],[109]}.

A redutase do óxido nitroso, que tem uma massa molecular de 65,0 kDa, como não possui hemos não é visível no gel corado para conteúdo hémico, no entanto, poderá corresponder à proteína indicada no gel corado para conteúdo proteico da Figura 3.4. A.ii e B.ii, a branco. Contudo, esta identificação não poderá ser efetuada de forma inequívoca, já que há outras proteínas no extrato periplasmático com massa molecular semelhante.

Assim, uma vez confirmada a presença de uma das enzimas da desnitrificação no periplasma da bactéria em condições microaerófilas, indica-nos que a bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* pode ser classificada como aeróbia desnitrificante.

Procedeu-se, então, à purificação da N_2OR e do citocromo c_{552} de massa celular em ambas as condições, microaerófilas e anaeróbias estritas.

3.3.2. Purificação da redutase do óxido nitroso do extrato periplasmático obtido de massa celular em condições microaerófilas e na presença de nitrato como aceitador final de eletrões

A purificação da redutase do óxido nitroso do extrato periplasmático de massa celular em condições microaerófilas e na presença de nitrato, obtido como descrito anteriormente (secção 2.3.1.2.1. dos Materiais e Métodos), foi efetuada em duas etapas cromatográficas, como esquematizado na Figura 3.5.

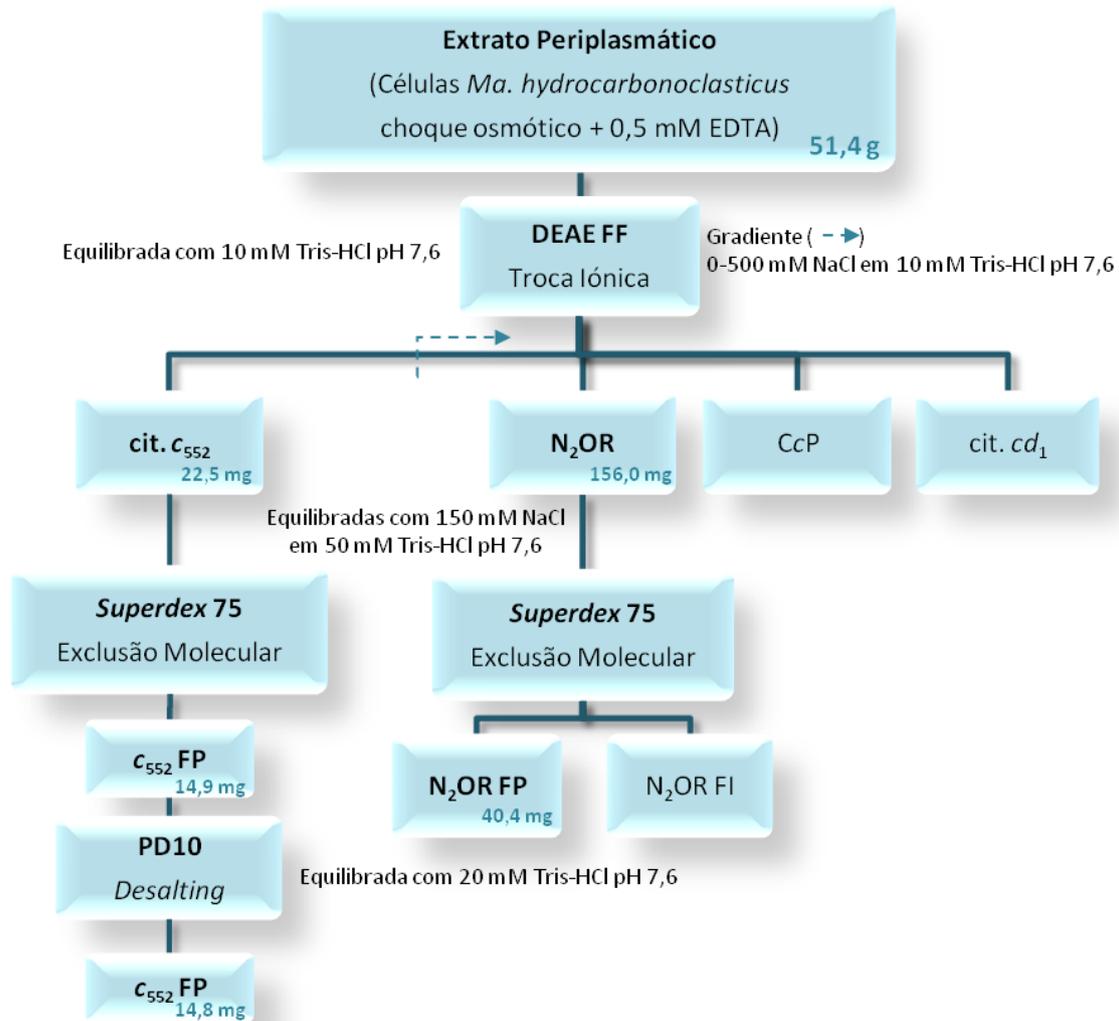


Figura 3.5. Esquema de purificação do extrato periplasmático de massa celular em condições microaerófilas na presença de nitrato, de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 617. Após a primeira coluna (Troca Iônica) foram obtidas 4 frações, sendo a primeira automaticamente eluída, citocromo c_{552} (cit. c_{552}). A proteína em estudo, redutase do óxido nítrico (N_2OR) foi eluída antes da peroxidase do citocromo c (CcP) e depois a redutase do nitrito (cit. cd_1). O segundo passo de purificação, coluna de Exclusão Molecular, foi utilizado, somente, para a fração do cit. c_{552} e N_2OR . Cada fração eluída deu origem a outras duas, uma mais pura (FP) e outra menos pura ou mais impura (FI). A coluna PD10, serviu unicamente para trocar o tampão do citocromo (retirar o excesso de sal). Setas a azul correspondem ao início do gradiente e, os números a azul à massa obtida de cada fração relevante para o estudo efetuado na dissertação.

A primeira etapa da purificação consistiu numa cromatografia de permuta aniônica, tendo-se utilizado como matriz a resina *DEAE Fast Flow* (Figura 3.6.). Esta cromatografia baseia-se na separação das proteínas segundo a sua carga, que sendo uma resina aniônica (com carga positiva), tem afinidade para os aniões e, portanto, as proteínas são eluídas por ordem decrescente do seu ponto isoelétrico (pI). Por outras palavras, é de esperar que as proteínas com pI mais elevado sejam as primeiras a ser eluídas^[110].

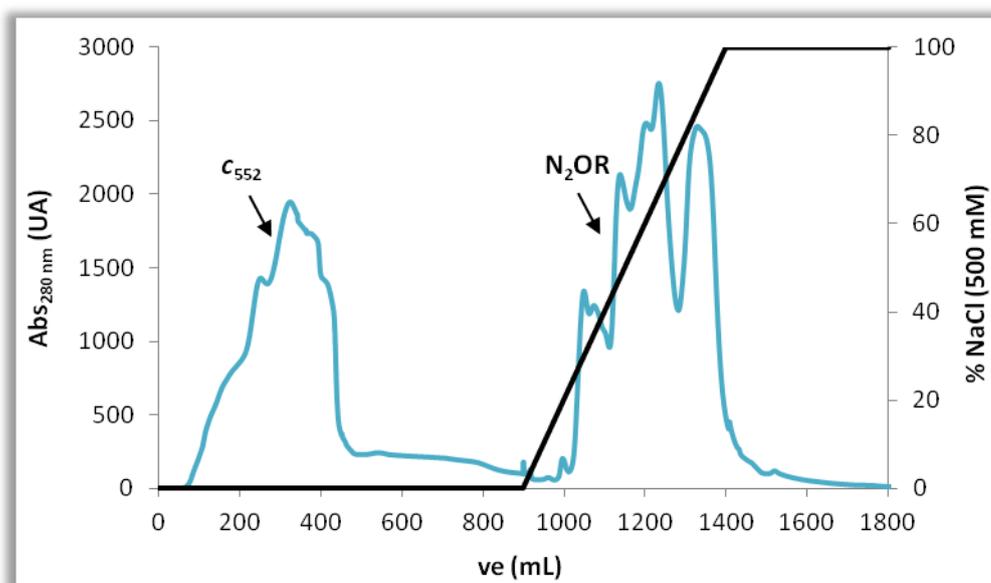


Figura 3.6. Cromatograma da primeira etapa da purificação, cromatografia de permuta aniônica (matriz DEAE FF) do extrato periplasmático proveniente de um crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas e na presença de nitrato. A azul está representada a $Abs_{280\text{ nm}}$ (eixo vertical principal), onde é possível observar a eluição do citocromo c_{552} antes da aplicação do gradiente (Preto), gradiente salino entre 0 – 500 mM NaCl em Tris-HCl 10 mM, pH 7,6. A N_2OR começou a ser eluída a, aproximadamente, 250 mM de NaCl (metade do gradiente).

De modo a eluir as proteínas que ficaram adsorvidas, aumentou-se a força iônica do tampão de eluição, com aplicação de um gradiente (linha preta da Figura 3.6.).

A identificação das proteínas eluídas foi efetuada através de espectros de UV-visível e de eletroforese em condições desnaturantes. Verificou-se que a proteína peroxidase do citocromo c eluiu primeiro que a proteína redutase do nitrito, o que não estava previsto, uma vez que têm um pI de 4,6 e 5,1, respetivamente. Este facto poderá estar relacionado com a diferente distribuição de cargas à superfície das proteínas em questão.

O segundo e último passo da purificação consistiu numa cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel, tendo-se utilizado uma matriz *Superdex 75 pre-packed*, que separa as proteínas de acordo com a sua massa molecular. A fração da redutase do óxido nitroso obtida da primeira coluna cromatográfica (DEAE FF) foi eluída nesta última coluna utilizada no processo de purificação (Figura 3.7.).

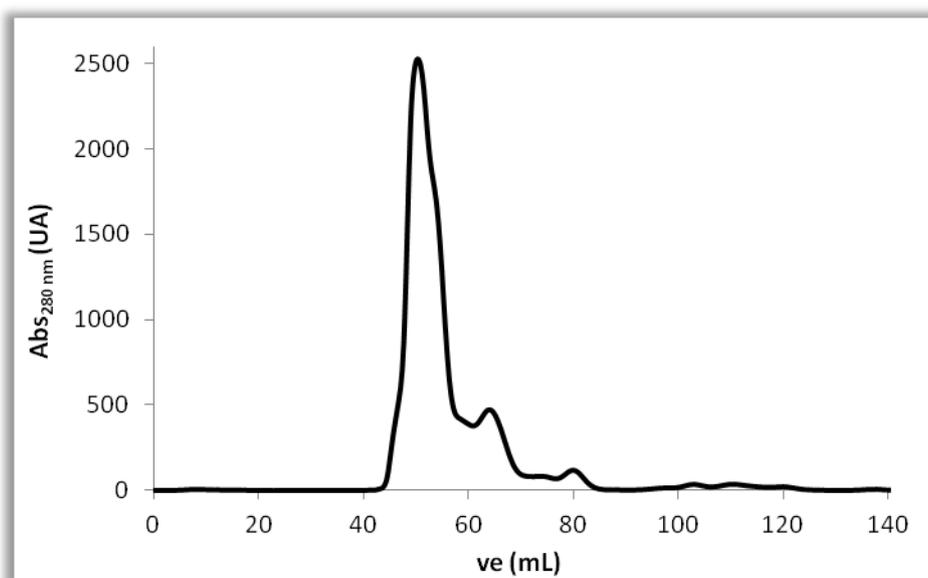


Figura 3.7. Cromatograma da segunda etapa da purificação, cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular (matriz *Superdex 75 pre-packed*) da fração da redutase do óxido nitroso obtida da primeira etapa (DEAE FF). A proteína foi eluída com 150 mM de NaCl em 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6.

A eluição das amostras proteicas das colunas DEAE FF e *Superdex 75* foi monitorizada ao comprimento de onda de 280 nm, ao qual contribuem todas as proteínas^{[110],[111]}.

As frações da redutase do óxido nitroso obtidas ao longo do processo de purificação e com diferentes graus de pureza (cálculo da razão de pureza da fração mais pura, Tabela 3.III.), foram aplicadas num gel de eletroforese em condições desnaturantes (Figura 3.8.).

Tabela 3.III. Razões de pureza da fração final de redutase do óxido nitroso obtida da purificação do extrato periplasmático de massa celular de crescimento em condições microaerófilas na presença de nitrato.

| RAZÕES DE PUREZA | | |
|---------------------------|---|--|
| FRAÇÃO | $Abs_{550\text{ nm}}^I / Abs_{280\text{ nm}}$ | $Abs_{640\text{ nm}}^{II} / Abs_{280\text{ nm}}$ |
| N₂OR FP | 0,06 | 0,03 |

^I Da fração completamente oxidada com ferricianeto

^{II} Da fração reduzida com ditionito

FP – Fração mais pura

Para a N₂OR, na literatura, ainda não está estabelecida uma razão para estimativa da sua pureza, como tal, considerámos as razões da absorvância aos comprimentos de onda apresentadas na Tabela 3.III. Sendo que numa delas estamos a considerar o centro CuZ oxidado (550 nm) no estado [2Cu²⁺-2Cu⁺] e na outra este mesmo centro na forma reduzida (640 nm ou 660 nm), no estado [1Cu²⁺-3Cu⁺] ou seja, quer na forma CuZ* ou CuZ, respetivamente.

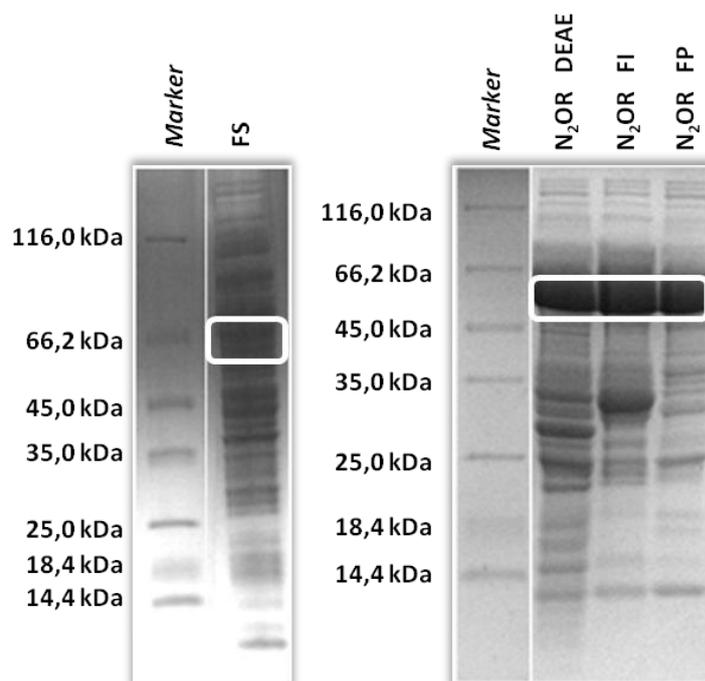


Figura 3.8. Eletroforese da purificação da N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas na presença de nitrato. *Marker* – Padrão de massas moleculares, FS – Fração Solúvel, Retângulo branco diz respeito às bandas da redutase do óxido nitroso. Géis desnaturantes de poliacrilamida 12,5% em tampão Tris-Tricina, e eletroforese realizada a 150 V durante 1 hora. Bandas de proteína visualizadas através de coloração com azul de *Coomassie*, como descrito nos Materiais e Métodos.

A amostra mais pura da redutase do óxido nitroso, foi mantida em azoto líquido sob a forma de esferas, isto porque se sabe que a enzima altera a forma redox dos seus centros metálicos ao sofrer vários ciclos de congelação/descongelação.

3.3.3. Purificação da redutase do óxido nitroso do extrato periplasmático de células obtidas em condições anaeróbias estritas e na presença de nitrato como aceitador final de eletrões

No extrato periplasmático obtido de uma cultura de *Ma. hydrocarbonoclasticus* realizada em condições anaeróbias estritas e usando o nitrato como aceitador final de eletrões, embora a lise da membrana externa (obtida aquando do processo de formação de esferoplastos) tenha sido efetuada do mesmo modo que para o crescimento nas condições anteriormente descritas, as etapas cromatográficas diferiram. Neste caso foram realizadas duas cromatografias aniónicas sucessivas e uma de exclusão molecular, cujos princípios teóricos foram descritos anteriormente. As etapas de purificação encontram-se esquematizados na Figura 3.9.

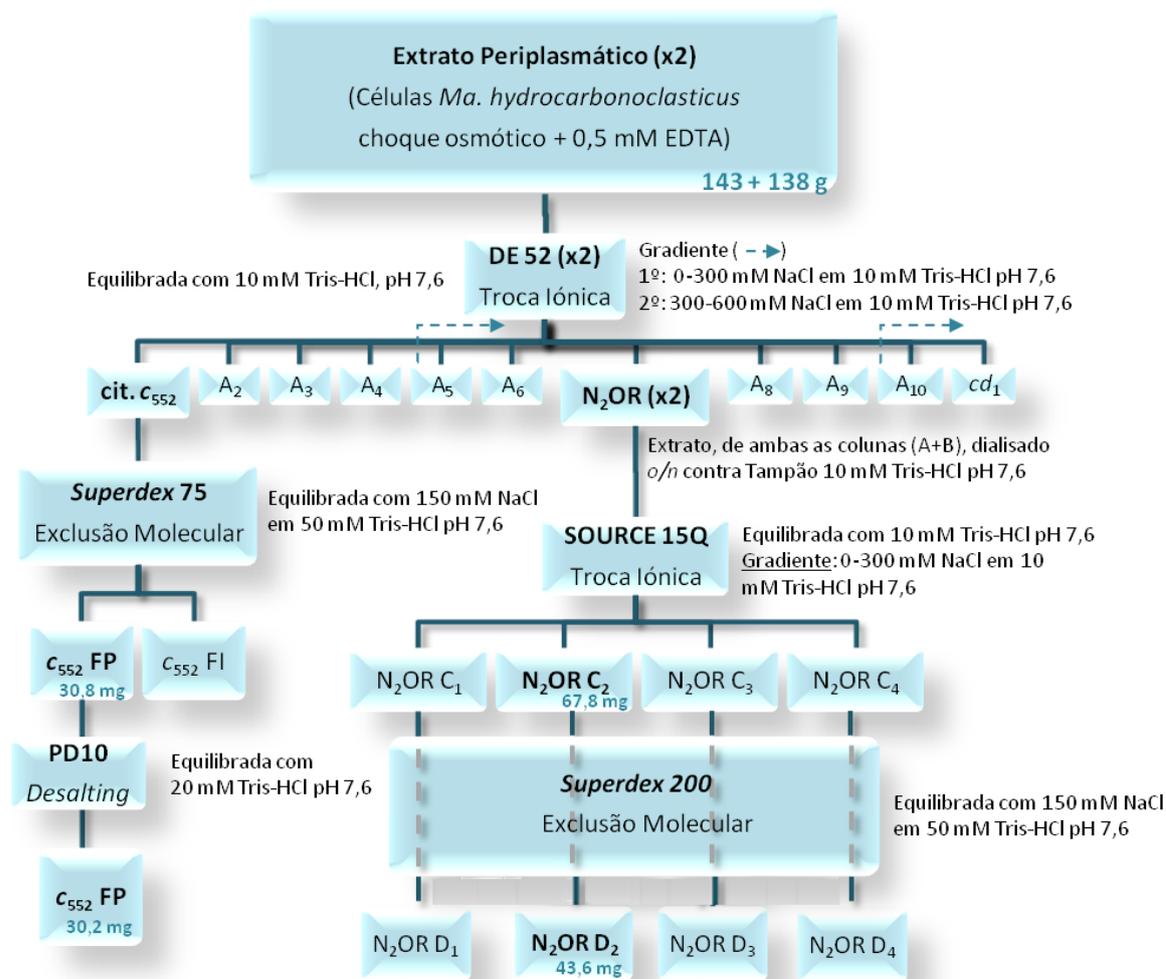


Figura 3.9. Esquema da purificação do extrato periplasmático do crescimento em condições anaeróbias estritas e desnitrificantes, de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 617. Após a primeira coluna (troca iônica) foram obtidas 11 frações, sendo a primeira automaticamente eluída, citocromo *c*₅₅₂ (cit. *c*₅₅₂). O segundo passo de purificação, novamente uma coluna de Troca Iônica, foi utilizado, somente, para a fração da N₂OR. E o último passo cromatográfico, coluna de Exclusão Molecular, foi efetuado para as frações da N₂OR e cit. *c*₅₅₂. A coluna PD10, serviu unicamente para trocar o tampão do citocromo (retirar o excesso de sal). Setas a azul correspondem ao início do gradiente e, os números a azul à massa obtida de cada fração importante para o estudo efetuado na dissertação.

O extrato periplasmático deste crescimento anaeróbico foi dividido, injetado em duas colunas idênticas (A e B) e eluído de igual forma, pelo que se obtiveram duas frações da N₂OR (identificadas adiante como A₇ e B₆). Essas frações foram combinadas, de modo a se continuar a purificação com uma única fração de N₂OR.

O segundo passo de purificação foi, também, uma cromatografia de permuta aniônica, em que se utilizou uma resina *SOURCE 15Q*. Esta resina é utilizada em separações com maior resolução, devido à matriz ser composta por pequenas partículas/esferas que permitem que ocorra uma maior resolução na separação, mesmo quando se utilizam caudais de eluição

elevados^[110]. A fração da redutase do óxido nitroso foi, então eluída nesta coluna da segunda etapa de purificação, obtendo-se o cromatograma apresentado na Figura 3.10.

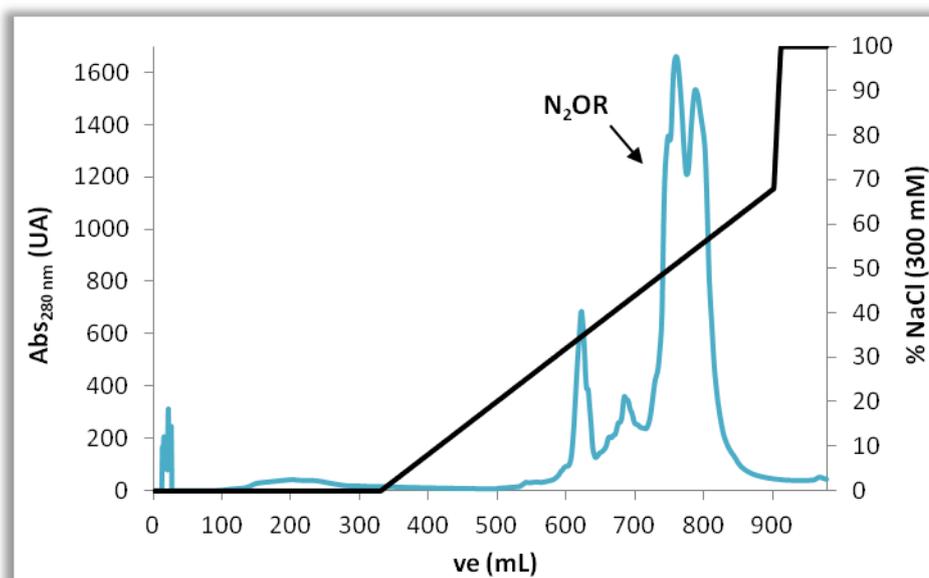


Figura 3.10. Cromatograma da segunda etapa da purificação, cromatografia de permuta aniônica (matriz *SOURCE 15Q*) da fração N_2OR proveniente da primeira etapa de purificação (DE 52) de um crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições anaeróbias estritas e na presença de nitrato. A azul está representada a $Abs_{280\text{ nm}}$ (eixo vertical principal) e gradiente salino (Preto) entre 0 – 300 mM NaCl em Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 (eixo vertical secundário).

O último passo da purificação foi uma cromatografia de exclusão molecular, *Superdex 200* (cromatograma semelhante ao da Figura 3.7.), na qual, foram eluídas as frações C obtidas da segunda etapa de purificação, *SOURCE 15Q* (ver esquema da Figura 3.9.)

No final da purificação fizeram-se quatro frações contendo a redutase do óxido nitroso com vários graus de pureza (Tabela 3.IV.), que também foram analisados através de uma eletroforese em condições desnaturantes (Figura 3.11.).

Tabela 3.IV. Razões de pureza das frações finais de redutase do óxido nitroso obtidas da purificação do extrato periplasmático proveniente de crescimento em condições anaeróbias estritas na presença de nitrato.

| RAZÕES DE PUREZA | | |
|------------------|---|--|
| FRAÇÃO | $Abs_{550\text{ nm}}^I/Abs_{280\text{ nm}}$ | $Abs_{640\text{ nm}}^{II}/Abs_{280\text{ nm}}$ |
| $N_2OR D_1$ | 0,06 | 0,04 |
| $N_2OR D_2$ | 0,07 | 0,04 |
| $N_2OR D_3$ | 0,03 | 0,01 |

^I Da fração completamente oxidada com ferricianeto

^{II} Da fração reduzida com ditionito

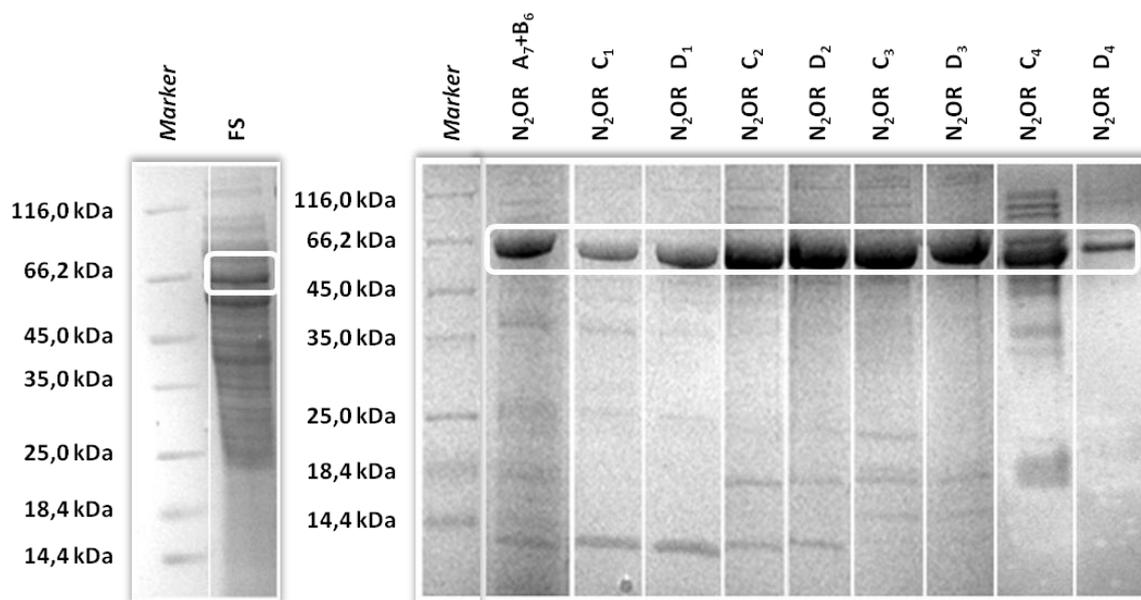


Figura 3.11. Eletroforese em condições desnaturantes das frações obtidas ao longo da purificação da N_2OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições anaeróbias estritas e na presença de nitrato. *Marker* – Padrão de massas moleculares, *FS* – Fração Solúvel, Retângulo branco diz respeito às bandas da redutase do óxido nítrico. Géis desnaturantes de poliacrilamida 12,5% em tampão Tris-Tricina, e eletroforese realizada a 150 V durante 1 hora. Bandas de proteína visualizadas através de coloração com azul de *Coomassie*, como descrito nos Materiais e Métodos.

O perfil eletroforético em condições desnaturantes das frações D da N_2OR mostra que as amostras apresentam poucos contaminantes, sendo o mais visível uma proteína de baixa massa molecular, inferior a 14,4 kDa (Figura 3.11.), que poderá corresponder a uma proteína já observada em purificações anteriores (este contaminante, contudo, não é observado para a fração D_3 , que apresenta contaminantes de baixa massa molecular mas superior a 14,4 kDa). Uma proteína com massa molecular semelhante foi, também, identificada por outros autores através da sequenciação do seu N-terminal, como sendo uma chaperonina Cpn10, pertencente à família das proteínas de choque térmico GroES^[26]. Um contaminante com massa molecular semelhante a este, também se encontra presente na fração da N_2OR FP (Figura 3.8.).

Devido às suas características espectrais, como discutiremos mais à frente (ver 3.5. do presente capítulo), a N_2OR D_2 foi a escolhida para os estudos comparativos com a N_2OR FP, isolada de células obtidas de um crescimento realizado em condições microaerófilas na presença de nitrato como aceitador final de eletrões.

Para além de uma eletroforese em condições desnaturantes foi, também, realizada uma eletroforese em condições nativas das duas frações escolhidas para a caracterização bioquímica e espectral, FP e D_2 (Figura 3.12). Este tipo de eletroforese é efetuada na ausência quer de agentes desnaturantes (SDS) quer redutores (β -mercaptoetanol), pelo que a mobilidade das proteínas depende da razão carga/massa (ver secção 2.5.2. dos Materiais e Métodos).

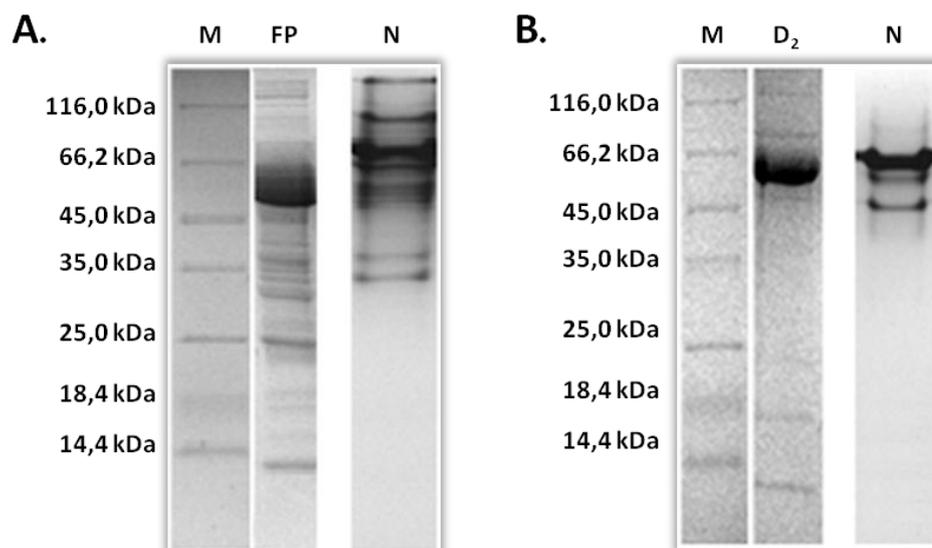


Figura 3.12. Géis desnaturantes e nativos (N) de poliacrilamida 12,5% e 10%, respetivamente, em tampão Tris-Tricina, e eletroforese realizada a 150 V durante 1 hora, das frações da N₂OR FP (A.) e da N₂OR D₂ (B.). Bandas de proteína visualizadas através de coloração com azul de *Coomassie*, como descrito nos Materiais e Métodos. FP – Fração da redutase do óxido nitroso de massa celular em condições microaerófilas, D₂ – Fração da redutase do óxido nitroso de massa celular em condições anaeróbias estritas.

Na eletroforese em condições nativas, Figura 3.12., são observadas outras bandas de diferentes intensidades. Estas bandas devem corresponder a contaminantes presentes na amostra (bandas de menor intensidade) e a diferentes formas redox da enzima (bandas de maior intensidade).

As amostras puras da redutase do óxido nitroso, nomeadamente N₂OR D₁, D₂ e D₃, foram armazenadas em azoto líquido, sob a forma de esferas, tal como a amostra da purificação anterior (N₂OR FP).

Foi, ainda, possível comparar ambas as purificações da enzima N₂OR através da Tabela 3.V., a seguir apresentada.

Para se tornar menos confuso, a partir deste momento a N₂OR FP (de condições microaerófilas) passará a denominar-se N₂OR_{micro} e a N₂OR D₂ (de condições anaeróbias), N₂OR_{ana}.

Tabela 3.V. Tabela de purificação da redutase do óxido nitroso de massa celular obtida em condições microaerófilas e anaeróbias estritas na presença de nitrato como aceitador final de elétrões.

| | N₂OR_{micro} | N₂OR_{ana} |
|--|---|--------------------------------------|
| CRESCIMENTO (L) | 15 | 300 |
| MASSA CELULAR (g) | 51,4 | 281 |
| mg_{N₂OR} TOTAIS ^I | 53,2 | 86,2 |
| mg_{N₂OR} FRAÇÃO MAIS PURA ^I | 40,4 | 43,6 |
| RENDIMENTO (mg_{N₂OR} FRAÇÃO MAIS PURA/L_{meio}) | 2,69 | 0,15 |
| RAZÃO DE PUREZA | Abs _{550 nm} ^{II} /Abs _{280 nm} | 0,06 |
| | Abs _{640 nm} ^{III} /Abs _{280 nm} | 0,03 |

^I Quantidades determinadas utilizando o $\epsilon_{640 \text{ nm}} = 7,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ da forma reduzida com ditionito de sódio

^{II} Da forma completamente oxidada com ferricianeto de potássio

^{III} Da forma reduzida com ditionito de sódio

Na literatura a razão de pureza normalmente utilizada é $\text{Abs}_{280 \text{ nm}}/\text{Abs}_{550 \text{ nm}}$ embora não exista ainda reportado um valor a que se considere a enzima pura, utilizando essa razão podemos verificar que ambas as amostras de N₂OR, de massas celulares obtidas de crescimentos efetuados em condições distintas, possuem uma razão de pureza de aproximadamente 16, mais pura que o reportado para *Ps. stutzeri* (denominada antes como *Ps. perfectomarina*) quer de massa celular obtida em condições anaeróbias (9) quer aeróbias (14)^[74], e mais impura que a enzima isolada de *Achromobacter xylooxidans* (denominada na altura como *Alcaligenes xylooxidans*) que se verificou ser cerca de 25^[83].

Concluimos ainda, que o rendimento do crescimento em condições microaerófilas foi superior ao crescimento em condições anaeróbias estritas, não só na massa celular obtida de ambos os ensaios como na quantidade de enzima que se conseguiu isolar. A N₂OR isolada nestas condições está, no entanto, mais impura pelo que o procedimento de purificação deverá ser modificado, utilizado-se uma cromatografia de filtração em gel *Superdex 200*.

3.3.4. Purificação do citocromo c₅₅₂ do extrato periplasmático de células obtidas em condições microaerófilas e anaeróbias estritas na presença de nitrato como aceitador final de elétrões

Como referido acima, o citocromo c₅₅₂ (parceiro redox fisiológico da N₂OR) também foi purificado das massas celulares obtidas em condições microaerófilas e anaeróbias estritas. Em

ambos os casos, a purificação seguiu os mesmos dois passos cromatográficos (ver esquemas das Figuras 3.5. e 3.9.).

A primeira etapa da purificação consistiu de uma cromatografia de permuta aniônica utilizando como matriz a resina *DEAE Fast Flow* ou DE-52 (coluna de gravidade), caso estejamos a falar da purificação do extrato periplasmático obtido de massa celular em condições microaerófilas ou anaeróbias, respetivamente (Figura 3.6.). O citocromo c_{552} (com uma massa molecular de cerca de 11 kDa), por ter um *pI* próximo de 7, não adsorve a esta resina e é eluído durante a aplicação da amostra (antes da aplicação do gradiente salino, como se pode observar pelo cromatograma da Figura 3.6.).

O último passo da purificação resumiu-se numa cromatografia de exclusão molecular, tendo-se utilizado a resina *Superdex 75*, ver cromatograma da Figura 3.13. a seguir representado, referente à purificação do citocromo a partir de massa celular obtida em condições microaerófilas na presença de nitrato (no caso da purificação de massa celular obtida em condições anaeróbias o cromatograma é idêntico ao apresentado).

Mais uma vez, a eluição do citocromo c_{552} foi monitorizada ao comprimento de onda de 280 nm.

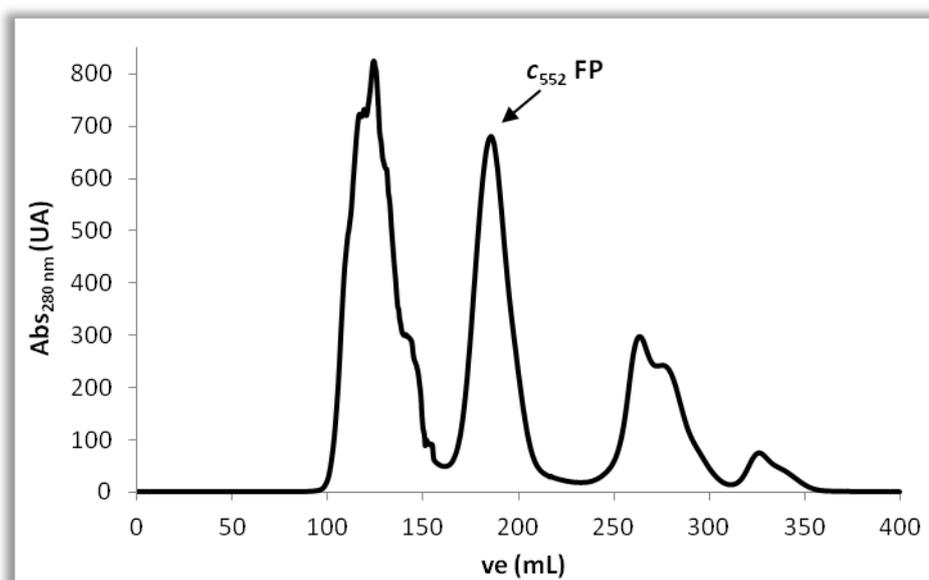


Figura 3.13. Cromatograma da segunda etapa da purificação, cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular (matriz *Superdex 75*) da fração do citocromo c_{552} obtida da primeira etapa (DEAE FF). As proteínas foram eluídas com 150 mM de NaCl em 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6.

O citocromo c_{552} (de ambas as purificações) foi, ainda, eluído numa coluna PD10, também de exclusão molecular, que teve como finalidade trocar o tampão do mesmo (remover o excesso de sal)^[111].

As frações mais puras (Tabela 3.VI.) do citocromo c_{552} obtidas ao longo de ambos os processos de purificação, foram aplicadas num gel de eletroforese em condições desnaturantes (Figura 3.14.).

Tabela 3.VI. Razões de pureza das frações finais do doador de eletrões fisiológico, citocromo c_{552} , da redutase do óxido nítrico, obtidas da purificação do extrato periplasmático de massa celular em condições microaerófilas e anaeróbias, na presença de nitrato.

| | CONDIÇÕES MICROAERÓFILAS | | CONDIÇÕES ANAERÓBIAS ESTRITAS |
|---|--------------------------|--------------|-------------------------------|
| RAZÃO DE PUREZA | c_{552} FP | c_{552} FP | c_{552} FI |
| $Abs_{412\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$ | 5,8 | 6,7 | 5,6 |

FP – Fração mais pura

FI – Fração menos pura

Segundo Saraiva e colaboradores o citocromo c_{552} é considerado puro quando apresenta uma razão ($Abs_{412\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$) de $6,2^{[101]}$, o que nos leva a concluir que o citocromo obtido de ambas as purificações, se encontra praticamente puro. Sendo que, a fração c_{552} FP de massa celular em condições anaeróbias estritas apresenta, mesmo, um elevado grau de pureza, pelo que foi o utilizado para os ensaios de atividade realizados a seguir, em 3.7. do presente capítulo.

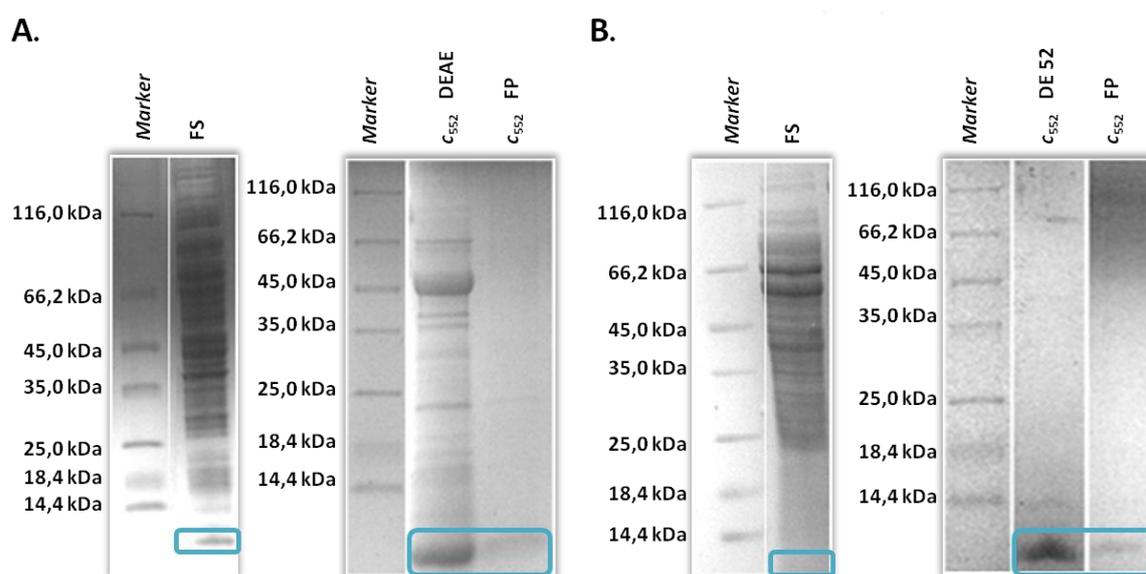


Figura 3.14. Eletroforese em condições desnaturantes das frações obtidas ao longo da purificação do citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas (A.) e anaeróbias estritas (B.), ambos na presença de nitrato. *Marker* – Padrão de massas moleculares, FS – Fração Solúvel, FP – Fração mais Pura, Retângulo azul diz respeito às bandas do citocromo c_{552} . Géis desnaturantes de poliacrilamida 12,5% em tampão Tris-Tricina, e eletroforese realizada a 150 V durante 1 hora. Bandas de proteína visualizadas através de coloração com azul de *Coomassie*, como descrito nos Materiais e Métodos.

Todas as amostras puras do citocromo c_{552} , FP e FI, foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Foi, também, possível comparar ambas as purificações do citocromo c_{552} através da Tabela 3.VII.

Tabela 3.VII. Tabela de purificação do citocromo c_{552} , doador de elétrons fisiológico da redutase do óxido nitroso, de massa celular obtida em condições microaerófilas e anaeróbias estritas na presença de nitrato como aceitador final de elétrons.

| | CONDIÇÕES MICROAERÓFILAS | CONDIÇÕES ANAERÓBIAS |
|--|--------------------------|----------------------|
| | c_{552} FP | |
| CRESCIMENTO (L) | 15 | 300 |
| MASSA CELULAR (g) | 51,4 | 281 |
| mg_{c_{552}} TOTAIS | 14,8 | 33,4 |
| mg_{c_{552}} FRAÇÃO MAIS PURA | 14,8 | 30,2 |
| RENDIMENTO (mg_{proteína}/L_{meio}) | 1,0 | 0,1 |
| RAZÃO DE PUREZA (Abs_{412 nm}/Abs_{280 nm}) | 5,8 | 6,7 |

¹Quantidades determinadas utilizando o $\epsilon_{552 \text{ nm}} = 19,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ da forma reduzida com ditionito de sódio

mg_{TOTAIS} – todas as frações que contêm citocromo (FP + FI)

FP – Fração mais pura; FI – Fração menos pura

Pelas razões de pureza, e sabendo que segundo a literatura o citocromo está puro aquando de uma razão de 6,2, e como já referido anteriormente, o citocromo obtido de massa celular de condições anaeróbias estritas apresenta uma razão de pureza superior ao citocromo de massa celular de condições microaerófilas.

Do mesmo modo que para a N_2OR , isolou-se maior quantidade de citocromo c_{552} de massa celular obtida em condições microaerófilas.

3.3.4.1. Citocromo c_{552}

O citocromo c_{552} , doador de elétrons fisiológico da N_2OR , foi purificado anteriormente, quer de um crescimento em condições microaerófilas, quer em condições anaeróbias estritas (ambos usando o nitrato como aceitador final de elétrons). Contudo, como já referido, para os estudos que se seguem, nomeadamente para os ensaios de atividade enzimática, utilizámos apenas o citocromo c_{552} proveniente de condições anaeróbias estritas (c_{552} FP), que possuía maior razão de pureza (embora ambos os citocromos possuíssem elevado grau de pureza, Tabela 3.VI.).

Os espectros de UV-visível do citocromo c_{552} FP como isolado e após redução com ditionito de sódio estão apresentados na Figura 3.15.

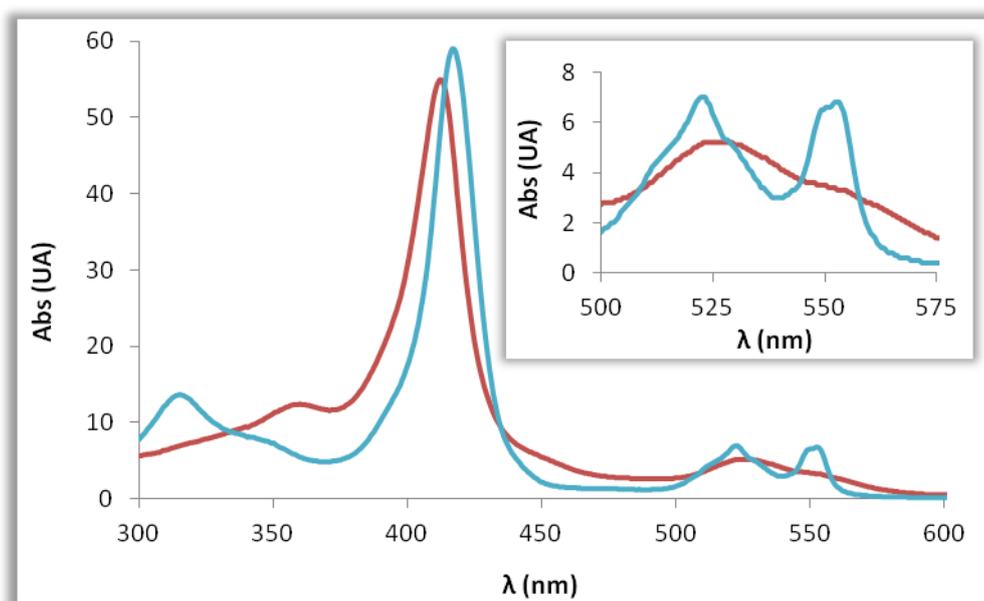


Figura 3.15. Espectros de visível entre 300 e 600 nm do citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em tampão Tris-HCl 10 mM, pH=7,6, isolado a partir de massa celular obtida em condições anaeróbicas estritas. Vermelho – c_{552} como isolado e Azul – c_{552} reduzido com ditionito de sódio. Citocromo c_{552} com uma concentração de 352 μM . No canto superior direito, encontram-se uma ampliação dos espectros na região entre 500 e 575 nm.

Através dos espectros de absorção apresentados na Figura 3.15, foi possível calcular a concentração do citocromo c_{552} , 352 μM ($\epsilon = 19,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 552 nm da forma reduzida), bem como a razão de pureza que este apresentava no final da purificação, obtendo-se um valor de 6,7 como já apresentado na Tabela 3.VI.

3.4. Determinação da massa molecular da redutase do óxido nitroso

De modo a determinar a massa molecular das frações da $\text{N}_2\text{OR}_{\text{micro}}$ e $\text{N}_2\text{OR}_{\text{ana}}$, em solução, realizou-se uma cromatografia de filtração em gel, utilizando uma coluna *Superdex*TM 200, bem como várias proteínas de massas moleculares conhecidas, como descrito nos Materiais e Métodos, secção 2.6.2. A Figura 3.16. ilustra o cromatograma obtido aquando da eluição das proteínas padrão e da redutase do óxido nitroso, a azul e verde, N_2OR de massa celular em condições microaerófilas ($\text{N}_2\text{OR}_{\text{micro}}$) e massa celular em condições anaeróbicas estritas ($\text{N}_2\text{OR}_{\text{ana}}$), respetivamente.

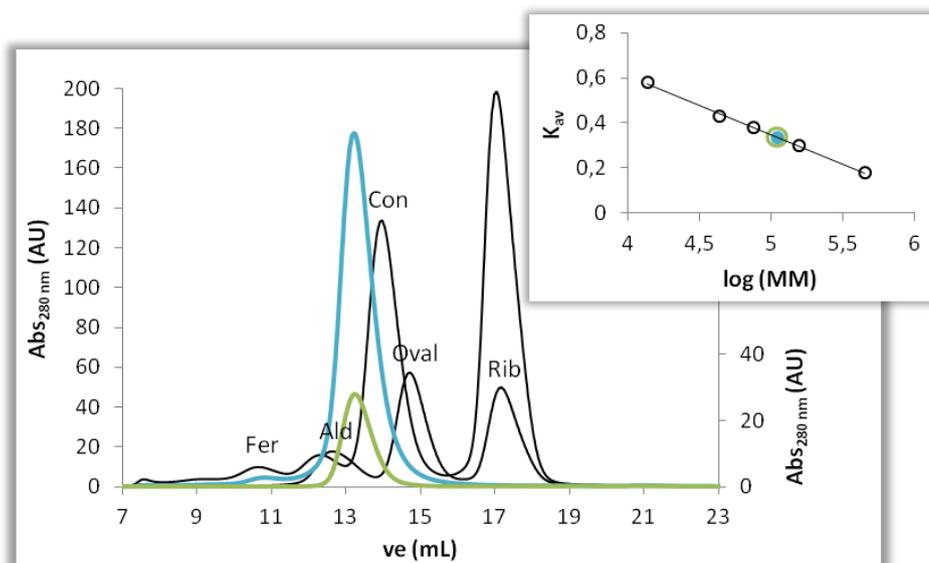


Figura 3.16. Cromatograma obtido para curva de calibração da cromatografia de exclusão molecular. No cromatograma estão representadas a preto as proteínas padrão correspondentes ao eixo vertical principal (lado esquerdo), a N_2OR_{micro} a azul e a N_2OR_{ana} a verde, que dizem respeito ao eixo vertical secundário (lado direito), numa coluna *Superdex™ 200*. Fer – Ferritina, Ald – Aldolase, Con – Conalbumina, Oval – Ovalbumina e Rib – Ribonuclease A. No canto superior direito encontra-se a reta de calibração, k_{av} (V_0 : 7,74 mL e V_t : 24 mL), em função do logaritmo das massas moleculares. Círculos sem preenchimento pretas – Padrões, Círculo azul – N_2OR_{micro} , Círculo sem preenchimento verde – N_2OR_{ana} . A equação da reta de calibração é dada por $K_{av} = -0,2619 \cdot \log(MM) + 1,657$, com um $R^2 = 0,9969$.

A massa molecular da N_2OR foi determinada através da representação do K_{av} em função do logaritmo da massa molecular das proteínas padrão, como explicado na secção 2.6.2. dos Materiais e Métodos. Através da equação da reta de calibração, representada no canto superior direito da Figura 3.16., pode-se determinar a massa molecular aparente das redutases do óxido nitroso. O valor obtido foi de 111 ± 10 kDa e 110 ± 10 kDa, para a redutase do óxido nitroso proveniente de massa celular em condições microaerófilas na presença de nitrato (N_2OR_{micro}) e de massa celular anaeróbia estrita igualmente na presença de nitrato (N_2OR_{ana}), respetivamente. Tendo em conta que a massa molecular teórica do monómero é de 65 kDa (*Protparam*), podemos afirmar que as proteínas deverão estar como dímero em solução. Apresenta, por isso, estrutura quaternária. A diferença observada entre 130 kDa (2×65 kDa) e os valores obtidos, de 111 ± 10 kDa e 110 ± 10 kDa, pode ser explicada pelos erros inerentes a esta determinação.

3.5. Espectroscopia UV-visível da redutase do óxido nitroso

As duas frações de redutase do óxido nitroso purificadas anteriormente, a partir da massa celular obtida em condições microaerófilas (N_2OR_{micro}) ou anaeróbias estritas (N_2OR_{ana}), foram analisadas por espectroscopia de UV-visível (Figura 3.17.).

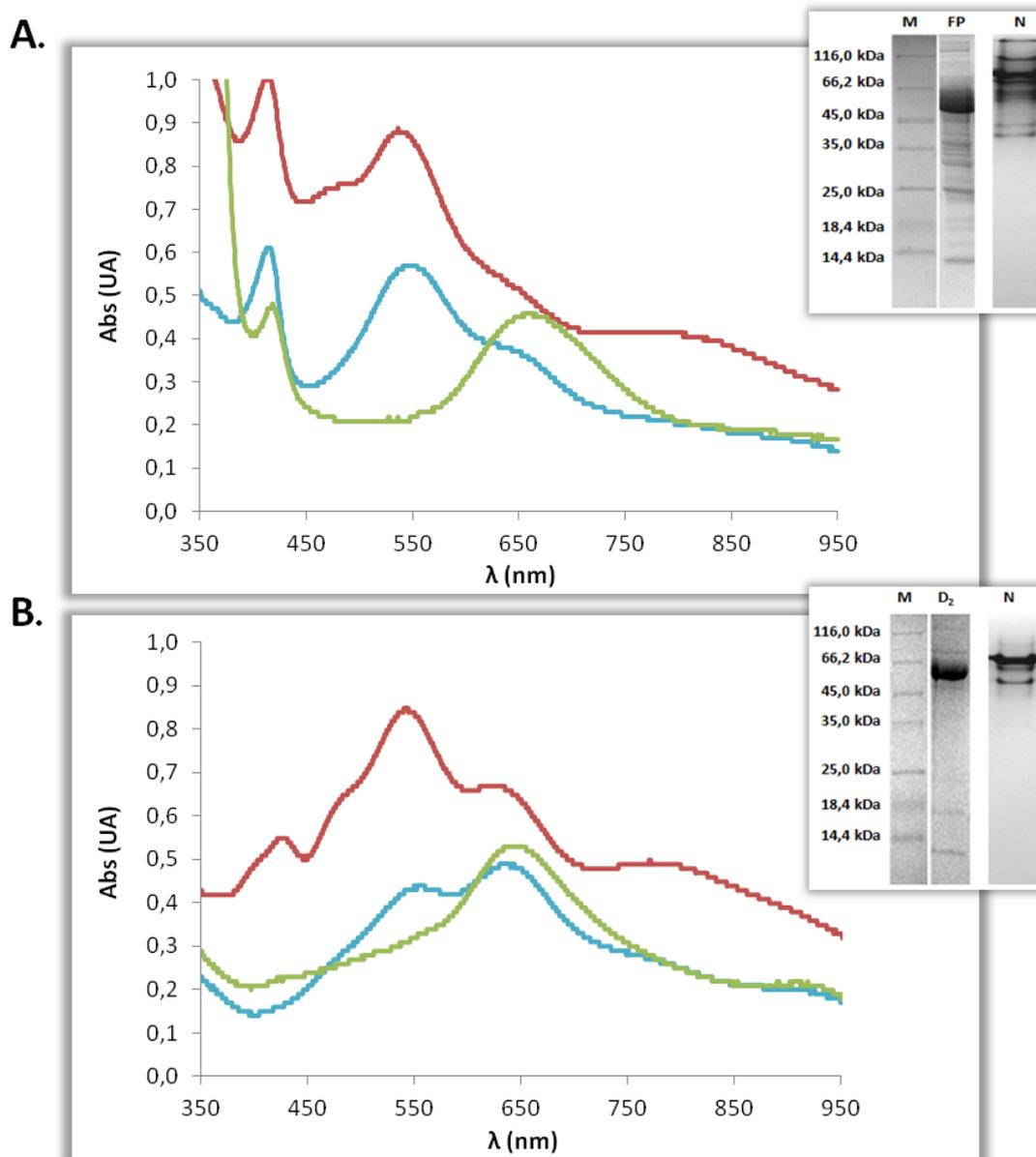


Figura 3.17. Espectros de visível entre 350 e 950 nm da redutase do óxido nítrico em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, isolada a partir de um crescimento em condições microaerófilas na presença de nitrato (A) e condições anaeróbias estritas na presença de nitrato (B). Azul – N_2OR como foi purificada, Vermelho – N_2OR oxidada com ferricianeto de potássio, e Verde – N_2OR reduzida com ditionito de sódio. A redutase do óxido nítrico em (A) tinha uma concentração de 65 μM e em (B) de 75 μM . No canto superior direito encontram-se os géis de poliacrilamida em condições desnaturantes e condições nativas da enzima. M – Padrão de massas moleculares, D_2 – Proteína N_2OR_{ana} , FP – Proteína N_2OR_{micro} e N – Gel nativo. As eletroforeses em gel de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes e 10% em condições nativas em tampão Tris-Tricina, foram realizadas durante 1 hora a 150 V. Os géis foram corados com azul de *Coomassie*, como descrito nos Materiais e Métodos.

Como referido anteriormente, aquando da realização de géis de poliacrilamida referentes às amostras de ambas as purificações efetuadas (N_2OR_{micro} e N_2OR_{ana}), na eletroforese em condições nativas são observadas outras bandas de diferentes intensidades. Bandas estas que devem corresponder a diferentes formas redox da enzima ou a contaminantes presentes na amostra.

Em ambas as frações a enzima encontra-se maioritariamente reduzida, uma vez que, quando se adiciona ferricianeto, se observa um aumento da absorvância aos comprimentos de onda característicos do centro CuA (ver Figura 3.17.). Contudo, o centro CuA contribui com bandas de absorção a 480, 540 e 800 nm^{[29],[75]}, pelo que se pode observar que a fração da N₂OR_{ana} (de condições anaeróbias estritas) tem o centro CuA apenas parcialmente reduzido, uma vez que, através do espetro da Figura 3.17. B., se consegue visualizar uma banda de absorção ténue a aproximadamente 480 e 800 nm, logo concluímos que esta fração possui o centro CuA parcialmente oxidado.

As bandas de absorção observadas no espetro da amostra isolada de massa celular obtida em condições microaerófilas têm um máximo a, aproximadamente, 550 nm e uma banda larga ao comprimento de onda de 640 nm. Estas bandas são características do centro CuZ oxidado, como descrito na Introdução^{[75],[83]-[86]}, pelo que a enzima apresentada no espetro da Figura 3.17. A., se encontra com o centro CuA maioritariamente na forma [Cu⁺-Cu⁺] e o centro CuZ na forma [2Cu²⁺-2Cu⁺]. No caso da enzima isolada de massa celular em condições anaeróbias estritas, Figura 3.17. B., o espetro de absorção mostra que o centro CuA se encontra, parcialmente, na forma [Cu⁺-Cu⁺] e o centro CuZ como uma mistura dos estados CuZ e CuZ*, apresentando dois máximos de absorção, um ao comprimento de onda de 550 nm e outro a um comprimento de onda de 640 nm, sendo este último característico do centro CuZ* na forma [1Cu²⁺-3Cu⁺]. De facto, segundo a literatura, qualquer que seja a condição de isolamento da N₂OR, o estado redox do centro CuZ é uma mistura de CuZ e CuZ*^{[26],[66],[67],[73]}.

Nos espetros da Figura 3.17., a forma completamente oxidada da N₂OR_{micro} e N₂OR_{ana} tem uma razão de absorvância a 550 nm/640 nm (da forma completamente oxidada com ferricianeto de potássio) de 1,7 (60% CuZ e 40% de CuZ*) e 1,3 (20% CuZ e 80% CuZ*, uma vez que uma razão de 1,7 corresponde a 60% de CuZ e 1,1 a 0%^[75]), respetivamente. Quanto mais baixa for esta razão, significa que a enzima tem maior contribuição do centro CuZ no estado CuZ*, uma vez que na forma oxidada ao comprimento de onda de 550 nm contribuem os centros CuA e CuZ e a 640 nm o centro CuZ na forma de CuZ*. Pelo que no espetro apresentado na Figura 3.17. A. (condições microaerófilas), observamos uma maior contribuição de CuZ comparativamente a CuZ*; já no caso da enzima isolada a partir de um crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições anaeróbias, Figura 3.17. B., esta possui uma maior contribuição do centro CuZ no estado redox inativo, CuZ*. Estes valores estão de acordo com o reportado por Dell'Acqua *et al.* (2012), em que a N₂OR isolada de massa celular obtida de condições microaerófilas apresentava uma razão de cerca de 1,7 (60% CuZ), e por Prudêncio *et*

al. (2000), em que a N₂OR isolada de massa celular de condições anaeróbias estritas apresentava uma razão de aproximadamente 1,1 (100% CuZ*)^{[26],[75]}.

É de salientar que, segundo a literatura, a enzima é mais rica em CuZ do que CuZ* aquando do seu isolamento na ausência de oxigénio^{[73],[74],[83]}. No entanto, observamos, tal como reportado por Prudêncio e colaboradores^[26], que a enzima isolada de um crescimento em condições anaeróbias estritas possuía maior contribuição de CuZ* do que o observado para a enzima isolada de uma fermentação realizada em condições microaerófilas (presença de quantidades mínimas de oxigénio). Portanto, a proporção de CuZ/CuZ* não deverá ser consequência do procedimento usado no isolamento da enzima (ambas isoladas na presença de oxigénio) mas de outro fator, que também não será as condições de crescimento.

No espectro da enzima isolada em condições microaerófilas (N₂OR_{micro}) Figura 3.17. A., com a redução pelo ditionito também se observa o estado [1Cu²⁺-3Cu⁺], semelhante ao da forma redox inativa, CuZ*. Contudo, o seu comportamento espectroscópico é distinto, uma vez que o máximo de absorção sofre um desvio de um comprimento de onda de 640 nm para, aproximadamente, 660 nm (comprimento de onda observado para o centro CuZ aquando da sua redução, em *Ma. hydrocarbonoclasticus*^[77]), tal como verificado pelos espectros da Figura 3.17. Já no caso da N₂OR_{ana} aquando da redução da enzima com ditionito de sódio (através do qual se consegue obter o centro CuZ na forma [1Cu²⁺-3Cu⁺]), observa-se o desaparecimento da banda de absorção ao comprimento de onda de 550 nm e o máximo de absorção a 640 nm sofre um ligeiro aumento, não se observando qualquer desvio para comprimentos de onda superiores (características espectrais da forma CuZ*).

Comparando ainda os espectros reduzidos de ambas as enzimas, Figura 3.17. (linha verde), observa-se que, no caso da enzima com maior contribuição de CuZ, o espectro reduzido apresenta uma banda de absorção a 660 nm mais alargada, comparativamente ao observado para a enzima isolada de condições anaeróbias com banda de absorção a 640 nm (maior contribuição de CuZ*). Estes factos estão de acordo com os resultados reportados por Dell'Acqua *et al.*, (2012)^[77] e Prudêncio *et al.*, (2000)^[26], obtendo-se também máximos de absorção idênticos, a 640 nm para a enzima com maior contribuição de CuZ* (Prudêncio e colaboradores) e aproximadamente 660 nm para a enzima com maior contribuição de CuZ (Dell'Acqua e colaboradores), contudo esta enzima foi obtida de massa celular em condições anaeróbias muito idêntica à de massa celular em condições microaerófilas (banda de absorção máxima a 655 nm), à parte que a nossa com maior contribuição de CuZ foi obtida de massa celular em condições microaerófilas.

De salientar que a forma do espectro de absorção da redutase do óxido nitroso isolada de um crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas (N_2OR_{micro}) é mais semelhante ao da enzima isolada de *Paracoccus pantotrophus* (anaeróbia)^[73] e de *Achromobacter xylosoxidans* (Anexo VII), por comparação com o obtido a partir de N_2OR isolada de um crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições anaeróbias (N_2OR_{ana}) na presença de nitrato.

Para a realização dos ensaios de atividade com 5 horas de incubação discutidos adiante, em 3.7. do presente capítulo, foram também realizados espectros de visível para as amostras após *desalting* (N_2OR ativada), como ilustra a Figura 3.18.

Através dos espectros após a ativação da N_2OR (representados na Figura 3.18.), podemos observar que mesmo com ativação da enzima por 5 horas de incubação com metil-viologénio reduzido, não se obteve, para ambos os casos, a forma super reduzida ($[4Cu^+]$). Verificando-se mesmo, que no caso da N_2OR_{ana} (Figura 3.18. B.) o centro CuA parece estar parcialmente oxidado, ligeira banda de absorção a aproximadamente 540 nm. Neste mesmo espectro parece ter ocorrido perda de CuZ, uma vez que a banda de absorção a aproximadamente 640 nm no espectro re-oxidado (após ativação da enzima com incubação prolongada de 5 h e *desalting*) se tornou menos intensa (comparação com espectro antes do *desalting*, linha vermelha, canto superior direito da Figura 3.18. B.). Embora a razão $Abs_{550\text{ nm}}/Abs_{640\text{ nm}}$ seja a mesma (1,3) esta amostra parece estar contaminada com metil-viologénio que contribuirá com valores de absorvância a aproximadamente 600 nm, pelo que o valor desta razão não será muito viável.

Observa-se, ainda que no espectro da N_2OR_{micro} (Figura 3.18. A.) parece ter havido transformação de CuZ em CuZ* por comparação com o espectro oxidado antes do *desalting* (canto superior direito da Figura 3.18. A.), pela banda de absorção a aproximadamente 640 nm parecer mais nítida no espectro re-oxidado (linha roxo escuro da Figura 3.18. A.). De facto a razão de $Abs_{550\text{ nm}}/Abs_{640\text{ nm}}$ decresceu de 1,7 para 1,2, ou seja, 60% de CuZ para aproximadamente 10% (maior contribuição do centro CuZ na forma de CuZ*).

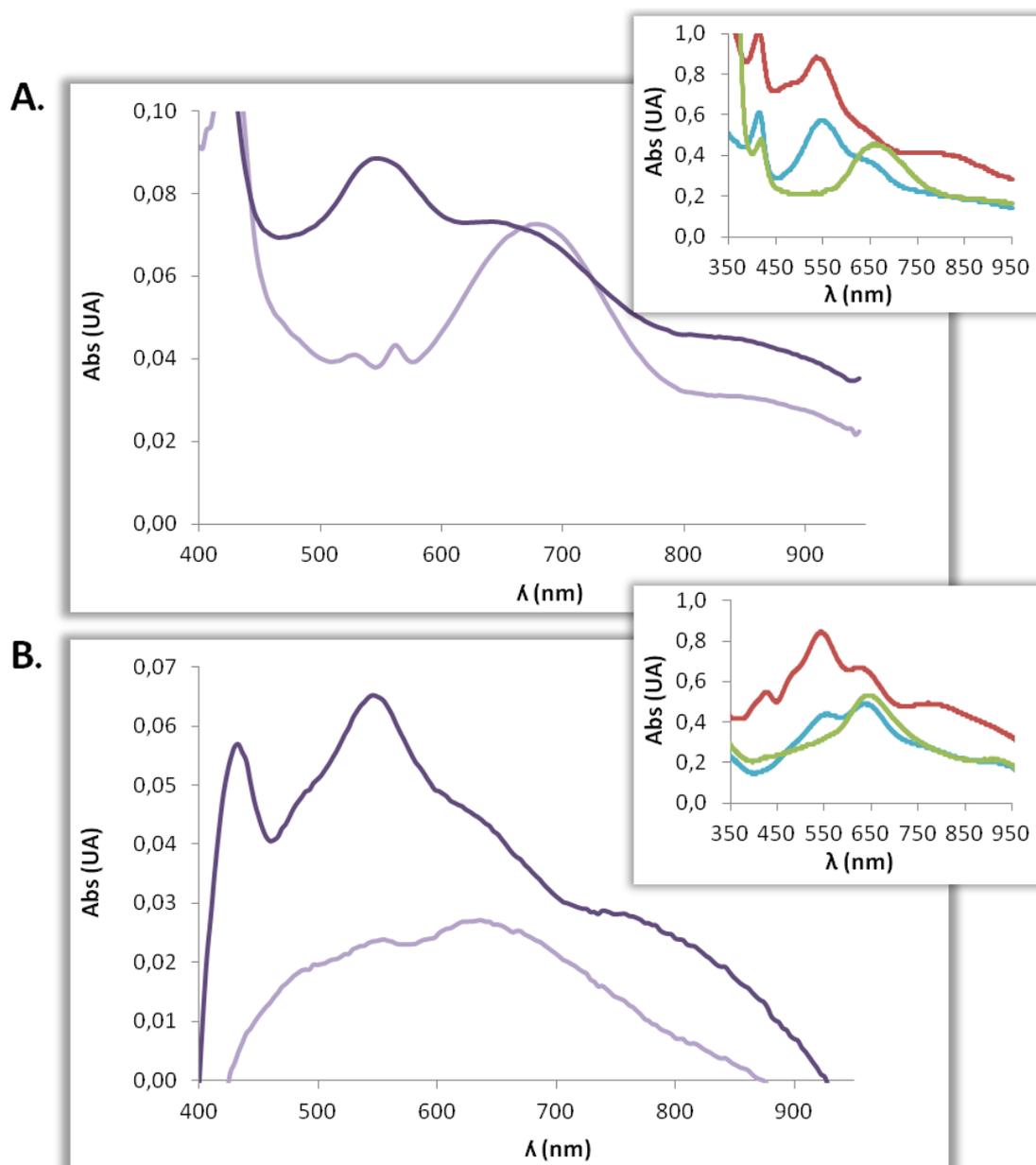


Figura 3.18. Espectros de visível entre 400 e 950 nm da redutase do óxido nítrico em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, isolada a partir de um crescimento em condições microaerófilas na presença de nitrato (A) e condições anaeróbias estritas na presença de nitrato (B) após ativação da enzima durante 5 horas e posterior *desalting* numa coluna NAP-5 *Sephadex*[™] G25. Roxo Claro – N₂OR após eluição na NAP-5, Roxo Escuro – N₂OR após eluição na NAP-5 oxidada com ferricianeto de potássio. A redutase do óxido nítrico em (A) tinha uma concentração de 10 μ M e em (B) de 4 μ M. No canto superior direito encontram-se os espectros de visível entre 350 e 950 nm da redutase do óxido nítrico em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, e condições anaeróbias estritas na presença de nitrato, ambas sem ativação. Azul – N₂OR como foi isolada, Vermelho – N₂OR oxidada com ferricianeto de potássio, e Verde – N₂OR reduzida com ditionito de sódio. A redutase do óxido nítrico em (A) tinha uma concentração de 65 μ M e em (B) de 75 μ M.

3.6. Determinação do coeficiente de extinção molar

3.6.1. Quantificação de proteína

A quantificação de proteína total das amostras da redutase do óxido nitroso isolada de massa celular obtida em condições microaerófilas (N_2OR_{micro}), e anaeróbias estritas (N_2OR_{ana}) bem como das mesmas proteínas após ativação de 5 horas ($N_2OR_{micro_5h}$, $N_2OR_{ana_5h}$), foi realizada segundo o mesmo método utilizado para a quantificação de proteína das amostras retiradas ao longo dos crescimentos, através do método de *Lowry*, como referido nos Materiais e Métodos, secção 2.2.2.

Através da equação das retas de calibração do método utilizado, e tendo em conta o fator de diluição dos ensaios realizados, foi possível determinar a concentração da proteína total nas amostras obtidas (Tabela 3.VIII.).

Tabela 3.VIII. Concentração da proteína total nas amostras de N_2OR isolada de um crescimento em condições anaeróbias estritas (N_2OR_{ana}), e de um crescimento em condições microaerófilas na presença de nitrato (N_2OR_{micro}), através do método de *Lowry* e do espectro na forma reduzida.

| ENZIMA | MÉTODO DE <i>LOWRY</i> | | ESPECTRO ^{II} |
|---------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| | [N_2OR] (mg/mL) | [N_2OR] ^I (μ M) | [N_2OR] (μ M) |
| N_2OR_{micro} | 14 | 111 \pm 24 | 65 |
| $N_2OR_{micro_5h}$ | 3 | 21 \pm 1 | 10 |
| N_2OR_{ana} | 13 | 99 \pm 26 | 75 |
| $N_2OR_{ana_5h}$ | 2 | 13 \pm 2 | 4 |

^I Massa molecular do monómero de 65 kDa.

^{II} Concentração da N_2OR determinada através do coeficiente de extinção molar $\epsilon_{640, nm} = 7,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (dímero), para a N_2OR reduzida com ditionito^[26].

3.6.2. Quantificação de cobre

A quantificação de cobre, de ambas as enzimas isoladas, foi efetuada pelo método colorimétrico usando o reagente 2,2'-Biquinolina, descrito nos Materiais e Métodos, secção 2.6.3.1. Assim, através da leitura da absorvância ao comprimento de onda de 546 nm, podemos calcular a concentração de cobre total nas amostras da redutase do óxido nitroso. Essa concentração, juntamente com a concentração de proteína acima determinada (pelo método de *Lowry* e pelo espectro), permite-nos estimar o número de átomos de cobre por proteína, Tabela 3.IX. A concentração de cobre foi também determinada por ICP.

Tabela 3.IX. Estimativa do número de cobres por proteína ($[\text{Cu}^{2+}]/[\text{N}_2\text{OR}]$), da amostra da redutase do óxido nitroso de um crescimento efetuado em condições microaerófilas e anaeróbias estritas na presença de nitrato, $\text{N}_2\text{OR}_{\text{micro}}$ e $\text{N}_2\text{OR}_{\text{ana}}$, respetivamente. Estimativa obtida pela concentração de cobre (através do método de quantificação de cobre do reagente 2,2'-Biquinolína) e proteína, e confirmado por ICP (plasma acoplado indutivamente).

| ENZIMA | $[\text{N}_2\text{OR}]^{\text{I}}$ (μM) | $[\text{Cu}^{2+}]$ (μM) | | $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{N}_2\text{OR}]_{\text{DÍMERO}}$ | |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--------------|--|----------------|
| | | MÉTODO 2,2'-BIQUINOLINA | ICP | MÉTODO 2,2'-BIQUINOLINA | ICP |
| $\text{N}_2\text{OR}_{\text{micro}}$ | 111 ± 24 (<i>Lowry</i>) | 382 ± 47 | n.d. | $3,4 \pm 0,5$ | n.d. |
| | 65 (espetro) ^{II} | | | $5,9 \pm 0,8$ | |
| $\text{N}_2\text{OR}_{\text{ana}}$ | 99 ± 26 (<i>Lowry</i>) | 843 ± 187 | 774 ± 13 | $8,5 \pm 4,1$ | $7,8 \pm 2,2$ |
| | 75 (espetro) ^{II} | | | $11,2 \pm 2,5$ | $10,3 \pm 0,2$ |

^I Concentração da N_2OR por dímero.

^{II} Concentração obtida pelo espetro da forma reduzida a 640 nm ($\epsilon_{640 \text{ nm}} = 7,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) – dímero.

n.d. – não determinado.

Tendo em conta a concentração de proteína e de cobre em cada uma das amostras, é possível estimar o número de átomos de Cu^{2+} /proteína nas duas amostras de N_2OR em estudo. O teor de cobre estimado para ambas as enzimas redutase do óxido nitroso parece não corroborar a informação publicada (6 átomos de cobre por monómero, ou 12 por dímero)^{[64],[65],[68]}, ver Tabela 3.IX., contudo, esse facto poderá dever-se a inúmeros aspetos.

Pela Tabela 3.IX. e tendo em conta ambas as enzimas, verificamos que quando se tem em conta o valor da concentração de proteína através do método de *Lowry* se observa uma diminuição da razão Cu^{2+} /proteína. De facto, tendo em consideração este método, a presença de qualquer quantidade de outras proteínas contaminantes influenciam este valor, o que se traduz numa sobrestimação da concentração de N_2OR que aparenta uma concentração superior à real e, por consequência, irá diminuir a razão Cu^{2+} /proteína. Aquando do caso de $\text{Cu}^{2+}/\text{N}_2\text{OR}_{\text{micro}}$ o valor é muito diferente do esperado (mais que no caso da $\text{N}_2\text{OR}_{\text{D}_2}$), uma vez que, como se verificou pela eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), esta amostra apresenta uma grande quantidade de contaminantes (menor grau de pureza comparativamente à outra amostra). Já no caso da estimativa de $\text{Cu}^{2+}/\text{N}_2\text{OR}_{\text{ana}}$ o valor é inferior ao esperado, contudo, a concentração de cobre calculada quer pelo método do reagente 2,2'-Biquinolína ou por ICP é muito semelhante, pelo que a diferença observada poderá dever-se a problemas inerentes à quantificação de proteína; o que também pode ser visualizado pelo gel SDS-PAGE, que embora mais pura que a $\text{N}_2\text{OR}_{\text{micro}}$ se percebe, nitidamente, a existência de outras proteínas contaminantes.

Tendo em consideração os espectros de absorção apresentados na Figura 3.17., e depois de calculadas as concentrações de cobre destas amostras através do método colorimétrico do reagente 2,2'-Biquinolina, e partindo do pressuposto que cada dímero de N_2OR tem 12 átomos de cobre (ver Tabela 3.IX.), aplicando-se a Lei de *Lambert-Beer*, podemos representar os espectros de visível como sendo a variação do coeficiente de extinção molar em função do comprimento de onda, Figura 3.19.

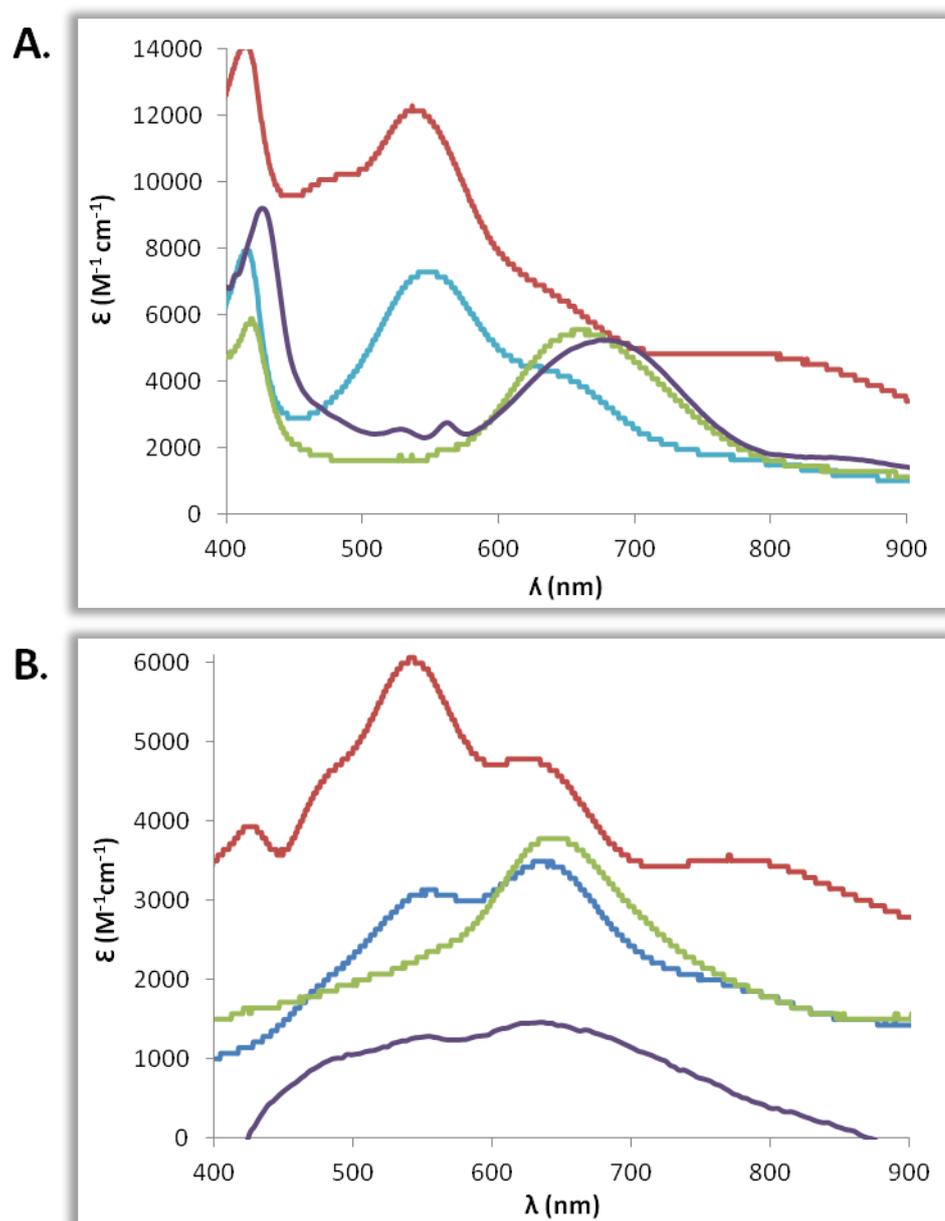


Figura 3.19. Coeficiente de extinção molar em função do comprimento de onda em tampão Tris-HCl 10 mM, pH=7,6. A – N_2OR isolada a partir de massa celular em condições microaerófilas na presença de nitrato (N_2OR_{micro}), B – N_2OR isolada a partir de massa celular em condições anaeróbias estritas igualmente na presença de nitrato (N_2OR_{ana}). Azul – N_2OR como purificada, Vermelho – N_2OR oxidada com ferricianeto de potássio, Verde – N_2OR reduzida com ditionito de sódio e Roxo – N_2OR após eluição na NAP-5.

Na determinação do coeficiente de extinção molar utilizou-se a concentração de cobre ao invés da concentração de proteína obtida pelo método de *Lowry*, uma vez que a determinação de cobre tem menor interferência de outros contaminantes, ou seja, existirá menor probabilidade de haver proteínas de cobre presentes na amostra e que contribuam para a sobrestimação da concentração de cobre nas amostras da N_2OR_{micro} e N_2OR_{ana} .

A N_2OR_{micro} em termos de valores de coeficiente de extinção molar (Tabela 3.X.) é mais semelhante à enzima isolada da bactéria *Pa. pantotrophus* (anaeróbia) que possui coeficientes com valores mais elevados. Enquanto que a N_2OR_{ana} é idêntica à redutase do óxido nitroso isolada de *Pa. pantotrophus* (aeróbia).

Tabela 3.X. Valores experimentais dos coeficientes de extinção molar (ϵ) da redutase do óxido nitroso proveniente de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, e da literatura de *Pa. pantotrophus*^[73], *Achromobacter xylosoxidans*^[83] e *Ps. stutzeri*^[74]. No caso de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, obtiveram-se os valores de ϵ para ambas as enzimas em estudo (N_2OR_{micro} e N_2OR_{ana}).

| BACTÉRIA | ENZIMA | COEFICIENTES ($M^{-1}.cm^{-1}$) | | |
|---|---------------------|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | | $\epsilon_{550\text{ nm}}^I$ | $\epsilon_{800\text{ nm}}^I$ | $\epsilon_{640\text{ nm}}^{II}$ |
| <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i> ^{III} | N_2OR_{micro} | 12151 | 4845 | 5560 |
| | $N_2OR_{micro_5h}$ | n.d. | n.d. | 5273 |
| | N_2OR_{ana} | 6053 | 3489 | 3774 |
| | $N_2OR_{ana_5h}$ | n.d. | n.d. | 1439 |
| <i>Pa. pantotrophus</i> ^{III} | ANAERÓBIA | 8000 | 3000 | 4400 |
| | AERÓBIA | 5000 | 3944 | 3833 |
| <i>Achromobacter xylosoxidans</i> ^{IV} | ANAERÓBIA | 10500 | n.d. | 5300 |
| <i>Ps. stutzeri</i> ^{IV} | ANAERÓBIA | 14000 | n.d. | 6100 |
| | AERÓBIA | 6700 | 4000 | 3400 |

^I Através da forma completamente oxidada com ferricianeto de potássio

^{II} Através da forma reduzida com ditionito

^{III} Por monômero

^{IV} Por dímero

n.d. – não determinado

De salientar, que segundo Prudêncio e colaboradores^[26], e aquando do isolamento da N_2OR de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (mesma bactéria de onde foram isoladas as enzimas em estudo), se obteve um $\epsilon_{640\text{ nm}} = 7,1\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (dímero, determinação através de proteína), valor semelhante ao obtido para a amostra de N_2OR_{ana} ($3,8\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – monômero ou $7,5\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – dímero, determinação pela quantificação de cobre).

Aquando da ativação da enzima com incubação de 5 horas com metil-viologénio reduzido e posterior *desalting*, verifica-se que a N_2OR_{micro} tendo em conta os valores de

coeficiente de extinção molar mantem-se semelhante a *Paracoccus pantotrophus* (anaeróbia), já a N_2OR_{ana} torna-se idêntica à enzima de *Ps. stutzeri* (aeróbia).

Com a determinação dos coeficientes de extinção molar da Figura 3.19. foi possível recalcular a concentração das proteínas redutase do óxido nitroso antes da ativação (N_2OR_{micro} e N_2OR_{ana}) e depois da ativação com incubação de 5 horas com metil-viologénio reduzido ($N_2OR_{micro_5h}$ e $N_2OR_{ana_5h}$) como apresentado na Tabela 3.XI., necessárias para estimativa da atividade específica da N_2OR_{micro} e N_2OR_{ana} , em 3.7. do presente capítulo.

Tabela 3.XI. Concentração da proteína N_2OR_{micro} , N_2OR_{ana} , $N_2OR_{micro_5h}$ e $N_2OR_{ana_5h}$ (as duas últimas após ativação da enzima) através dos coeficientes de extinção molar estimados.

| ENZIMA | CONCENTRAÇÃO PELO ESPETRO ¹ (μM) |
|---------------------|--|
| N_2OR_{micro} | 41 |
| $N_2OR_{micro_5h}$ | 7 |
| N_2OR_{ana} | 71 |
| $N_2OR_{ana_5h}$ | 10 |

¹ Cálculo de proteína (por dímero) pelo espectro utilizando $\epsilon_{640\text{ nm}} = 11,1\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (N_2OR_{micro}), $\epsilon_{640\text{ nm}} = 10,5\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($N_2OR_{micro_5h}$), $\epsilon_{640\text{ nm}} = 7,5\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (N_2OR_{ana}), $\epsilon_{640\text{ nm}} = 2,9\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($N_2OR_{ana_5h}$), na forma reduzida com ditionito.

3.7. Atividade específica

Nos estudos de atividade enzimática da N_2OR na presença do seu parceiro redox fisiológico, apresentados e discutidos adiante, optámos por usar o citocromo c_{552} do crescimento em condições anaeróbias estritas, uma vez que este possui um grau de pureza superior ao obtido do crescimento em condições microaerófilas.

Como referido na Introdução, os primeiros ensaios de atividade de redução do N_2O foram efetuados com a adição do substrato (N_2O) para iniciar a reação, isto é, a enzima era adicionada em último lugar^[43]. Este método foi utilizado para os ensaios com a enzima ativada previamente durante 5 horas.

Contudo, parte dos ensaios de atividade realizados no trabalho experimental conducente a esta dissertação, foram efetuados com o método descrito na secção 2.2.3. dos Materiais e Métodos. Este processo seguiu a nova versão do ensaio, conseguido por Dell'Acqua e colaboradores (2008)^[43], sendo que a reação é iniciada pela adição do substrato (adicionado em último lugar). Na realidade, foram efetuados 3 ensaios diferentes, quer para a enzima isolada de massa celular obtida em condições microaerófilas (N_2OR_{micro}), ou anaeróbias (N_2OR_{ana}). Assim, estimou-se a atividade específica da enzima N_2OR :

(i) Após 3 horas de incubação da N_2OR (ativação) com metil-viologénio reduzido (ativação sem remoção de redutores), usando o MV reduzido como doador de eletrões no ensaio enzimático;

(ii) após 5 horas de incubação com metil-viologénio reduzido sendo que, antes do ensaio de atividade, foram retirados os agentes redutores (ativação prévia), usando o MV reduzido como doador de eletrões no ensaio enzimático;

(iii) 5 horas de incubação com metil-viologénio reduzido sendo que, antes do ensaio de atividade, foram retirados os agentes redutores (ativação prévia), usando o citocromo c_{552} reduzido como doador de eletrões no ensaio enzimático.

Os resultados obtidos a partir dos três ensaios acima referidos estão representados na Tabela 3.XII., para ambas as enzimas, N_2OR_{micro} e N_2OR_{ana} , de massas celulares em condições microaerófilas e anaeróbias estritas, respetivamente.

Tabela 3.XII. Tabela resumo das atividades obtidas para a N_2OR proveniente de um crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas e anaeróbias estritas na presença de nitrato, N_2OR_{micro} e N_2OR_{ana} , respetivamente.

| ATIVIDADE ESPECÍFICA ($\mu\text{mol}_{N_2O}/\text{min}/\text{mg}_{N_2OR}$) ^I | | | | |
|---|---|-----------------------|-----------------------|------------------|
| | $Ab_{550\text{ nm}}/Ab_{640\text{ nm}}$ ^{II} | ATIVAÇÃO | PRÉ-ATIVAÇÃO | |
| | | (3 h INCUBAÇÃO) | (5 h) | |
| | | METIL-VIOLOGÉNIO (DE) | METIL-VIOLOGÉNIO (DE) | c_{552} (DE) |
| N_2OR_{micro} | 1,7 | 51 ± 18 | 33 ± 19 | $0,22 \pm 0,004$ |
| N_2OR_{ana} | 1,3 | 81 ± 31 | 55 ± 10 | $2,04 \pm 0,086$ |

^I Para cálculo da atividade, a quantificação de proteína, foi realizada pelo espectro utilizando $\epsilon_{640\text{ nm}} = 11,1\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (N_2OR_{micro}) e $\epsilon_{640\text{ nm}} = 7,5\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (N_2OR_{ana}) para incubação de 3 horas da forma reduzida com ditionito de sódio, $\epsilon_{640\text{ nm}} = 10,5\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($N_2OR_{micro_5h}$) e $\epsilon_{640\text{ nm}} = 2,9\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($N_2OR_{ana_5h}$) para incubação de 5 horas

^{II} Absorvâncias do espectro da N_2OR completamente oxidada com ferricianeto de potássio
DE – Doador Eletrónico

Através da comparação entre os valores de atividade das frações da redutase do óxido nitroso utilizando o citocromo c_{552} , como doador de eletrões fisiológico, e o metil-viologénio, como doador de eletrões não-fisiológico, verificou-se que, para ambas as N_2OR , o metil-viologénio é o doador de eletrões mais eficiente, sendo que a atividade específica estimada usando o parceiro redox fisiológico, citocromo c_{552} , é muito baixa, Tabela 3.XII. Este facto corrobora o reportado na literatura, que embora a atividade específica seja dependente da

concentração de N_2O e do doador de eletrões, nas mesmas condições a atividade é sempre mais baixa aquando da utilização do citocromo c_{552} como doador de eletrões^[43].

Na literatura, uma possível explicação para esta diferença observada, aquando do uso dos dois doadores de eletrões, é o tipo de interação existente entre o metil-viologénio e a enzima, sendo a reação mais eficiente devido à redução direta do centro CuZ pelo doador não-fisiológico, por comparação com o citocromo c_{552} ^[43]. De facto Dell'Acqua e colaboradores aquando do uso de 10 μM de citocromo c_{552} como doador de eletrões e a enzima ativada, obtiveram cerca de 0,3 $\mu mol_{N_2O}/min/mg_{N_2OR}$ de atividade, bastante idêntica à estimada para N_2OR_{micro} . Contudo, no caso do uso de metil-viologénio como doador de eletrões estes autores obtiveram um valor de atividade de aproximadamente 140 $\mu mol_{N_2O}/min/mg_{N_2OR}$ muito distinto do valor estimado quer para N_2OR_{micro} ou N_2OR_{ana} , de facto como observado pelo espetro acima apresentado, em 3.5. do presente capítulo, mesmo com a incubação prolongada da enzima não se conseguiu super reduzir a N_2OR . Também, pode observar-se que, aquando da incubação da enzima durante 3 horas com metil-viologénio reduzido (tempo suficiente para redução completa do centro CuZ* a $[4Cu^+]$)^[43], se obteve maior atividade específica que no caso da enzima ativada durante 5 horas. Esta observação pode ser explicada (i) quer pelo facto de existir oxigénio dentro da câmara de luvas em quantidades suficientes para interferir no ensaio de atividade realizado na presença da enzima não-ativada; uma vez que o oxigénio faz aumentar a atividade, por ajudar na oxidação do metil-viologénio, e, de facto, o que estamos a seguir é a oxidação deste aquando da transferência de eletrões para a N_2OR , como mostra o esquema da Figura 3.20.; (ii) quer pelo facto de, aquando do processo de *desalting*, a enzima ter perdido cobre, uma vez que foi estimada, por ICP, a perda de cobre nas amostras após *desalting* (dados não apresentados).

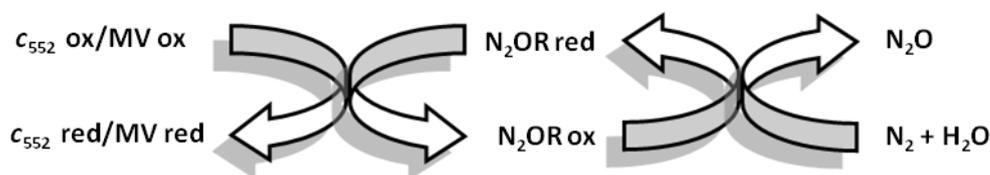


Figura 3.20. Esquema da mediação eletrónica para a N_2OR . O citocromo c_{552} /metil-viologénio reduzido é imediatamente oxidado pela N_2OR , a qual é reoxidada depois da conversão do N_2O a N_2 . c_{552} – citocromo c_{552} , MV – Metil-viologénio, N_2OR – Redutase do Óxido Nitroso, N_2O – Óxido Nitroso, N_2 – Azoto Molecular, H_2O – água. Adaptado de^[98].

É, ainda, de salientar que a enzima com maior contribuição de CuZ* relativamente ao CuZ apresenta maior atividade específica (N_2OR_{ana}), quer na presença do doador eletrónico fisiológico, citocromo c_{552} , ou do doador artificial, metil-viologénio, em qualquer uma das

condições testadas. Na realidade, já se tinha verificado o mesmo acontecimento num estudo efetuado com uma outra enzima purificada de outro crescimento em condições anaeróbias estritas e na presença de nitrato também ela com maior contribuição de CuZ*, contudo esses dados não foram mostrados.

Poderíamos, então, concluir que a N₂OR quando isolada com o centro CuZ na forma de CuZ*, [1Cu²⁺-3Cu⁺], apresenta maior atividade específica que a enzima isolada na forma *purple*, com o centro CuZ no estado [2Cu²⁺-2Cu⁺], o que corrobora o observado por Rasmussen *et al.* (2002). Estes autores mostraram que independentemente do tratamento efetuado à enzima (de *Pa. pantotrophus*), precedido ao ensaio de atividade, ou seja, quer tenha sido completamente oxidada com ferricianeto de potássio, reduzida com ascorbato ou ditionito, a enzima com maior contribuição de CuZ* apresenta maior atividade^[73]. Sabendo que uma atividade específica de 160 μmol_{N₂O}/min/mg_{N₂OR} corresponde a 100% de CuZ na forma de CuZ*, podemos estimar, novamente, a percentagem de CuZ e CuZ* em ambas as proteínas, N₂OR_{micro} e N₂OR_{ana}. Pelo que se obteve aproximadamente 32% de CuZ* para a N₂OR_{micro} e cerca de 51% de CuZ* para a N₂OR_{ana}, estando estes valores ligeiramente diferentes do calculado pelo espetro (40% CuZ* – N₂OR_{micro} e 80% CuZ* – N₂OR_{ana}). Contudo, como verificamos anteriormente, após pré-ativação da enzima com incubação prolongada de 5 h com metil-viologénio reduzido, obteve-se valores de atividade mais baixos que o esperado, por não se conseguir obter a forma super reduzida. Deste modo, faz sentido que a percentagem de CuZ* presente nas proteínas (calculado através da atividade específica com 3 h de incubação com metil-viologénio reduzido) seja inferior ao que deveria corresponder à realidade. No entanto, esta realidade poderá dever-se a outros factores, como inibição pelo metil-viologénio ou perda de cobre.

Assim, podemos afirmar que há uma relação direta entre a quantidade de CuZ* e a atividade enzimática. A diferença observada é explicada pelo facto de que somente o CuZ* pode ser super reduzido a [4Cu⁺], e é esta forma da enzima que apresenta maior atividade específica para a redução de N₂O a N₂. Apesar de vários autores indicarem que esta forma não é fisiológica, é de referir que mesmo usando o doador de eletrões fisiológico se verificou que a atividade é maior quando a enzima tem maior quantidade de [4Cu⁺], ou seja, o centro CuZ está mais na forma CuZ*.

Contudo, em ensaios mais recentes, como o observado por Wunsch *et al.* (2005), em que, aquando do estudo de um mutante duplo dos genes *nosX* e *nirX*, observou-se uma maior atividade específica *in vivo* para as células através das quais a enzima isolada possui maior contribuição de CuZ comparativamente a CuZ*. No entanto, após isolamento da enzima de *Pa. denitrificans*, ambas as enzimas possuem atividade específica semelhante, observando-se um

ligeiro aumento para a enzima com maior contribuição de CuZ* mas esse aumento não é considerado significativo^[61]. Deste modo, torna-se essencial realizar mais estudos para se poder concluir qual é a forma da enzima mais ativa *in vivo*.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Nos crescimentos de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* em condições microaerófilas na presença de 10 mM de nitrato em biofermentador de 2 L, concluímos que a bactéria atinge uma maior densidade ótica a 600 nm no ensaio efetuado a pH 7,5, pelo que este pode ser considerado o pH ótimo de crescimento. Através da quantificação de nitrito (método de *Griess*), verificámos que a desnitrificação é induzida pela presença de nitrato no meio de cultura, e que esta não é inibida mesmo na presença de oxigénio (taxa de arejamento de 0,2 vvm), para todos os pHs em estudo. A desnitrificação tem início 2 h após a inoculação e o máximo de nitrito observou-se a aproximadamente 5 h do início do ensaio (a pH 8,5 observa-se um atraso). Através dos ensaios de atividade de redução do óxido nítrico, observamos que o aumento da atividade enzimática é acompanhado pela diminuição da concentração de nitrito no meio, o que corrobora a ordem do processo da desnitrificação. A redução de nitrito a óxido nítrico é realizada em *Ma. hydrocarbonoclasticus* pela nitrito redutase citocromo *cd₁*, que é responsável pelo segundo passo da desnitrificação (primeira etapa que ocorre no periplasma da bactéria); já a redutase do óxido nítrico, que catalisa a redução do óxido nítrico a azoto molecular, é a responsável pelo último passo da desnitrificação.

Por fim, verificámos que o ensaio realizado a pH 6,5 (mais ácido), apresenta atividade de redução do óxido nítrico mais baixa (0,11 U/mg_{prot}), que corrobora as observações de Bakken *et al.*, que para solos mais ácidos se verificam emissões de óxido nítrico mais elevadas, sendo que a pH 8,5 se observou uma maior atividade enzimática de redução de N₂O (2,63 U/mg_{prot}).

A redutase do óxido nítrico obtida a partir do crescimento em condições microaerófilas foi isolada na forma *purple* com um máximo de absorção a 550 nm e um ombro a 640 nm, sendo que o centro CuA se encontrava maioritariamente na forma [Cu⁺-Cu⁺] e o centro CuZ no estado [2Cu²⁺-2Cu⁺]. Esta enzima continha uma maior contribuição de CuZ comparativamente a CuZ*

(68% de CuZ e 32% de CuZ*), com uma razão de $Abs_{550\text{ nm}}/Abs_{640\text{ nm}}$ de 1,7 (para a N₂OR na forma completamente oxidada). Esta purificação teve um rendimento de 2,69 mg_{N₂OR_Pura}/L_{meio}. Por outro lado, a enzima purificada do crescimento em condições anaeróbias estritas possuía máximos de absorção a 550 nm e 640 nm (em que a banda de absorção a 640 nm é mais intensa que no caso anterior), sendo que o centro CuZ correspondia a uma mistura de CuZ e CuZ*, com praticamente igual contribuição (49% de CuZ e 51% de CuZ*), com uma razão de $Abs_{550\text{ nm}}/Abs_{640\text{ nm}}$ de 1,3 (para a N₂OR na forma completamente oxidada). Purificação com um rendimento de 0,15 mg_{N₂OR_Pura}/L_{meio}.

Segundo a literatura, a enzima é mais rica em CuZ do que CuZ* aquando do seu isolamento na ausência de oxigénio^{[75],[76],[85]}. No entanto, no presente caso, o isolamento da enzima foi realizado nas mesmas condições, na presença de oxigénio, e o que foi alterado foram as condições de crescimento da bactéria. O que se verificou é que a enzima isolada de células obtidas na presença de algum oxigénio apresenta o centro CuZ mais oxidado (CuZ no estado [2Cu²⁺-2Cu⁺]), enquanto que a enzima isolada de massa celular obtida em condições de anaerobiose estritas o centro CuZ encontra-se na sua maioria na forma redox inerte e inativo, CuZ*. Pela espectroscopia de UV-visível podemos verificar, ainda, que ambas as enzimas possuíam o centro CuA parcialmente reduzido, dado que, aquando da oxidação da redutase do óxido nitroso com ferricianeto, se observa aumento da absorvância aos comprimentos de onda característicos deste centro e que aquando da ativação da enzima com metil-viologénio reduzido durante 5 horas não se conseguiu obter a forma super reduzida da N₂OR, centro CuZ no estado [4Cu⁺], para ambas as enzimas. O espectro que se observa deve corresponder à enzima com o centro CuZ na forma de CuZ, sendo que será em maior quantidade para a enzima isolada de células obtidas em condições microaerófilas.

Relativamente aos coeficientes de extinção molar da enzima obtida a partir de uma massa celular em condições microaerófilas, esta é mais semelhante à enzima isolada da bactéria *Paracoccus pantotrophus* ($\epsilon_{550\text{ nm}} = 12,2\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{640\text{ nm}} = 5,6\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, por monómero) que possui valores de coeficiente de extinção molar a estes comprimentos de onda mais elevados. Enquanto que a enzima isolada a partir de massa celular obtida em condições anaeróbias estritas apresenta coeficientes de extinção molar idênticos à redutase do óxido nitroso isolada de *Paracoccus pantotrophus* em condições aeróbias ($\epsilon_{550\text{ nm}} = 6,1\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{640\text{ nm}} = 3,8\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, por monómero). Ainda, segundo Prudêncio e colaboradores^[26], e aquando do isolamento da N₂OR de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (mesma bactéria de onde foram isoladas as enzimas em estudo), obteve-se um $\epsilon_{640\text{ nm}} = 7,1\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (dímero^[26], determinação através de concentração de proteína), valor semelhante ao obtido para a amostra de N₂OR_{ana} ($3,8\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

(monómero) ou $7,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (dímero), determinação efetuada através da quantificação de cobre).

Finalmente, aquando da análise da atividade específica, observou-se que, quer na presença do doador de eletrões fisiológico (citocromo c_{552} , purificado de massa celular em condições anaeróbias estritas com uma razão de pureza, $\text{Abs}_{412 \text{ nm}}/\text{Abs}_{280 \text{ nm}}$, de 6,7 com um rendimento de $0,1 \text{ mg}_{c_{552_Pura}}/\text{L}_{\text{meio}}$), quer do doador artificial (metil-viologénio), a enzima com maior contribuição de CuZ^* , proveniente do crescimento em condições anaeróbias, apresenta maior atividade ($81 \text{ U}/\text{mg}_{\text{prot}}$ com ativação de 3 horas e metil-viologénio como doador de eletrões, $55 \text{ U}/\text{mg}_{\text{prot}}$ e $2 \text{ U}/\text{mg}_{\text{prot}}$, ambos com pré-ativação de 5 horas e como doadores de eletrões o metil-viologénio e o citocromo c_{552} , respetivamente). É, também de salientar que se observou que o centro CuZ na forma de CuZ não se reduz a $[\text{4Cu}^+]$, enquanto que o CuZ^* é reduzido através da incubação prolongada com metil-viologénio reduzido, pelo que será a espécie $[\text{4Cu}^+]$ que apresenta maior atividade específica que o centro CuZ mesmo na forma mais reduzida como $[\text{1Cu}^{2+}-\text{3Cu}^+]$.

PERSPETIVAS FUTURAS

PERSPETIVAS FUTURAS

No estudo efetuado nesta dissertação, observou-se que o ensaio realizado a pH 6,5 apresenta menor atividade de redução do óxido nítrico e, de facto, segundo Bakken *et al.*, em solos ácidos verificam-se maiores emissões de N₂O comparativamente com solos mais básicos. Para confirmar estas hipóteses, estudos demonstraram que a expressão dos genes *nosZ*, que codificam para a redutase do óxido nítrico, e *nirS*, que codificam para a redutase do nitrito, é geralmente mais baixa a pH 6 do que a pH 8^[112].

Assim, seria interessante isolar a enzima a partir de crescimentos celulares efetuados a diferentes pHs, como os realizados neste presente trabalho (pH 6,5, 7,5 e 8,5).

Para esse fim, seria vantajoso realizar crescimentos de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* em fermentador de 10 L a diferentes pHs, monitorizar a densidade celular, atividade de redução do óxido nítrico e concentração de nitritos durante o ensaio, bem como monitorizar diretamente do crescimento a quantidade de óxido nítrico. A partir destes crescimentos, efetuar a purificação e caracterização da enzima assim como a sua completa caracterização espectroscópica por espectroscopia de UV-visível e RPE. Com a enzima isolada dos crescimentos, deveriam efetuar-se ensaios de atividade com os doadores de eletrões fisiológico e artificial, para melhor compreender a influência do pH na produção da redutase do óxido nítrico.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. J. Gauthier, B. Lafay, R. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin, and J.-C. Bertrand, "Marinobacter hydrocarbonoclasticus gen. nov., sp. nov., a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium" *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 42, no. 4, pp. 568–576, Oct. 1992.
- [2] J.H. Yoon, "Marinobacter litoralis sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea water from the East Sea in Korea" *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 53, no. 2, pp. 563–568, Mar. 2003.
- [3] N. M. Gorshkova, "Marinobacter excellens sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan" *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 53, no. 6, pp. 2073–2078, Nov. 2003.
- [4] H. Larsen, "Halophilic and halotolerant microorganisms - an overview and historical perspective" *FEMS*, vol. 39, pp. 3–7, 1986.
- [5] M. C. Márquez and a Ventosa, "Marinobacter hydrocarbonoclasticus Gauthier et al. 1992 and Marinobacter aquaeolei Nguyen et al. 1999 are heterotypic synonyms" *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 55, pp. 1349–51, May 2005.
- [6] B. Klein, P. Bouriat, P. Goulas, and R. Grimaud, "Behavior of Marinobacter hydrocarbonoclasticus SP17 cells during initiation of biofilm formation at the alkane-water interface" *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 105, no. 3, pp. 461–8, Feb. 2010.
- [7] L. Baumann, P. Baumann, M. Mandel, and R. D. Allen, "Taxonomy of aerobic marine eubacteria" *J. Bacteriol.*, vol. 110, no. 1, pp. 402–29, Apr. 1972.
- [8] P. Bonin, M. Gilewicz, and J. C. Bertrand, "Denitrification by a marine bacterium *Pseudomonas nautica* strain 617" *Elsevier*, pp. 371–383, 1987.
- [9] P. Bonin, M. Gilewicz, M. Denis, and J. C. Bertmud, "Salt requirements in the denitrifying bacterium *Pseudomonas nautica* 617" *Elsevier*, pp. 159–169, 1989.
- [10] P. Bonin, M. Gilewicz, and J. C. Bertrand, "Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*" no. Bioblock 94361, pp. 3–6, 1989.

- [11] C. Spröer, E. Lang, P. Hobeck, J. Burghardt, E. Stackebrandt, and B. J. Tindall, "Transfer of *Pseudomonas nautica* to *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*" *Int. J. Systematic Bacteriol*, no. 1 998, pp. 1445–1448, 1998.
- [12] N. Huu, E. B. M. Denner, D. T. C. Ha, G. Wanner, and H. Stan-lotter, "Marinobacter aquaeolei sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well" *Int. J. Systematic Bacteriol*, no. 1 999, pp. 367–375, 1996.
- [13] A. J. Thomson, G. Giannopoulos, J. Pretty, E. M. Baggs, and D. J. Richardson, "Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions" *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 367, no. 1593, pp. 1157–68, May 2012.
- [14] P. Cabello, M. D. Roldán, and C. Moreno-Vivián, "Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea" *Microbiology*, vol. 150, no. Pt 11, pp. 3527–46, Nov. 2004.
- [15] O. Einsle and P. M. H. Kroneck, "Structural bases of denitrification" *Biol. Chem*, pp. 875–883, 2004.
- [16] C. Moreno-Vivián, P. Cabello, M. Martínez-Luque, R. Blasc, and F. Castillo, "Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases" *J. Bacteriol.*, pp. 6573–6584, 1999.
- [17] D. J. Richardson and N. J. Watmough, "Inorganic nitrogen metabolism in bacteria" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, pp. 207–219, 1999.
- [18] B. C. Berks, S. J. Ferguson, J. W. Moir, and D. J. Richardson, "Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions" *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1232, no. 3, pp. 97–173, Dec. 1995.
- [19] S. J. Ferguson, "Nitrogen cycle enzymology" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 182–93, Apr. 1998.
- [20] W. G. Zumft and P. M. H. Kroneck, "Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea" *Ad. Micr. Phys.*, vol. 52, no. 06. 2007, pp. 107–227.
- [21] B. B. Ward, "Nitrification and Denitrification: Probing the Nitrogen Cycle in Aquatic Environments" *Microb. Ecol.*, pp. 247–261, 1996.
- [22] A. A. Van De Graaf, A. Mulder, P. De Bruijn, M. S. Jetten, L. A. Robertson, and J. G. Kuenen, "Anaerobic Oxidation of Ammonium Is a Biologically Mediated Process" *A. Env. Micr.*, vol. 61, no. 4, 1995.
- [23] J. N. Galloway, A. R. Townsend, J. W. Erisman, M. Bekunda, Z. Cai, J. R. Freney, L. a Martinelli, S. P. Seitzinger, and M. A. Sutton, "Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions" *Science*, vol. 320, no. 5878, pp. 889–92, May 2008.
- [24] L. R. Bakken, L. Bergaust, B. Liu, and A. Frostegård, "Regulation of denitrification at the cellular level: a clue to the understanding of N₂O emissions from soils" *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 367, no. 1593, pp. 1226–34, May 2012.

- [25] P. Tavares, a S. Pereira, J. J. G. Moura, and I. Moura, "Metalloenzymes of the denitrification pathway" *J. Inorg. Biochem.*, vol. 100, no. 12, pp. 2087–100, Dec. 2006.
- [26] M. Prudêncio, A. S. Pereira, P. Tavares, S. Besson, I. Cabrito, K. Brown, B. Samyn, B. Devreese, J. Van Beeumen, F. Rusnak, G. Fauque, J. J. Moura, M. Tegoni, C. Cambillau, and I. Moura, "Purification, characterization, and preliminary crystallographic study of copper-containing nitrous oxide reductase from *Pseudomonas nautica* 617" *Biochemistry*, vol. 39, no. 14, pp. 3899–907, Apr. 2000.
- [27] W. G. Zumft, "Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification" *A. Soc. Micr.*, vol. 61, no. 4, 1997.
- [28] K. Fujita, J. M. Chan, J. a Bollinger, M. L. Alvarez, and D. M. Dooley, "Anaerobic purification, characterization and preliminary mechanistic study of recombinant nitrous oxide reductase from *Achromobacter cycloclastes*" *J. Inorg. Biochem.*, vol. 101, no. 11–12, pp. 1836–44, Nov. 2007.
- [29] S. R. Pauleta, S. Dell'Acqua, and I. Moura, "Nitrous oxide reductase" *Coord. Chem. Rev.*, vol. 257, no. 2, pp. 332–349, Jan. 2013.
- [30] S. C. Baker, S. J. Ferguson, B. Ludwig, M. D. Page, O. M. Richter, and R. J. van Spanning, "Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility" *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 4, pp. 1046–78, Dec. 1998.
- [31] I. Moura and J. J. Moura, "Structural aspects of denitrifying enzymes" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 2, pp. 168–75, Apr. 2001.
- [32] I. Moura, S. R. Pauleta, and J. J. G. Moura, "Enzymatic activity mastered by altering metal coordination spheres" *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 13, no. 8, pp. 1185–95, Nov. 2008.
- [33] H. Lopes, S. Besson, I. Moura, and J. J. G. Moura, "Kinetics of inter- and intramolecular electron transfer of *Pseudomonas nautica* cytochrome cd_1 nitrite reductase: regulation of the NO-bound end product" *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 6, no. 1, pp. 55–62, Jan. 2001.
- [34] T. Rasmussen, B. C. Berks, J. Sanders-Loehr, D. M. Dooley, W. G. Zumft, and a J. Thomson, "The catalytic center in nitrous oxide reductase, Cu_Z , is a copper-sulfide cluster" *Biochemistry*, vol. 39, no. 42, pp. 12753–6, Oct. 2000.
- [35] B. G. Malmström and J. Leckner, "The chemical biology of copper" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 286–92, Apr. 1998.
- [36] M. C. Linder and M. Hazegh-Azam, "Copper biochemistry and molecular biology" *Am. J. Clin. Nutr.*, p. 797S–811S, 1996.
- [37] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, and L. Gorton, "Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes" *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 12, pp. 2517–54, Jun. 2005.
- [38] K. Enwall, I. N. Throbäck, M. Stenberg, M. Söderström, and S. Hallin, "Soil resources influence spatial patterns of denitrifying communities at scales compatible with land management" *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 7, pp. 2243–50, Apr. 2010.

- [39] S. Dell'acqua, I. Moura, J. J. G. Moura, and S. R. Pauleta, "The electron transfer complex between nitrous oxide reductase and its electron donors" *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 16, no. 8, pp. 1241–54, Dec. 2011.
- [40] K. Matilla and T. Haltia, "How Does Nitrous Oxide Reductase Interact With Its Electron Donors? – A Docking Study" *Proteins*, pp. 708–722.
- [41] B. C. Berks, T. Palmer, and F. Sargent, "The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology" *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 47, no. 0, pp. 187–254, Jan. 2003.
- [42] T. Palmer, F. Sargent, and B. C. Berks, "Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway" *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 4, pp. 175–80, Apr. 2005.
- [43] S. Dell'acqua, S. R. Pauleta, E. Monzani, A. S. Pereira, L. Casella, J. J. G. Moura, and I. Moura, "Electron transfer complex between nitrous oxide reductase and cytochrome c_{552} from *Pseudomonas nautica*: kinetic, nuclear magnetic resonance, and docking studies" *Biochemistry*, vol. 47, no. 41, pp. 10852–62, Oct. 2008.
- [44] J. Simon and L. Hederstedt, "Composition and function of cytochrome c biogenesis System II" *FEBS J.*, vol. 278, no. 22, pp. 4179–88, Nov. 2011.
- [45] H. Cuypers, J. Berghöfer, and W. G. Zumft, "Multiple *nosZ* promoters and anaerobic expression of *nos* genes necessary for *Pseudomonas stutzeri* nitrous oxide reductase and assembly of its copper centers" *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1264, no. 2, pp. 183–90, Nov. 1995.
- [46] U. Honisch and W. G. Zumft, "Operon Structure and Regulation of the *nos* Gene Region of *Pseudomonas stutzeri*, Encoding an ABC-Type ATPase for Maturation of Nitrous Oxide Reductase" *J. Bacteriol.*, pp. 1895-1902, Mar. 2003.
- [47] K. Heylen and J. Keltjens, "Redundancy and modularity in membrane-associated dissimilatory nitrate reduction in *Bacillus*" *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. October, p. 371, Jan. 2012.
- [48] W. G. Zumft, "Biogenesis of the bacterial respiratory CuA, Cu-S enzyme nitrous oxide reductase" *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 10, no. 2–4, pp. 154–66, Jan. 2005.
- [49] U. Honisch, P. Wunsch, M. P. Heikkila, and W. G. Zumft, "Role of the Tat Transport System in Nitrous Oxide Reductase Translocation and Cytochrome cd_1 Biosynthesis in *Pseudomonas stutzeri*" vol. 183, no. 5, pp. 1663–1671, 2001.
- [50] P. Holloway, W. McCormick, R. J. Watson, and Y. K. Chan, "Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*" *J. Bacteriol.*, vol. 178, no. 6, pp. 1505–14, Mar. 1996.
- [51] H. Arai, M. Mizutani and Y. Igarashi, "Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*" *Microbiology*, vol. 149, no. 1, pp. 29–36, Jan. 2003.
- [52] K. Vollack and W. G. Zumft, "Nitric Oxide Signaling and Transcriptional Control of Denitrification Genes in *Pseudomonas stutzeri*" *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 8, pp. 2516-26, Apr. 2001.

- [53] G. Giardina, S. Rinaldo, K. a Johnson, A. Di Matteo, M. Brunori, and F. Cutruzzolà, "NO sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: structure of the transcriptional regulator DNR" *J. Mol. Biol.*, vol. 378, no. 5, pp. 1002–15, May 2008.
- [54] L. Bergaust, R. J. M. van Spanning, A. Frostegård, and L. R. Bakken, "Expression of nitrous oxide reductase in *Paracoccus denitrificans* is regulated by oxygen and nitric oxide through FnrP and NNR" *Microbiology*, vol. 158, no. Pt 3, pp. 826–34, Mar. 2012.
- [55] P. Wunsch and W. G. Zumft, "Functional Domains of NosR, a Novel Transmembrane Iron-Sulfur Flavoprotein Necessary for Nitrous Oxide Respiration" *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 6, pp. 1992–2001, 2005.
- [56] H. Cuypers, a Viebrock-Sambale, and W. G. Zumft, "NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous oxide reductase in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*" *J. Bacteriol.*, vol. 174, no. 16, pp. 5332–9, Aug. 1992.
- [57] P. Wunsch, M. Herb, H. Wieland, U. M. Schiek, and W. G. Zumft, "Requirements for CuA and Cu-S Center Assembly of Nitrous Oxide Reductase Deduced from Complete Periplasmic Enzyme Maturation in the Nondenitrifier *Pseudomonas putida*" *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 3, pp. 887–896, 2003.
- [58] M. A. McGuirl, J. a. Bollinger, N. Cosper, R. a. Scott, and D. M. Dooley, "Expression, purification, and characterization of NosL, a novel Cu(I) protein of the nitrous oxide reductase (nos) gene cluster" *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 6, no. 2, pp. 189–195, Feb. 2001.
- [59] L. M. Taubner, M. a McGuirl, D. M. Dooley, and V. Copié, "Structural studies of Apo NosL, an accessory protein of the nitrous oxide reductase system: insights from structural homology with MerB, a mercury resistance protein" *Biochemistry*, vol. 45, no. 40, pp. 12240–52, Oct. 2006.
- [60] N. F. W. Saunders, J. J. Hornberg, N. M. Willem, H. V Westerhoff, S. De Vries, J. Rob, and M. Van Spanning, "The NosX and NirX Proteins of *Paracoccus denitrificans* Are Functional Homologues: Their Role in Maturation of Nitrous Oxide Reductase" *J. Bacteriol.*, pp. 5211-17, Sept. 2000.
- [61] P. Wunsch, H. Körner, F. Neese, R. J. M. van Spanning, P. M. H. Kroneck, and W. G. Zumft, "NosX function connects to nitrous oxide (N₂O) reduction by affecting the Cu(Z) center of NosZ and its activity in vivo" *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 21, pp. 4605–9, Aug. 2005.
- [62] J. M. Boyd, J. a Endrizzi, T. L. Hamilton, M. R. Christopherson, D. W. Mulder, D. M. Downs, and J. W. Peters, "FAD binding by ApbE protein from *Salmonella enterica*: a new class of FAD-binding proteins" *J. Bacteriol.*, vol. 193, no. 4, pp. 887–95, Feb. 2011.
- [63] J. Simon, O. Einsle, P. M. H. Kroneck, and W. G. Zumft, "The unprecedented nos gene cluster of *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome c nitrous oxide reductase" *FEBS Lett.*, vol. 569, no. 1–3, pp. 7–12, Jul. 2004.
- [64] K. Brown, M. Tegoni, M. Prudêncio, A. S. Pereira, S. Besson, J. J. Moura, I. Moura, and C. Cambillau, "A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase" *letters*, pp. 191–195, 2000.

- [65] K. Brown, K. Djinovic-Carugo, T. Haltia, I. Cabrito, M. Saraste, J. J. Moura, I. Moura, M. Tegoni, and C. Cambillau, "Revisiting the catalytic CuZ cluster of nitrous oxide (N₂O) reductase. Evidence of a bridging inorganic sulfur" *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 52, pp. 41133–6, Dec. 2000.
- [66] J. A. Farrar, W. G. Zumft, and a J. Thomson, "CuA and CuZ are variants of the electron transfer center in nitrous oxide reductase" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 17, pp. 9891–6, Aug. 1998.
- [67] J. A. Farrar, a J. Thomson, M. R. Cheesman, D. M. Dooley, and W. G. Zumft, "A model of the copper centres of nitrous oxide reductase (*Pseudomonas stutzeri*). Evidence from optical, EPR and MCD spectroscopy" *FEBS Lett.*, vol. 294, no. 1–2, pp. 11–5, Dec. 1991.
- [68] T. Haltia, K. Brown, M. Tegoni, C. Cambillau, M. Saraste, K. Mattila, and K. Djinovic-Carugo, "Crystal structure of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* at 1.6 Å resolution" *Bioch. Soc.*, vol. 88, no. May 2001, pp. 77–88, 2003.
- [69] K. Paraskevopoulos, S. V Antonyuk, R. G. Sawers, R. R. Eady, and S. S. Hasnain, "Insight into catalysis of nitrous oxide reductase from high-resolution structures of resting and inhibitor-bound enzyme from *Achromobacter cycloclastes*" *J. Mol. Biol.*, vol. 362, no. 1, pp. 55–65, Sep. 2006.
- [70] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, "UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis" *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–12, Oct. 2004.
- [71] S. Dell'Acqua, S. R. Pauleta, I. Moura, and J. J. G. Moura, "The tetranuclear copper active site of nitrous oxide reductase: the CuZ center" *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 16, no. 2, pp. 183–94, Feb. 2011.
- [72] J. R. Winkler, "Electron tunneling pathways in proteins" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 4, no. 2, pp. 192–8, Apr. 2000.
- [73] T. Rasmussen, B. C. Berks, J. N. Butt, and A. J. Thomson, "Multiple forms of the catalytic centre, CuZ, in the enzyme nitrous oxide reductase from *Paracoccus pantotrophus*" *Biochem. Soc.*, vol. 815, pp. 807–815, 2002.
- [74] C. L. Coyle, W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, H. Korner, and W. Jakob, "Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*. Purification and properties of a novel multicopper enzyme" *FEBS*, vol. 467, pp. 459–467, 1985.
- [75] S. Dell'Acqua, S. R. Pauleta, J. J. G. Moura, and I. Moura, "Biochemical characterization of the purple form of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* nitrous oxide reductase" *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 367, no. 1593, pp. 1204–12, May 2012.
- [76] A. Pomowski, W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, and O. Einsle, "Crystallization of purple nitrous oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*" *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, vol. 66, no. Pt 11, pp. 1541–3, Nov. 2010.
- [77] A. Pomowski, W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, and O. Einsle, "N₂O binding at a [4Cu:2S] copper-sulphur cluster in nitrous oxide reductase" *Nature*, vol. 477, no. 7363, pp. 234–7, Sep. 2011.

- [78] A. Wüst, L. Schneider, A. Pomowski, W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, and O. Einsle, "Nature's way of handling a greenhouse gas: the copper-sulfur cluster of purple nitrous oxide reductase" *Biol. Chem.*, vol. 393, no. 10, pp. 1067–77, Oct. 2012.
- [79] T. Matsubara and W. G. Zumft, "Identification of a Copper Protein as Part of the Nitrous Oxide-Reducing System in Nitrite-Respiring (Denitrifying) Pseudomonads" *Arch. Microbiol.*, vol. 560, pp. 322–328, 1982.
- [80] H. Beinert, "Copper A of cytochrome c oxidase, a novel, long-embattled, biological electron-transfer site" *Eur. J. Biochem.*, pp. 521–532, 1997.
- [81] S. W. Snyder and T. C. Hollocher, "Purification and some characteristics of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*" *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 14, pp. 6515–25, May 1987.
- [82] J. Riester, W. G. Zumft, and P. M. Kroneck, "Nitrous oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*. Redox properties and spectroscopic characterization of different forms of the multicopper enzyme" *Eur. J. Biochem.*, vol. 178, no. 3, pp. 751–62, Jan. 1989.
- [83] S. Ferretti, J. G. Grossmann, S. S. Hasnain, R. R. Eady, and B. E. Smith, "Biochemical characterization and solution structure of nitrous oxide reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* (NCIMB 11015)" *Eur. J. Biochem.*, vol. 259, no. 3, pp. 651–9, Feb. 1999.
- [84] C. K. SooHoo and T. C. Hollocher, "Purification and Characterization of Nitrous Oxide Reductase from *Pseudomonas aeruginosa* Strain P2" *J. Biol. Chem.*, pp. 2203–2209, 1991.
- [85] W. E. Antholine, D. H. Kastrau, G. C. Steffens, G. Buse, W. G. Zumft, and P. M. Kroneck, "A comparative EPR investigation of the multicopper proteins nitrous-oxide reductase and cytochrome c oxidase" *Eur. J. Biochem.*, vol. 209, no. 3, pp. 875–81, Nov. 1992.
- [86] D. M. Dooley, J. M. A. Mcguirl, A. C. Rosenzweig, J. A. Landin, R. A. Scott, P. J. Stephens, F. Devlin and W. G. Zumft, "Spectroscopic Studies of the Copper Sites in Wild-Type *Pseudomonas stutzeri* N₂O Reductase and in an Inactive Protein Isolated from a Mutant Deficient in Copper-Site Biosynthesis" *A. Chem. Soc.*, pp. 3006–3011, 1991.
- [87] M. L. Alvarez, J. Ai, W. Zumft, J. Sanders-Loehr, and D. M. Dooley, "Characterization of the copper-sulfur chromophores in nitrous oxide reductase by resonance raman spectroscopy: evidence for sulfur coordination in the catalytic cluster" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 4, pp. 576–87, Jan. 2001.
- [88] P. Chen, S. DeBeer George, I. Cabrito, W. E. Antholine, J. J. G. Moura, I. Moura, B. Hedman, K. O. Hodgson, and E. I. Solomon, "Electronic structure description of the $\mu(4)$ -sulfide bridged tetranuclear Cu(Z) center in N₂O reductase" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 5, pp. 744–5, Feb. 2002.
- [89] P. Chen, S. I. Gorelsky, S. Ghosh, and E. I. Solomon, "N₂O reduction by the μ_4 -sulfide-bridged tetranuclear CuZ cluster active site" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 43, no. 32, pp. 4132–40, Aug. 2004.
- [90] J. M. Charnock, a Dreusch, H. Körner, F. Neese, J. Nelson, a Kannt, H. Michel, C. D. Garner, P. M. Kroneck, and W. G. Zumft, "Structural investigations of the CuA centre of nitrous

oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri* by site-directed mutagenesis and X-ray absorption spectroscopy" *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 5, pp. 1368–81, Mar. 2000.

[91] J. K. Kristjansson, and T. C. Hollocher, "First Practical Assay for Soluble Nitrous Oxide Reductase of Denitrifying Bacteria and a Partial Kinetic Characterization" *J. B. Chem.*, vol. 255, no. 2, pp. 704-707, 1980.

[92] S. Ghosh, S. I. Gorelsky, P. Chen, I. Cabrito, J. J. G. Moura, I. Moura, and E. I. Solomon, "Activation of N₂O reduction by the fully reduced μ₄-sulfide bridged tetranuclear Cu₂Z cluster in nitrous oxide reductase" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 51, pp. 15708–9, Dec. 2003.

[93] J. M. Chan, J. a Bollinger, C. L. Grewell, and D. M. Dooley, "Reductively activated nitrous oxide reductase reacts directly with substrate" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 10, pp. 3030–1, Mar. 2004.

[94] T. Rasmussen, T. Brittain, B. C. Berks, J. Watmough, and A. J. Thomson, "Formation of a cytochrome c–nitrous oxide reductase complex is obligatory for N₂O reduction by *Paracoccus pantotrophus*" *Dalton Trans.*, pp. 3501–3506, 2005.

[95] B. C. Berks, D. Baratta, J. Richardson, and S. J. Ferguson, "Purification and characterization of a nitrous oxide reductase from *Thiosphaera pantotropha*. Implications for the mechanism of aerobic nitrous oxide reduction" *Eur. J. Biochem.*, vol. 212, no. 2, pp. 467–76, Mar. 1993.

[96] K. Fujita, J. M. Chan, J. a Bollinger, M. L. Alvarez, and D. M. Dooley, "Anaerobic purification, characterization and preliminary mechanistic study of recombinant nitrous oxide reductase from *Achromobacter cycloclastes*" *J. Inorg. Biochem.*, vol. 101, no. 11–12, pp. 1836–44, Nov. 2007.

[97] S. I. Gorelsky, S. Ghosh, and E. I. Solomon, "Mechanism of N₂O reduction by the μ₄-S tetranuclear Cu₂Z cluster of nitrous oxide reductase" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 1, pp. 278–90, Jan. 2006.

[98] S. Dell'Acqua, S. R. Pauleta, P. M. Paes de Sousa, E. Monzani, L. Casella, J. J. G. Moura, and I. Moura, "A new Cu₂Z active form in the catalytic reduction of N₂O by nitrous oxide reductase from *Pseudomonas nautica*" *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 15, no. 6, pp. 967–76, Aug. 2010.

[99] J. Sun, X. Zhang, M. Broderick and H. Fein, "Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay" *Sensors*, pp. 276–284, 2003.

[100] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin Phenol reagent" *J. Biol. Chem.*, 1951.

[101] L. M. Saraiva, G. Fauque, S. Besson, and I. Moura, "Physico-chemical and spectroscopic properties of the monohemic cytochrome c₅₅₂ from *Pseudomonas nautica* 617" *Eur. J. Biochem.*, pp. 1011–1017, 1994.

[102] P. E. Thomas, D. Ryan and D. L. W. Ryan, "An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels" *Anal. Biochem.*, pp. 168–176, 1976.

- [103] C. F. Goodhew, K. R. Brown, and G. W. Pettigrew, "Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes," *Biochem. Biophys. Acta*, pp. 288–294, 1986.
- [104] P. M. Hanna, R. Tamilarasan, and D. R. McMillin, "Cu(I) analysis of blue copper proteins" *Biochem. J.*, vol. 256, no. 3, pp. 1001–4, Dec. 1988.
- [105] S. Nadeem, P. Dörsch, and L. R. Bakken, "The significance of early accumulation of nanomolar concentrations of NO as an inducer of denitrification" *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 83, no. 3, pp. 672–84, Mar. 2013.
- [106] B. Liu, P. T. Mørkved, A. Frostegård, and L. R. Bakken, "Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH" *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 72, no. 3, pp. 407–17, Jun. 2010.
- [107] G. Braker, P. Dörsch, and L. R. Bakken, "Genetic characterization of denitrifier communities with contrasting intrinsic functional traits" *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 79, no. 2, pp. 542–54, Feb. 2012.
- [108] J. M. Dias, T. Alves, C. Bonifácio, A. S. Pereira, J. Trincão, D. Bourgeois, I. Moura, and M. J. Romão, "Structural basis for the mechanism of Ca(2+) activation of the di-heme cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617" *Structure*, vol. 12, no. 6, pp. 961–73, Jun. 2004.
- [109] L. C. Duarte, G. W. Pettigrew, T. Alves, F. M. F. Girio, B. Devreese, I. Vandenberghe, J. Van Beeumen, G. Fauque, and I. M. Y, "A cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617 active at high ionic strength: expression, purification and characterization" *Biochem. Biophysica Acta*, vol. 1434, pp. 248–259, 1999.
- [110] Amersham Biosciences, "Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing. Principles and Methods", Edition AA.
- [111] G. E. Healthcare, "Gel filtration. Principles and Methods".
- [112] L. Bergaust, Y. Mao, L. R. Bakken, and A. Frostegård, "Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrogen oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*" *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 19, pp. 6387–96, Oct. 2010.
- [113] M. Goujon, H. McWilliam, W. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern, and R. Lopez, "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI" *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. Web Server issue, pp. W695–9, Jul. 2010.
- [114] M. A Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. a McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, a Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins, "Clustal W and Clustal X version 2.0" *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, pp. 2947–8, Nov. 2007.

ANEXOS

ANEXOS

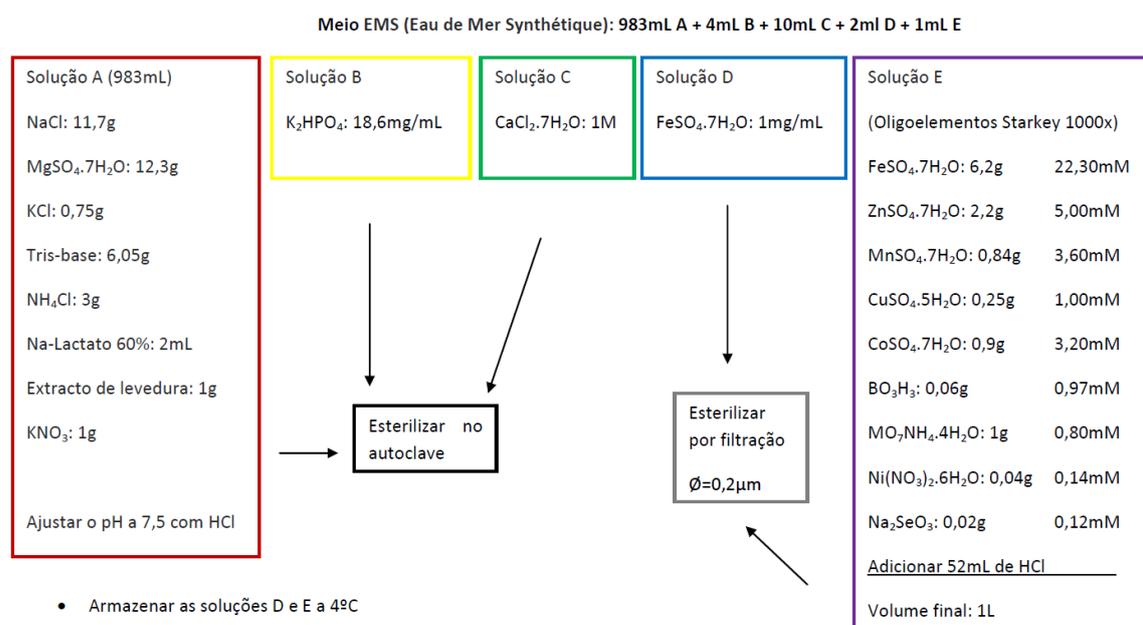
ANEXO I. MEIO EMS (DO FRANCÊS, *EAU DE MER SYNTHÉTIQUE*) LÍQUIDO

Figura A.1. Receita de Meio EMS (*Eau de Mer Synthétique*) líquido para crescimento da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. O meio é composto por 5 soluções, soluções A, B, C, D e E. As soluções A, B e C (vermelha, amarela e verde, respetivamente) são esterilizadas no autoclave a uma temperatura de 120 °C durante 20 minutos e a uma pressão de 1 bar, enquanto que as soluções D e E (azul e roxa, respetivamente) são esterilizadas por filtração à chama e conservadas a 4 °C. O Meio EMS é composto por 98,3% de solução A, 0,4% de solução B, 1% de solução C, 0,2% de solução D e 0,1% de solução E, constituídas pelos elementos evidenciados acima. A receita aqui apresentada é para um V_{total} = 1 L.

ANEXO II. MEIO EMS SÓLIDO

Meio EMS sólido: 250 mL de Agar 2X + 250 mL de EMS 2X

- Todas as soluções do meio EMS 2X têm que ser preparadas com a concentração 2X e ser adicionadas na proporção do meio EMS líquido. Deixar o agar arrefecer antes de adicionar.

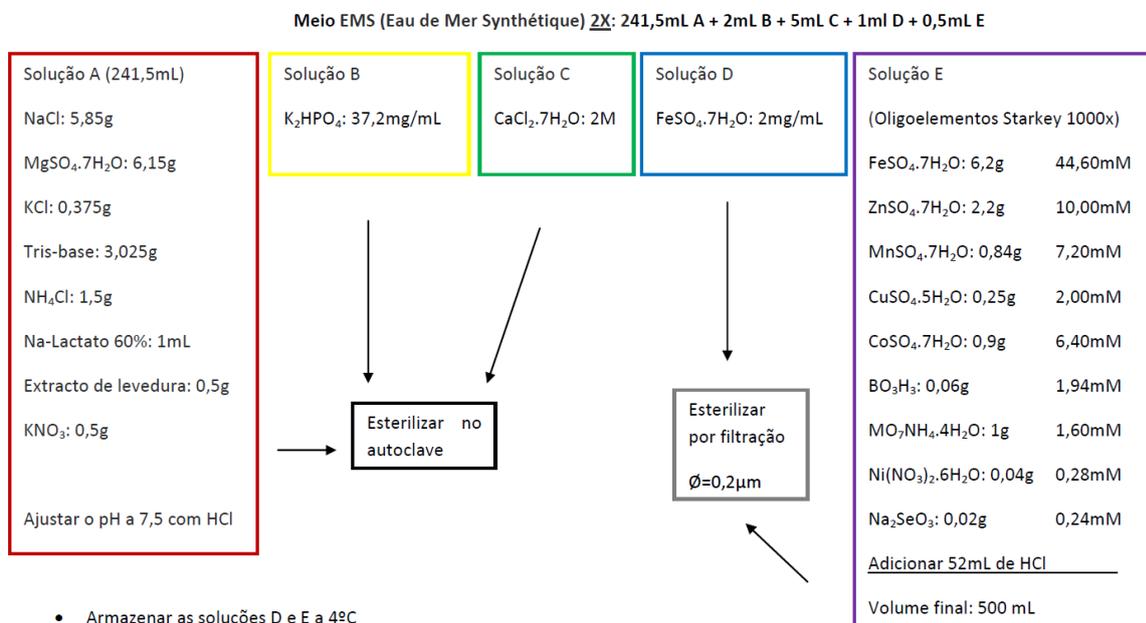


Figura A.2. Receita de Meio EMS (*Eau de Mer Synthétique*) sólido para crescimento da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. O meio é composto por 50% de Agar e 50% de EMS 2X. O Meio EMS 2X é constituído por 5 soluções, soluções A, B, C, D e E. As soluções A, B e C (vermelha, amarela e verde, respetivamente) são esterilizadas no autoclave a uma temperatura de 120°C durante 20 minutos e a uma pressão de 1 bar, enquanto que as soluções D e E (azul e roxa, respetivamente) são esterilizadas por filtração à chama e conservadas a 4 °C. O Meio EMS 2X é composto por 96,6% de solução A, 0,8% de solução B, 2% de solução C, 0,4% de solução D e 0,2% de solução E, constituídas pelos elementos evidenciados acima. A receita aqui apresentada é para um V = 250 mL (EMS 2X) e um V_{total} = 500 mL (Agar + EMS 2X).

ANEXO III. REAGENTE BIURETO (MÉTODO DE *LOWRY*)

Tabela A.I. Composição e modo de preparação da solução do reagente Biureto para método de quantificação de proteína através do método de *Lowry*.

| PREPARAÇÃO (para 500 mL) | |
|------------------------------------|--|
| i. | Dissolver 0,75 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 3 g tartarato de Na/K em 250 mL de H_2O destilada |
| ii. | Dissolver 15 g de NaOH em 100 mL de H_2O destilada |
| iii. | Juntar solução ii. à solução i. |
| iv. | Adicionar 0,5 g KI Perfazer para 500 mL com H_2O destilada |

ANEXO IV. COMPOSIÇÃO DOS GÉIS E SOLUÇÕES DE ELETROFORESE SDS-PAGE E PAGE

Tabela A.II. Composição quantitativa dos géis de poliacrilamida 12,5% (m/v) e 10% (m/v) em solução-tampão Tris-Tricina. Independentemente da percentagem do gel de separação, o gel de concentração é sempre o mesmo. O APS (do inglês, *Ammonium Persulphate*) ou Persulfato de amónia (*Sigma-Aldrich*®), e o TEMED (do inglês, *Tetramethylethylenediamine*, com a fórmula $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), da *Merck*, são adicionados imediatamente antes de colocar a solução no suporte de vidro, para evitar polimerização antes da aplicação da solução do gel no local adequado. As soluções para realização de géis são guardadas a 4 °C, à exceção do APS, que é conservado a -20 °C. O stock da mistura de Acrilamida/Bisacrilamida tem uma percentagem diferente para o gel de separação e concentração, 41,5%/1,5% (m/v) e 48%/1,5% (m/v), respetivamente. Caso o gel seja nativo, o tampão em que é efetuado o gel (Tris-HCl 3 M, pH 8,45 e 0,3% (m/v) de SDS), embora no mesmo volume, tem uma composição diferente (sem agente desnaturante, SDS).

| REAGENTE | GEL SEPARAÇÃO (12,5%) | GEL SEPARAÇÃO (10%) | GEL CONCENTRAÇÃO (4%) |
|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA | 1,1 mL | 0,9 mL | 0,2 mL |
| TAMPÃO DO GEL | 1,4 mL | 1,4 mL | 0,6 mL |
| GLICEROL 100 % | 0,7 mL | 0,7 mL | - |
| ÁGUA MILLI-Q | 1 mL | 1,25 mL | 1,6 mL |
| APS 10% | 35 µL | 35 µL | 16 µL |
| TEMED | 3,5 µL | 3,5 µL | 2,4 µL |

Tabela A.III. Composição quantitativa da solução aquosa do tampão de amostras para eletroforese SDS-PAGE. A receita apresentada é para um $V_{\text{total}} = 20$ mL. Caso se trate de um gel nativo, o tampão não contém agentes desnaturantes (β -mercaptoetanol e SDS).

| REAGENTE | QUANTIDADE |
|-------------------------|------------|
| TRIS-HCL 0,5 M PH 6,8 | 5 mL |
| SDS 10% | 8 mL |
| β -MERCAPTOETANOL | 1 mL |
| GLICEROL | 2 mL |
| AZUL BROMOFENOL | 4 mg |

Tabela A.IV. Composição quantitativa da solução corante para géis SDS-PAGE e PAGE. A solução é feita com água destilada a 250 mL. Para géis nativos, a solução corante é a mesma.

| REAGENTE | QUANTIDADE |
|-----------------------|------------|
| AZUL COOMASSIE R-250 | 5 mL |
| ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL | 8 mL |
| METANOL | 1 mL |

Anexo V. VALORES UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR APARENTE DAS AMOSTRAS DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO

Tabela A.V. Valores utilizados na determinação da massa molecular aparente da N_2OR_{micro} e N_2OR_{ana} . Sendo que $V_t = 24$ mL, $V_0 = 7,74$ mL e que a equação da reta era $K_{av} = -0,2619 (\log (MM)) + 1,657$.

| | V_e (mL) | K_{av} | log (MM) | MASSA MOLECULAR (Da) |
|-----------------------------------|--------------|-----------------|---------------|----------------------|
| RIBONUCLEASE A | 17,19 | 0,581181 | 4,1367 | 13700 |
| OVALBUMINA | 14,72 | 0,429274 | 4,6335 | 43000 |
| CONALBUMINA | 13,96 | 0,382534 | 4,8751 | 75000 |
| ALDOLASE | 12,62 | 0,300123 | 5,1953 | 156800 |
| FERRITINA | 10,63 | 0,177737 | 5,6532 | 450000 |
| N_2OR_{micro} | 13,20 | 0,335793 | 5,0447 | 110840 |
| N_2OR_{ana} | 13,22 | 0,337045 | 5,0399 | 109627 |

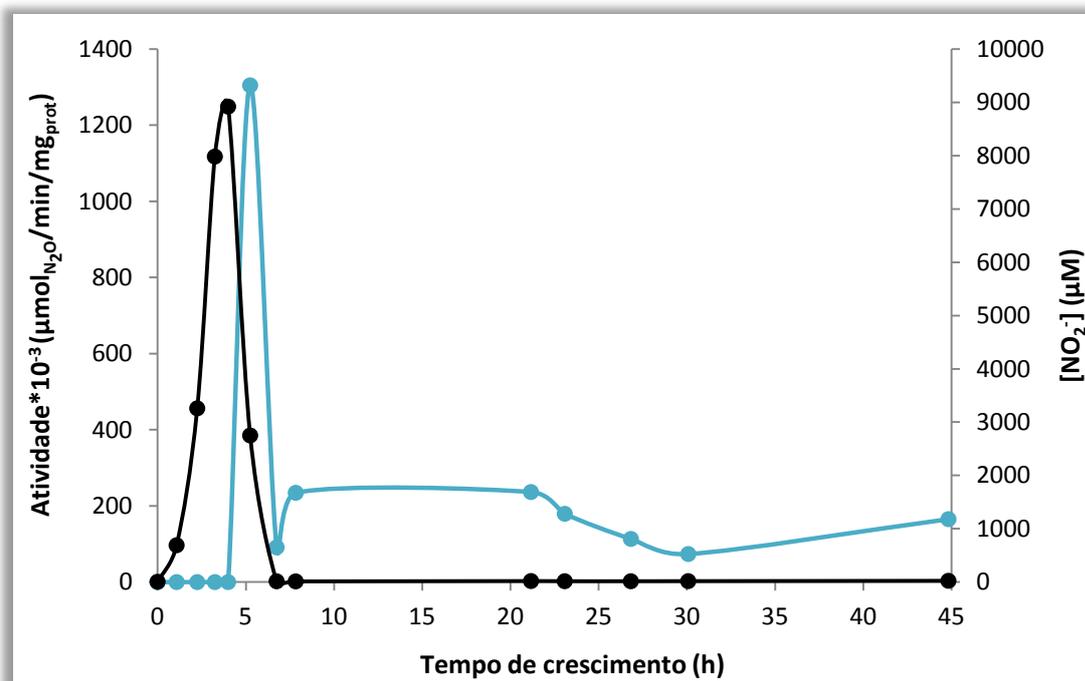
Anexo VI. PERFIS DO NITRITO E ATIVIDADE DE CRESCIMENTO EM BIOFERMENTADOR DE 10 L, pH 7,5

Figura A.3. Quantificação de nitritos a preto (eixo vertical secundário) e variação da atividade de redução do N₂O a azul (eixo vertical principal), em função do tempo de crescimento a pH 7,5 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* em biofermentador de 10 L (condições microaerófilas e na presença de 10 mM de nitrato). Crescimento que se utilizou para purificar a N₂OR_{micro}.

Anexo VII. ESPETROS TEÓRICOS DA REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO

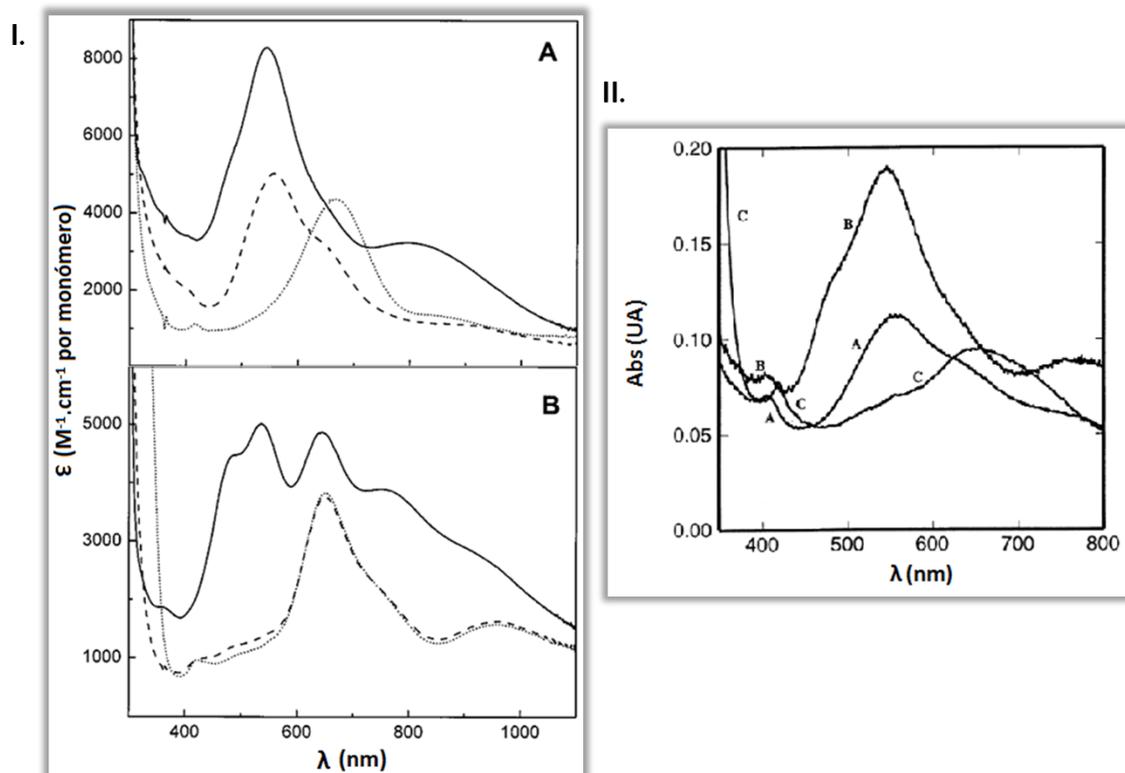


Figura A.4. Espectros da N_2OR de *Paracoccus pantotrophus*^[73] (I.), de condições anaeróbias (A.) e aeróbias (B) (em função do coeficiente de extinção molar por monômero), e de *Achromobacter xylosoxidans*^[83] (II.), de condições anaeróbias. Linhas sólidas – oxidada com ferricianeto, linhas tracejadas – reduzida com ascorbato e linhas ponteadas – reduzida com ditonito. A – como foi isolada, B – depois de oxidação sob condições anaeróbias com ferricianeto e C – depois de redução com ditonito (em atmosfera anaeróbia).

