



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**Clonagem, purificação e caracterização de duas proteínas  
accessórias de *Aspergillus fumigatus* envolvidas na  
desconstrução do bagaço de cana-de-açúcar.**

**Versão Resumida**

Luis Eduardo Gerolamo

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**Clonagem, purificação e caracterização de duas proteínas  
accessórias de *Aspergillus fumigatus* envolvidas na  
desconstrução do bagaço de cana-de-açúcar.**

**Versão Resumida**

Luis Eduardo Gerolamo

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências, Área: **Química**

Orientadora: Profa. Dra. Taisa Magnani Dinamarco

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Gerolamo, Luis Eduardo

Clonagem, purificação e caracterização de duas proteínas acessórias de *Aspergillus fumigatus* envolvidas na desconstrução do bagaço de cana-de-açúcar. Ribeirão Preto, 2018.

74 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Dinamarco, Taisa Magnani.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. LPMOs.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: GEROLAMO, Luis Eduardo

Título: Clonagem, purificação e caracterização de duas proteínas acessórias de *Aspergillus fumigatus* envolvidas na desconstrução do bagaço de cana-de-açúcar.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

# *Dedicatória*

---

Dedico esta dissertação aos meus familiares, amigos e professores que ao longo de toda a minha trajetória me incentivaram e contribuíram para que eu chegasse até aqui onde estou. Mais do que bons momentos juntos, vocês foram e continuarão sendo muito importantes em todas as etapas da minha vida. Obrigado!

# *Agradecimentos*

---

Meus sinceros agradecimentos vão:

À minha orientadora Profa. Dra. Taisa Magnani Dinamarco, com quem estou desde a época em que fazia iniciação científica, a qual não somente confiou em mim como também me auxiliou muito ao longo dos anos na pesquisa.

Às minhas amigas do grupo de pesquisa, Ma. Aline Vianna Bernardi e Dra. Paula Fagundes de Gouvêa Bizzi, não somente pela companhia, mas principalmente por sempre me ajudarem em diferentes ocasiões do dia-a-dia no laboratório.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, que generosamente disponibilizou o próprio espaço (Laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP) para que pudéssemos nos instalar provisoriamente.

Aos meus amigos Me. Emerson de Souza Santos, Dra. Laís L. L. Bálico, Dra. Alinne Costa Silva, Dr. Lucas O. Santos, João J. Franco, Dr. Vinicius Kannen Cardoso, Juliana Y. Sakita, Ma. Bianca Gasparotto, os quais conheci durante o período que ainda não tínhamos laboratório, e que foram sempre de grande ajuda.

Aos meus amigos que conheci durante a graduação no departamento de Química da FFCLRP, com os quais mantenho contato até hoje.

Aos Profs. Doutores Arthur Henrique Cavalcanti de Oliveira e Luis Gustavo Dias, os quais me ajudaram por meio de conselhos e instruções para a realização de algumas importantes análises.

Aos meus pais Luiz Antônio Gerolamo e Tânia Cristina Carletti Gerolamo que sempre foram muito presentes e nunca deixaram de me apoiar.

*Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.*

*Leonardo da Vinci*

## ▪ **Resumo**

GEROLAMO, L. E. Clonagem, purificação e caracterização de duas proteínas acessórias de *Aspergillus fumigatus* envolvidas na desconstrução do bagaço de cana-de-açúcar. 2018. 85f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil foi um dos setores que mais se desenvolveu nas últimas 4 décadas. Do caminho trilhado desde os canaviais até as bombas de combustível, cerca de 30% da massa de cana-de-açúcar utilizada para a produção de etanol é perdida na forma de palha e bagaço. O resíduo de natureza lignocelulósica, apresenta composição aproximada de 32-48% de celulose, 23-27% de hemicelulose e 19-32% de lignina. Em virtude da resistência física e mecânica oferecida por esse tipo de material, diversas metodologias como pré-tratamentos químicos ou enzimáticos têm sido propostos visando tornar mais acessível a fração polissacarídica do bagaço à quebra em açúcares fermentescíveis passíveis a conversão em etanol de segunda geração. Nesse contexto, o fungo *Aspergillus fumigatus* apesar de patogênico, apresenta enorme relevância no cenário da desconstrução de resíduos de origem lignocelulósica como o bagaço. Com a recém descoberta das chamadas mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), metaloenzimas auxiliares à degradação de compostos lignocelulósicos que apresentam notoriedade por conta de seus mecanismos de ação oxidorreduativos, as mesmas já foram encontradas em diversos tipos de microorganismos, incluindo o próprio *A. fumigatus*. Nesse sentido, o projeto em questão realizou a clonagem e expressão heteróloga na cepa *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS dos genes AFUA\_1G12560 e AFUA\_4G07850 responsáveis por codificar respectivamente as enzimas AfuLPMO9A e AfuLPMO9C de *A. fumigatus* Af293 identificadas em análises de secretoma e RNA-Seq previamente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa. Através da análise desses dois genes, foi verificado que na presença de diferentes fontes de carbono, ambos foram induzidos, de modo que na presença de SEB, CMC e Avicel, o gene AFUA\_4G07850 foi em até 3500X, 2000X e 1000X mais induzido, enquanto que o AFUA\_1G12560 apresentou um aumento moderado de 16X, 13X e 7X, respectivamente. A avaliação da conformação tridimensional, bem como o alinhamento múltiplo com enzimas de maior grau de homologia revelaram algumas características estruturais importantes como a presença de núcleos ricos em estruturas  $\beta$  em conformação de sanduíche e que importantes resíduos conservados como H20; H105; Y194 e H22; H107; Y196 encontravam-se coordenados ao centro metálico das enzimas AfuLPMO9A e AfuLPMO9C, respectivamente. Uma análise mais profunda baseada em DFT revelou que o sítio ativo de ambas assume uma geometria piramidal de base quadrada. Após purificação das LPMOs, ensaios de atividade revelaram que as enzimas AfuLPMO9A e AfuLPMO9C aumentaram respectivamente em até 1,26X e 1,20X a atividade do coquetel enzimático quando nas concentrações de 10 mg/g Avicel e presença de 0,02% NaN<sub>3</sub>. Análises mais profundas dessas enzimas auxiliares vão permitir uma maior compreensão sobre o papel desempenhado por elas na desconstrução do bagaço de cana-de-açúcar.

**Palavras chave:** *Aspergillus fumigatus*; bagaço de cana-de-açúcar; LPMOs.



## ▪ Abstract

GEROLAMO, L. E. Cloning, purification and characterization of two *Aspergillus fumigatus* accessory proteins involved in sugarcane bagasse deconstruction. 2018. 85f. Dissertation (Master's Degree). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The sugarcane agroindustry in Brazil was one of the most developed sectors in the last 4 decades. In the path from cane fields to the gas stations, about 30% of the sugarcane mass used for ethanol production is lost in form of straw and bagasse. The lignocellulosic residue presents approximately 32-48% cellulose, 23-27% hemicellulose and 19-32% lignin. Due to the physical and mechanical resistance offered by this type of material, several methodologies such as chemical or enzymatic pre-treatments have been proposed to make the polysaccharide fraction of the bagasse accessible to the break in fermentable sugars that can be converted into second generation ethanol. In this context, the fungus *Aspergillus fumigatus*, despite being pathogenic, presents enormous relevance in the scenario of deconstruction of lignocellulosic residues such as bagasse. With the recently discovery of the so-called polysaccharide lytic monooxygenases (LPMOs), metalloenzymes that help the degradation of lignocellulosic compounds and are notorious for their oxidoreductive mechanisms of action, they have already been found in several types of microorganisms, including *A. fumigatus*. In this regard, this project performed the heterologous cloning and expression in *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS of the AFUA\_1G12560 and AFUA\_4G07850 genes responsible for respectively encoding the *A. fumigatus* Af293 enzymes AfuLPMO9A and AfuLPMO9C identified in secretome and RNA-Seq results previously obtained by our research group. By analyzing these two genes, it was found that in the presence of different carbon sources, both were induced, so that in the presence of SEB, CMC and Avicel, the AFUA\_4G07850 gene was up to 3500X, 2000X and 1000X more induced while AFUA\_1G12560 presented a lower increase of 16X, 13X and 7X, respectively. The evaluation of the three-dimensional conformation as well as the multiple alignment with higher degree homology enzymes revealed some important structural features such as the presence of cores rich in  $\beta$  structures in sandwich conformation and that important conserved residues as H20; H105; Y194 and H22; H107; Y196 were coordinated to the metal center of the enzymes AfuLPMO9A and AfuLPMO9C, respectively. Further analysis based on DFT revealed that the active site of both assumes a square-based pyramidal geometry. After purification of LPMOs, activity assays revealed that the enzymes AfuLPMO9A and AfuLPMO9C were able to increase cocktail activity up to approximately 1,26X and 1,20X at concentrations of 10 mg/g Avicel and presence of 0.02% NaN<sub>3</sub>. Further analysis of these auxiliary enzymes will allow a better understanding of their role in sugarcane bagasse deconstruction.

**Key words:** *Aspergillus fumigatus*; sugarcane bagasse; LPMOs.

## ▪ Sumário

Lista de Figuras .....	i
Lista de Tabelas .....	ii
Lista de siglas e abreviações .....	iii
1. Introdução .....	1
1.1) Cana-de-açúcar no Brasil .....	1
1.2) Composição química do bagaço da cana-de-açúcar .....	2
1.3) <i>Aspergillus fumigatus</i> : características e o potencial biotecnológico de suas enzimas hidrolíticas secretadas .....	6
1.4) O papel das LPMOs na degradação da biomassa vegetal e o novo potencial do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	8
2. Objetivos .....	14
3. Metodologia.....	15
3.1) Cepas e meio de cultivo .....	15
3.2) Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	15
3.3) Extração e manipulação de RNA .....	15
3.4) Real-time PCR .....	16
3.5) Desenho dos <i>primers</i> para clonagem em plasmídeo de expressão .....	17
3.6) Reações em cadeia da polimerase (PCR) .....	18
3.7) Extração e purificação dos fragmentos amplificados.....	19
3.8) Clonagem dos genes em vetor pGEM-T Easy (Novagen) .....	19
3.9) Preparo de <i>E. coli</i> DH10-β quimiocompetentes e transformação .....	19
3.10) Preparo de estoques e miniprep.....	20
3.11) Análise da sequência dos genes clonados.....	20

3.12) Modelagem 3D, alinhamentos e otimizações dos sítios ativos .....	21
3.13) Clonagem dos genes em vetor pET28a(+) para expressão .....	21
3.14) Transformação dos vetores pET28a(+) + AFUA_1G12560 e pET28a(+) + AFUA_4G07850 em <i>E. coli</i> Rosetta™(DE3)pLysS.....	22
3.15) Expressão dos genes AFUA_1G12560 e AFUA_4G07850 em <i>E. coli</i> Rosetta™(DE3)pLysS e análise eletroforética em SDS-PAGE .....	22
3.16) <i>Western blot</i> .....	23
3.17) Testes de solubilidade .....	24
3.18) Expressões em maior escala, solubilização e purificação dos corpos de inclusão .....	25
3.19) Análise e quantificação das enzimas AfuLPMO9A e AfuLPMO9C purificadas .....	27
3.20) Testes de atividade das LPMOs .....	28
4. Conclusões .....	29
5. Referências bibliográficas .....	31
6. Parte suplementar .....	40

## ▪ **Lista de Figuras**

Figura 1: Ilustração da cana-de-açúcar e da estrutura química da biomassa lignocelulósica.....	2
Figura 2: Ação sinérgica de diferentes enzimas envolvidas na degradação de celulose .....	3
Figura 3: Cadeia de hemicelulose hipotética e atuação de enzimas envolvidas na clivagem da cadeia principal e ramificações .....	4
Figura 4: Estrutura geral da molécula de lignina e suas principais subunidades .....	5
Figura 5: Foto de microscopia de <i>Aspergillus fumigatus</i> destacando a estrutura dos conidióforos .....	7
Figura 6: Conformações tridimensionais destacando os loops das AA9s e AA10s.....	10
Figura 7: Mecanismo de reação das enzimas das LPMOs ativas em C1 ou C4 e produtos gerados pela oxidação da celulose.....	12
Figura 8: Caracterização funcional e distribuição percentual das proteínas identificadas no secretoma de <i>A. fumigatus</i> após 24 horas.....	13
Figura Suplementar 1: Análise qualitativa da purificação das amostras de RNA total extraído de <i>A. fumigatus</i> .....	40
Figura Suplementar 2: Mapa do vetor pGEM – T Easy.....	41
Figura Suplementar 3: Mapa do vetor pET28a(+) .....	41

▪ **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Sequência dos componentes das sondas empregadas para a realização do qRT-PCR .....17

Tabela 2: Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes .....18

▪ **Lista de siglas e abreviações**

AA	Atividade Auxiliar (classe)
B3LYP	Becke, parâmetro 3, Lee-Yang-Parr
BSA	Albumina de soro bovino
CAZy	<i>Carbohydrate-active enzymes</i> (banco de dados)
CBM	Módulo de ligação a carboidrato
cDNA	DNA complementar
CE	Carboidrato-esterase
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
DFT	Teoria Funcional da Densidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido dinitrosalicílico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
D.O.	Densidade óptica
DPEC	Dietil pirocarbonato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtOH	Etanol
FPU	Unidade de papel de filtro
g	Gramma
<i>g</i>	Força centrífuga relativa
GH	Glicosil hidrolase
h	Hora
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-galactosídeo
Kb	Quilobase
KDa	Quilodalton
Kgf	Quilograma força
L	Litro
LB	Luria-Bertani (meio)
LPMO	Mono-oxigenase lítica de polissacarídeo
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanesulfônico
mRNA	RNA mensageiro
NaOAc	Acetato de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
ORF	Fase de leitura aberta
p/	Para
pb	Pares de base
PBS-T	Salina tamponada com fosfato adicionada de Tween® 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
pH	Potencial hidrogeniônico
PL	Polissacarídeo-liase
pmol	Picomol
p/v	Relação peso/volume

qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SEB	Bagaço de cana-de-açúcar explodido
SLS	Lauril sarcosinato de sódio
SOB	<i>Super Optimal Broth</i> (meio)
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> com repressão catabólica (meio)
TAE	Tris-acetato-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i> (meio)
TCEP	Tris-(2-carboxietil)-fosfina
TBS-T	Tris-salina adicionada de Tween® 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
U	Unidade
V	Volts
v/v	Relação volume/volume
YAG	<i>Yeast-Agar-Glucose</i> (meio)
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (meio)
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μmol	Micromol
Å	Angstrom
®	Marca registrada
™	<i>Trademark</i>
°	Grau
°C	Grau Celsius

### **Siglas de Aminoácidos**

A	Alanina (Ala)
C	Cisteína (Cys)
D	Aspartato (Asp)
E	Glutamato (Glu)
F	Fenilalanina (Phe)
G	Glicina (Gly)
H	Histidina (His)
I	Isoleucina (Ile)
K	Lisina (Lys)
L	Leucina (Leu)
M	Metionina (Met)
N	Asparagina (Asn)
P	Prolina (Pro)
Q	Glutamina (Gln)
S	Serina (Ser)
T	Treonina (Thr)
V	Valina (Val)
W	Triptofano (Trp)
Y	Tirosina (Tyr)

## 1. Introdução

### 1.1) Cana-de-açúcar no Brasil

O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil é uma atividade agrícola amplamente praticada. A produção nacional em massa de cana-de-açúcar estimada para a safra 2017/2018 (3º levantamento) é de aproximadamente 635 milhões de toneladas, o que corresponde a um decréscimo de 3,3 % com relação ao levantamento da safra anterior (CONAB, 2017). Tais resultados colocam o Brasil na posição de liderança mundial, estando bem à frente de outros importantes países produtores, os quais em ordem de precedência englobam Índia, China, Tailândia, Paquistão, México, Colômbia, Indonésia, Filipinas e Estados Unidos (Word Atlas, fonte: <http://www.worldatlas.com/articles/top-sugarcane-producing-countries.html> 2018). Dados apontam que da área colhida esperada para 2018 de cerca de 8,7 milhões de hectares, o estado de São Paulo responde por 4,5 milhões de hectares, o equivalente a 52 % da área total. Com relação ao açúcar recuperável total (ART), estima-se que de aproximadamente 88 milhões de toneladas esperadas, 45 % seja voltado à produção de açúcar comercial e 55 % destinado à produção de etanol (CONAB, 2017).

No Brasil, o tradicional processo de obtenção do chamado etanol de primeira geração consiste no esmagamento dos colmos de cana-de-açúcar previamente lavados. Uma vez obtido o caldo ou melaço rico em teor de sacarose, procede-se com a precipitação e eliminação de impurezas para a fermentação anaeróbia do açúcar presente (sacarose) realizada pelas leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. O álcool combustível cuja graduação final é de 99,5 % representa uma fonte de energia renovável (Novacana, fonte: [www.novacana.com/etanol/fabricacao/](http://www.novacana.com/etanol/fabricacao/)). Em comparação com outros combustíveis fósseis que representam 82% das emissões de gases responsáveis pelo efeito estufa, não somente é reduzida a emissão de gases poluentes por parte dos veículos que o utilizam, como também a própria cultura é responsável pela captura de um saldo favorável de 33,8 toneladas de CO<sub>2</sub>/hectare/ciclo para realização de fotossíntese (Chohfi *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2012). Devido à alta capacidade da cana-de-açúcar em converter CO<sub>2</sub> em açúcares C4 como a sacarose e em polímeros como celulose e hemicelulose, estima-se que frente à gasolina, a taxa de redução da emissão de gases causadores do efeito estufa seja de 40-62%. Outra vantagem reside no fato de que de acordo com estimativas de 2005, cada unidade de energia oriunda de fontes



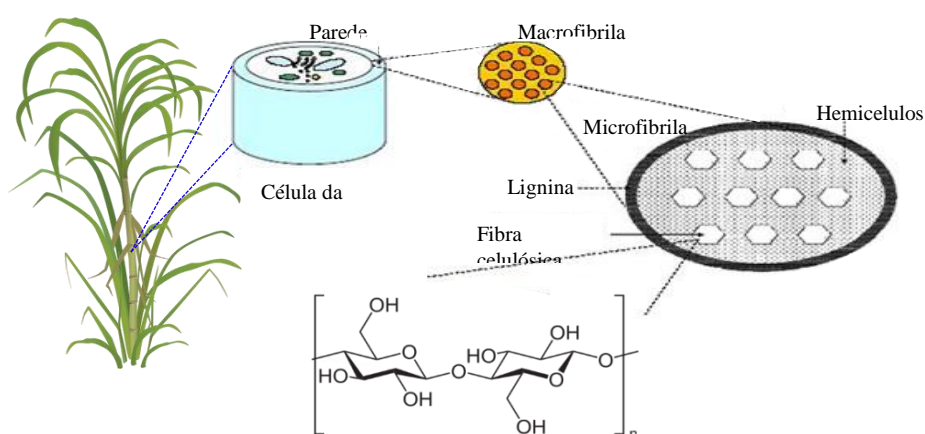
fósseis empregada na produção de etanol gere até 9,3 unidades de energia renovável, contribuindo ainda mais para a sustentabilidade do processo (Lopes *et al.*, 2016).

## 1.2) Composição química do bagaço da cana-de-açúcar

A biomassa lignocelulósica é a maior fonte renovável de carboidratos naturais do mundo. Está presente na parede celular de tecidos vegetais apresentando microfibrilas constituídas por três componentes principais que são a celulose, a hemicelulose e a lignina (Santos *et al.*, 2012). No Brasil, dados do processo de moagem indicam que para cada 1 tonelada de cana são gerados aproximadamente 250 Kg de bagaço, dessa forma, para a safra 2017/2018 (CONAB, 2017) é esperado uma produção do mesmo superior a 158 milhões de toneladas (Alves, 2006).

O bagaço da cana-de-açúcar é um exemplo de material lignocelulósico que apresenta uma composição média percentual de 32-48% de celulose, 23-27% de hemicelulose e 19-32% de lignina. Esse material apresenta caráter recalcitrante devido à forte interação existente entre esses componentes, o que dificulta o acesso às frações de açúcares compreendidas pela celulose e hemicelulose e por consequência a ação de enzimas hidrolíticas (Santos *et al.*, 2012), conforme ilustrado na Figura 1.

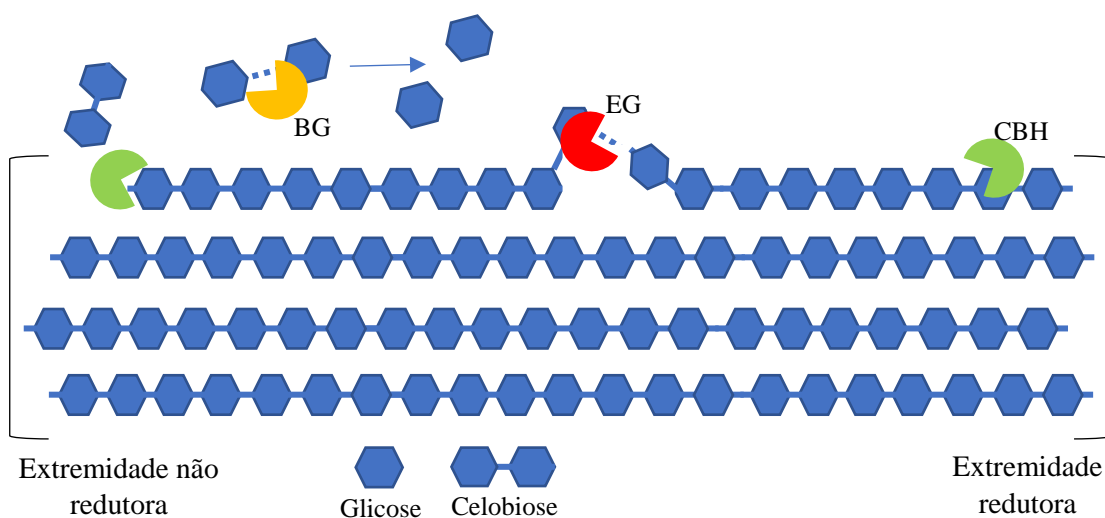
Levando-se em conta a resistência oferecida por esses componentes encontrados na parede celular dos vegetais, diferentes pré-tratamentos de naturezas física, química, biológica e térmica têm sido empregados para facilitar o rompimento da parede celular e possibilitar a conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol (Jin *et al.*, 2016).



**Figura 1:** Ilustração da cana-de-açúcar e da estrutura química da biomassa lignocelulósica (Figura Adaptada) (ClipartFest, fonte: <https://clipartfest.com>; Zhang, 2008).

A celulose é o polímero natural mais abundante da Terra cuja estrutura pode ser dividida em 3 níveis organizacionais. O primeiro nível é constituído pela sequência de resíduos de  $\beta$ -D-Glicose, unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -D (1 $\rightarrow$ 4) que dão origem a estrutura homopolimérica da celulose cuja fórmula geral é  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . O segundo nível é descrito pela conformação molecular dada pela disposição espacial dos monômeros, ou seja, ele descreve não somente a distância entre as ligações como também os ângulos moleculares influenciados pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. Por último, o terceiro nível de organização relaciona-se às interações intermoleculares estabelecidas entre moléculas adjacentes de celulose a qual confere ao polímero estrutura linear, resistência à tensão e insolubilidade em uma gama de solventes. Em geral de 6 a 8 moléculas de celulose interagem originando uma estrutura fina e longa de microfibrila, sobre a qual aderem-se moléculas de hemicelulose (Santos *et al.*, 2012).

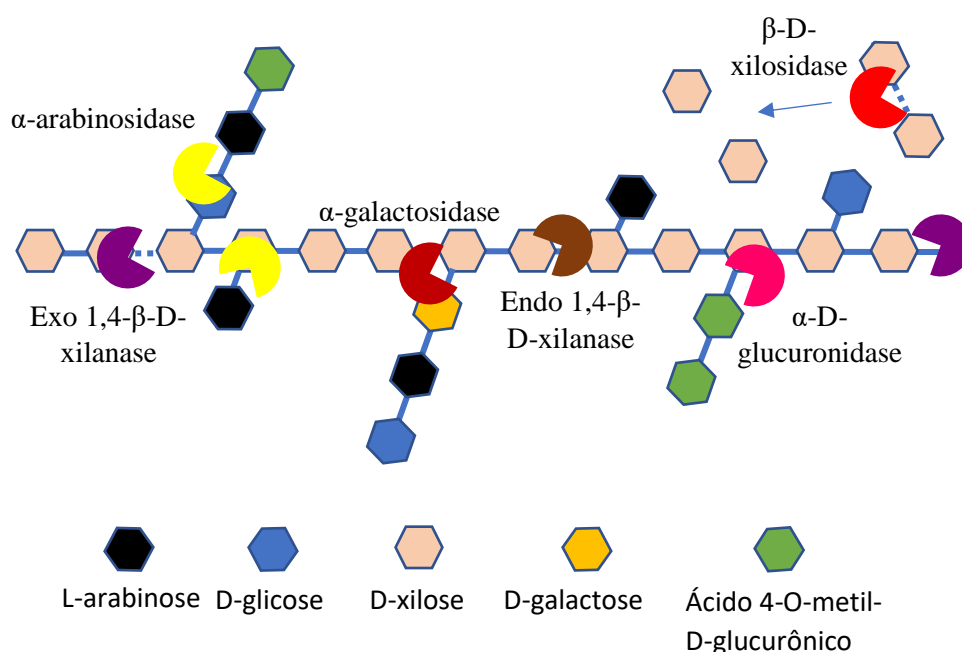
A hidrólise enzimática da celulose depende principalmente da ação sinérgica de 3 enzimas diferentes: as endoglucanases (EGs) (E.C. 3.2.1.4) que hidrolisam ligações glicosídicas no interior do polímero e geram extremidades redutoras; as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBHs) (E.C. 3.2.1.91) que atuam clivando as mesmas ligações, porém nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia liberando moléculas de celobiose; e  $\beta$ -glucosidades (BGs) (E.C. 3.2.1.21) que clivam as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da celobiose e de outros dímeros de glicose como a gentiobiose ( $\beta$ -1,6) e trealose ( $\alpha,\alpha$ -1,1) (Whitaker, 1993; Carvalho *et al.*, 2009; Cota *et al.*, 2015). O esquema da hidrólise da celulose pode ser conferido na Figura 2 abaixo.



**Figura 2:** Ação sinérgica de diferentes enzimas envolvidas na degradação de celulose (figura baseada em imagem de (Carvalho *et al.*, 2009). Legenda: CBH: celobiohidrolases; EG: endoglucanases; BG:  $\beta$ -glucosidades.

As hemiceluloses apresentam como características natureza amorfa, cadeias com diversas ramificações e o fato de serem heteropolímeros complexos com composição variável constituído majoritariamente por monômeros de D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico. O açúcar mais abundante é a D-xilose presente na forma de polímeros de xilana, arabinoxilana e xiloglucana, moléculas cujos esqueletos principais são formados por ligações  $\beta$ -1,4 entre as moléculas de D-xilose. Além disso, outras estruturas como mananas, glucomanas e galactomananas também podem ser encontradas (Scheller & Ulvskov, 2010; Santos *et al.*, 2012).

Devido a essas características, a fração hemicelulósica confere à biomassa maior estabilidade e flexibilidade associando-se tanto a celulose como a lignina e são mais passíveis a hidrólise ácida que a celulose devido à maior desorganização estrutural. A hidrólise dos diferentes tipos de hemiceluloses, como por exemplo, as moléculas de xilana, envolvem enzimas como endo 1,4- $\beta$ -D-xilanases e  $\beta$ -D-xilosidases as quais atuam na cadeia principal, além de outras enzimas complementares atuando na clivagem das ramificações, como pode ser observado na figura 3 (Carvalho *et al.*, 2009).

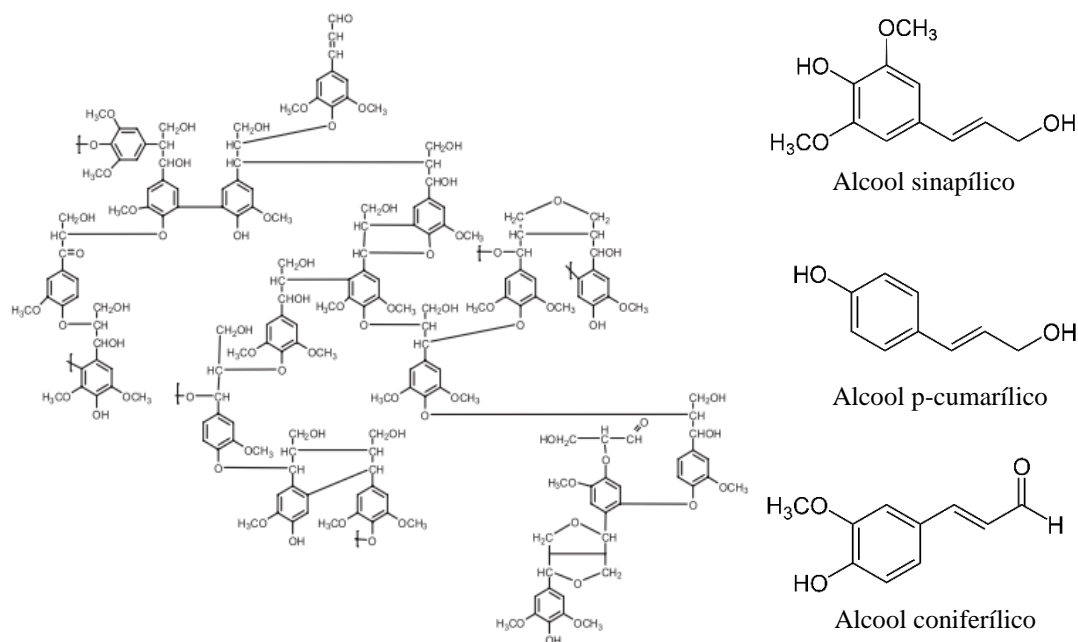


**Figura 3:** Cadeia de hemicelulose hipotética e atuação de enzimas envolvidas na clivagem da cadeia principal e ramificações (figura baseada em imagem de (Carvalho *et al.*, 2009).

A lignina é a segunda molécula mais abundante da biomassa e a principal barreira física a ação de enzimas hidrolíticas. É um heteropolímero amorfo, composto

principalmente de subunidades de fenilpropanóides C6C3, ou C9 como o álcool p-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico, que diferentemente dos outros dois componentes da biomassa não se classifica como um polissacarídeo (Budziak *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2012). A sua estrutura geral é exibida na Figura 4.

Devido à sua complexa estrutura, a lignina é a fração da biomassa menos explorada, contudo estudos apontam que a mesma apresenta enorme potencial para a síntese de precursores químicos e de compostos aromáticos como benzeno, xileno, fenol, estireno, guaiacol, eugenol, siringol, catecol e vanilina. As principais enzimas envolvidas na sua degradação são as lacases (EC 1.3.10.2); as manganês peroxidases (MnPs) (1.11.1.13); as lignina peroxidases (LiPs) (EC 1.11.1.14); e as peroxidase versáteis (VPs) (EC 1.11.1.16), sendo as três últimas dependentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ambas as enzimas apresentam em comum mecanismos redox mediados por centros metálicos oxidados capazes de atacar unidades fenólicas e gerar radicais ao longo da estrutura da lignina, contribuindo assim para a fragmentação da mesma em unidades menores. Essas enzimas são posteriormente reoxidadas através de diferentes rotas e tornam-se ativas novamente (Heinzkill *et al.*, 1998; Varanasi *et al.*, 2013; Fernández-Fueyo *et al.*, 2014; Sana *et al.*, 2017).



**Figura 4:** Estrutura geral da molécula de lignina e suas principais subunidades (Figura Adaptada) (Santos *et al.*, 2012).

A forte interação entre os três componentes mencionados explica o fato desses materiais serem de difícil hidrólise. Atualmente, estima-se que cerca de 47% de todo

custo operacional associado com a produção de etanol celulósico seja exclusivamente em decorrência da utilização de enzimas. Estudos buscando alternativas eficientes e de baixo custo para a conversão da matriz polissacarídica recalcitrante em açúcares fermentescíveis livres são imprescindíveis para a viabilidade da produção de etanol de segunda geração e sua competitividade frente a outros combustíveis (Santos *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2017; Tangthirasunun *et al.*, 2017).

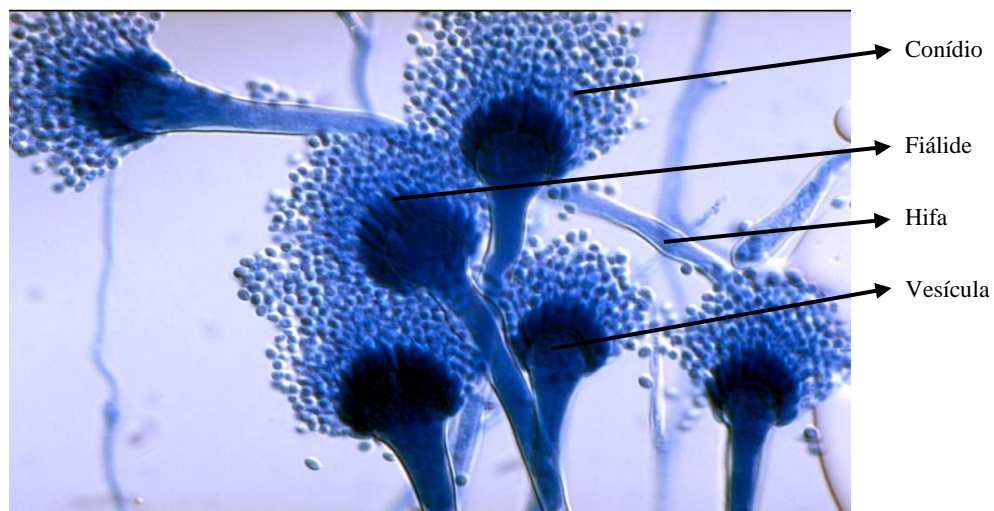
### **1.3) *Aspergillus fumigatus*: características e o potencial biotecnológico de suas enzimas hidrolíticas secretadas**

Na natureza, os fungos filamentosos e aqueles de decomposição branca desempenham uma importante função na degradação da biomassa de plantas, pois secretam diferentes enzimas específicas como celulases e hemicelulases que atuam na clivagem dos polissacarídeos (Bennett, 1998; Tangthirasunun *et al.*, 2017; Miyauchi *et al.*, 2017). No entanto, pouco ainda é conhecido sobre a resposta dos fungos e bactérias frente aos diferentes materiais lignocelulósicos (Frommhagen *et al.*, 2015).

Fungos do gênero *Aspergillus* têm sido empregados para a produção de enzimas extracelulares, aminoácidos e ácidos orgânicos para fins comerciais. A produção de ácido cítrico por exemplo, ocorre principalmente através da fermentação de fontes de carbono mediada por *Aspergillus niger*, uma vez que apresenta alto rendimento e devido ao fato de ser um fungo cujo metabolismo é bem conhecido. Recentemente, foi reportado que modificações genéticas em *Aspergillus terreus* tornou possível obter níveis consideráveis de ácido itacônico através de sacarificação e fermentação simultânea usando amido de milho (Schuster *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017).

O *Aspergillus fumigatus* é uma espécie saprofítica termorresistente que pode crescer em temperaturas superiores a 55°C, sendo esta uma característica que torna mais fácil a sua diferenciação das outras espécies. Apresenta comportamento reprodutivo majoritariamente assexuado desenvolvendo corpos denominados conidióforos que são responsáveis pela produção de esporos. Suas colônias, as quais se desenvolvem rapidamente em meios contendo ágar mantidos a 37°C, apresentando coloração verde-acinzentada, são geralmente granulares e formam abundantes conídios. A micromorfologia é marcada pela presença de hifas hialinas e septadas apresentando paredes paralelas, além de conidióforos que apresentam ao microscópio óptico aspecto de vesículas em forma de frasco com uma série de fiáides uniseriadas recobrimo dois

terços da parte superior da estrutura. Os conídios, de coloração verde, possuem 2–3 µm de diâmetro e são produzidos em cadeias paralelas, conforme ilustrado na figura 5 (Latgé, 2001; Xavier *et al.*, 2006).



**Figura 5:** Foto de microscopia (aumento de 400X) de *Aspergillus fumigatus* destacando a estrutura dos conidióforos (Figura Adaptada).

(PFDB, fonte: [www.pfdb.net/photo/mirhendi\\_h/box020909/standard/a\\_fumigatus\\_s.jpg](http://www.pfdb.net/photo/mirhendi_h/box020909/standard/a_fumigatus_s.jpg), 2009).

Devido à sua patogenicidade, estudos voltados para a aplicação industrial de enzimas do *A. fumigatus* são ainda muito recentes. Com a elucidação do seu genoma em 2005, foi possível a identificação de importantes genes envolvidos na expressão de fatores de virulência, metabólitos secundários, enzimas e proteínas em geral (Nierman *et al.*, 2005).

O *A. fumigatus* é considerado um excelente produtor xilanases sendo capaz de secretar diferentes tipos das mesmas em quantidades satisfatórias quando crescido em meios contendo diferentes tipos de carboidratos simples ou complexos, (Basso *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2017; de Gouvêa *et al.*, *submetido*). Estudos realizados utilizando cepas de *A. fumigatus* LF9 identificaram uma elevada expressão de celulasas e hemicelulasas quando o fungo cresceu em meios de cultura contendo fontes de carbono como celulose e xilose (Adav *et al.*, 2015). Além disso, foi observada a secreção de xiloglucana AfXEG74 por *A. fumigatus* FGSC A1100 com alta atividade específica (11,9 µmol/min/mg), resultado próximo ao descrito para a enzima análoga EglC de *Aspergillus niger*, (19,0 µmol/min/mg), indicando o potencial das enzimas de *Aspergillus fumigatus* na desconstrução de importantes componentes da hemicelulose (Damasio *et al.*, 2017).

Da mesma forma, quando comparado com diferentes isolados de *Trichoderma reesei*, observou-se que o *A. fumigatus* não secreta em quantidade tantas enzimas (endoglucanases e celulasas em geral) como a linhagem de *T. reesei* QM9414. No entanto, as enzimas secretadas por ele apresentam maior taxa de atividade específica, apresentando um enorme potencial para a biodegradação de resíduos contendo celulose (Basso *et al.*, 2010).

Nesse contexto, estudos realizados em nosso laboratório avaliando o transcriptoma do *A. fumigatus* quando crescido em bagaço de cana-de-açúcar explodido (SEB), revelaram diferentes genes codificantes de CAZymes (enzimas ativas sob carboidratos) com níveis de transcrição aumentados na presença dessa biomassa, sendo muitas das principais enzimas envolvidas na degradação da celulose e hemicelulose, como endoglucanases, celobiohidrolases,  $\beta$ -glicosidases, endoxilanases, xilosidases, LPMOs, swoleninas, arabinofuranosidases, entre outras (de Gouvêa *et al.*, *submetido*).

#### **1.4) O papel das LPMOs na degradação da biomassa vegetal e o novo potencial do fungo *Aspergillus fumigatus***

As enzimas pertencentes à classe das LPMOs, denominadas mono-oxigenases líticas de polissacarídeos foram recentemente descobertas e apresentam capacidade de degradar a recalcitrante biomassa lignocelulósica. Tais enzimas inicialmente classificadas como sendo das famílias GH61 e CBM33 atualmente são designadas como pertencentes às famílias AA9 e AA10, de acordo com a classificação do banco de dados CAZy ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)), sendo descritas cerca de 369 enzimas AA9 e 3142 enzimas AA10. (Cantarel *et al.*, 2009). Tais números relativamente baixos demonstram a importância do melhor conhecimento dessa classe de enzimas (acesso em 24/01/2018). Duas novas famílias de LPMOs denominadas AA11 e AA13, foram recentemente classificadas, mas ainda pouco se sabe sobre a atividade dessas enzimas.

Diferentemente da ação de enzimas canônicas envolvidas na quebra de carboidratos, as LPMOs apresentam um mecanismo de oxidorredução atuando principalmente sob regiões cristalinas da matriz polissacarídica favorecendo, posteriormente, a ação das enzimas envolvidas na hidrólise (Dimarogona *et al.*, 2012; Hemsworth *et al.*, 2014; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017; Courtade *et al.*, 2017).

Além disso, as LPMOs são capazes de impulsionar a atividade de enzimas como celulasas, através da clivagem de regiões cristalinas do polímero de celulose. A ação oxidativa dessas enzimas ocorre comprovadamente em átomos de carbono C1 formando

lactonas que espontaneamente se convertem em ácidos aldônicos, e nos átomos C4 levando a formação de cetonas que se convertem em gem-dióis mais estáveis. Algumas LPMOs ainda podem apresentar ação oxidativa combinada e serem capazes de oxidar átomos C6 dos anéis, como observado, por exemplo, durante a ação conjunta das enzimas PaGH61A e PaGH61B de *Podospora anserina* (Dimarogona *et al.*, 2012; Bey *et al.*, 2013; Levasseur *et al.*, 2013; Corrêa *et al.*, 2016; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017).

As enzimas das famílias AA9 e AA10 apresentam algumas características em comum como a ocorrência exclusiva em organismos aeróbios, presença de braçadeiras de histidina em seus centros catalíticos que são comprovadamente metalo-dependentes. O metal que se encontra coordenado ao sítio ativo é um átomo de cobre ligado ao N de um resíduo de histidina localizado na região N terminal, e a dois outros átomos de nitrogênio, sendo um deles proveniente da cadeia lateral do mesmo resíduo e segundo de uma cadeia lateral de outra histidina, o que resulta em uma estrutura em T.

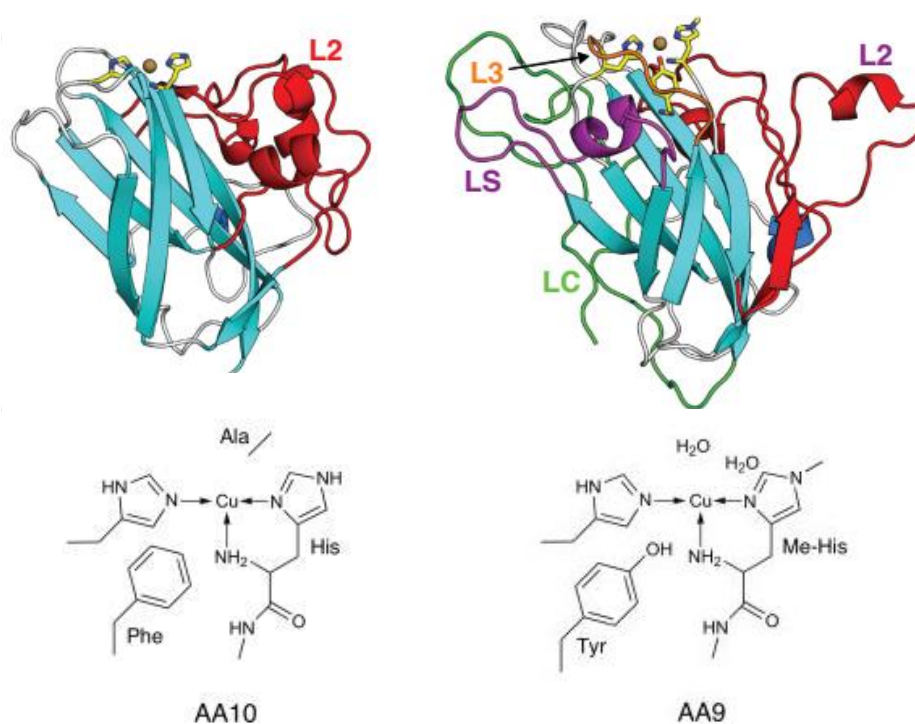
Além dessas, outras características são importantes, como: 1) a necessidade de uma molécula redutora ou da enzima celobiose desidrogenase (CDH) doadora de elétrons para o átomo  $\text{Cu}^{2+}$ ; 2) o formato achatado dos seus centros ativos que possivelmente facilita a interação com as porções cristalinas dos polissacarídeos; 3) núcleos amplamente constituídos por 7 a 8 regiões de folhas- $\beta$  antiparelas em conformação de sanduíche, com hélices e loops interligando, os quais são responsáveis pela topologia do sítio ativo e pela especificidade das enzimas por um dado substrato; e 4) presença de módulos de ligação (CBMs) que são domínios frequentemente encontrados responsáveis por auxiliar a ligação das enzimas a um dado substrato (Dimarogona *et al.*, 2012; Hemsworth *et al.*, 2014; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017; Courtade *et al.*, 2017; Bertini *et al.*, 2018). Na Figura 6 a seguir é possível observar as diferenças no sítio ativos de enzimas AA9 e AA10.

Em ambas as famílias, nos loops interconectando as folhas- $\beta$  do núcleo das LPMOs, AA9 (entre as estruturas- $\beta$  1 e 2) e AA10 (entre as estruturas- $\beta$  1 e 3) estão localizados os motivos denominados L2, os quais contém 1 ou 2 resíduos aromáticos, responsáveis pelo ancoramento do substrato às enzimas por meio de interações apolares dos anéis aromáticos com o esqueleto carbônico dos açúcares. Por outro lado, as enzimas AA9 e AA13 apresentam em comum a presença de loops adicionais LC (próximo à extremidade C-terminal) e LS (curto), os quais também são capazes de estabelecer interações apolares com os carboidratos (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017). Dados de ressonância magnética nuclear, cristalografia de raios-x e modelagem computacional



sugerem o estabelecimento de importantes interações fracas entre os resíduos aromáticos e subunidades de polissacarídeos (Bertini *et al.*, 2018).

As AA9s em particular ainda apresentam um loop curto L3, no qual encontra-se inserida a histidina coordenada ao cobre que não está localizada na região N-terminal. Os loops L3 estão associados com a especificidade das LPMOs sob os carbonos localizados nas posições C1 ou C4, de modo que comprovadamente os mesmos pertencentes às ativas em C4 sempre apresentam um primeiro resíduo com grupo aromático que pode ser uma histidina ou tirosina, além de uma serina conservada antes da histidina da braçadeira (Liu *et al.*, 2017).



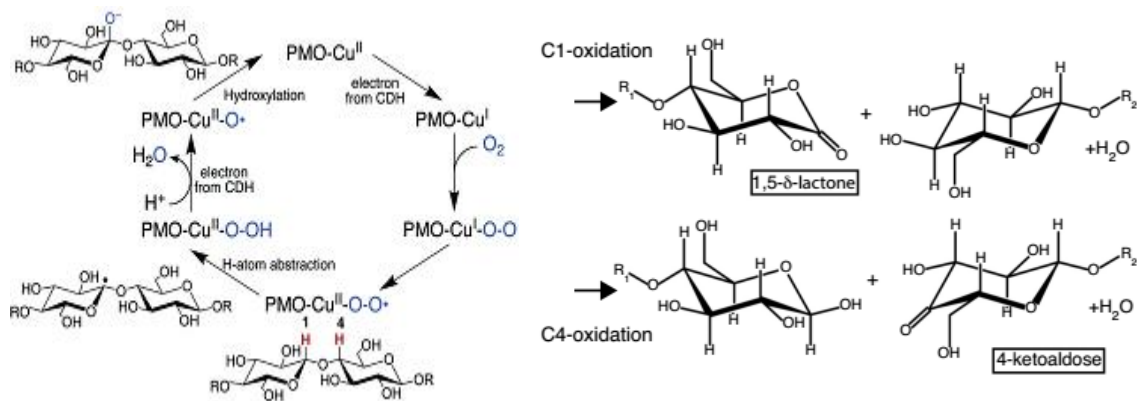
**Figura 6:** Conformações tridimensionais destacando os loops das LPMOs CBP21 da bactéria *Serratia marcescens* (esquerda); e da NcLPMO9M do fungo *Neurospora crassa* (direita). Acima são exibidas as respectivas estruturas gerais dos sítios ativos presentes nas enzimas AA10 e AA9. (Figura Adaptada) (Fontes: Hemsworth *et al.*, 2014; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017).

Enzimas AA9 são secretadas por fungos e apresentam homologia com as AA10 produzidas tipicamente por bactérias (Hemsworth *et al.*, 2014). Um número muito grande de enzimas AA9 vem sendo identificado especialmente no secretoma de fungos degradadores de madeira, o que torna evidente a correlação com o tipo de substrato hidrolisado (Li *et al.*, 2015; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017).

Com relação as enzimas pertencentes a classe AA10, apesar de apresentarem sequências genéticas distintas, suas formas de ação e estruturas 3D são semelhantes às de AA9. Uma de suas particularidades é a presença conservada de Alanina na esfera de coordenação secundária além de uma menor quantidade de resíduos de aminoácidos aromáticos presentes na superfície e geometria bipiramidal trigonal, quando o centro metálico está em sua forma oxidada Cu (I) (Hemsworth *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017).

Como pode ser observado na figura 7, o mecanismo oxidativo envolvido na degradação dos carboidratos pelas LPMOs incluindo as famílias AA9 e AA10, apesar de ainda não ser totalmente elucidado, ocorre através da redução do átomo central de cobre ( $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ ) mediada pela ação da enzima celobiose desidrogenase (CDH) ou por uma molécula doadora de elétrons como ácido ascórbico, o que torna possível a ligação com uma molécula de  $\text{O}_2$ . Na sequência, por meio de uma transferência interna de elétrons, ocorre a formação do intermediário superóxido de cobre que possui a habilidade de abstrair radicais  $\text{H}\cdot$  dos carbonos nas posições 1,4 ou 6. Com a doação, um segundo elétron proveniente do grupo heme de uma CDH ou de outra substância redutora, ocorre a quebra homolítica da ligação entre o metal e o hidropéroxido, originando a espécie radicalar  $\text{Cu(II)O}\cdot$  no sítio ativo, que por sua vez liga-se ao carbono que teve o hidrogênio abstraído adicionando um átomo de oxigênio negativamente carregado ( $\text{O}^-$ ). O resultado final é a regeneração do centro metálico ao estado  $\text{Cu}^{2+}$  e a formação de moléculas como cetoaldoses ou lactonas que se rearranjam em ácidos aldônicos. A formação de ambas as moléculas leva ao enfraquecimento da ligação glicosídica resultando no rompimento da mesma e a formação de duas novas extremidades passíveis a ação de outras enzimas CAZy (Phillips *et al.*, 2011; Dimarogona *et al.*, 2012; Hemsworth *et al.*, 2014; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017).

Estudos recentes de análise computacional demonstraram que em comparação com o  $\text{O}_2$ , as LPMOs possuem maior afinidade por moléculas de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Assim sendo, é provável que na natureza outras rotas envolvendo a formação direta de um radical  $\text{Cu(II)O}\cdot$  possibilite a abstração de um hidrogênio em C1 ou C4 seguida de uma hidroxilação na mesma posição do monômero de carboidrato. Vale destacar que nesse modelo ainda é necessário a doação de elétrons para ativar as LPMOs reduzindo o cobre para o estado Cu(I), e que rotas como essa ainda carecem de mais análises (Bissaro *et al.*, 2017; Bertini *et al.*, 2018).

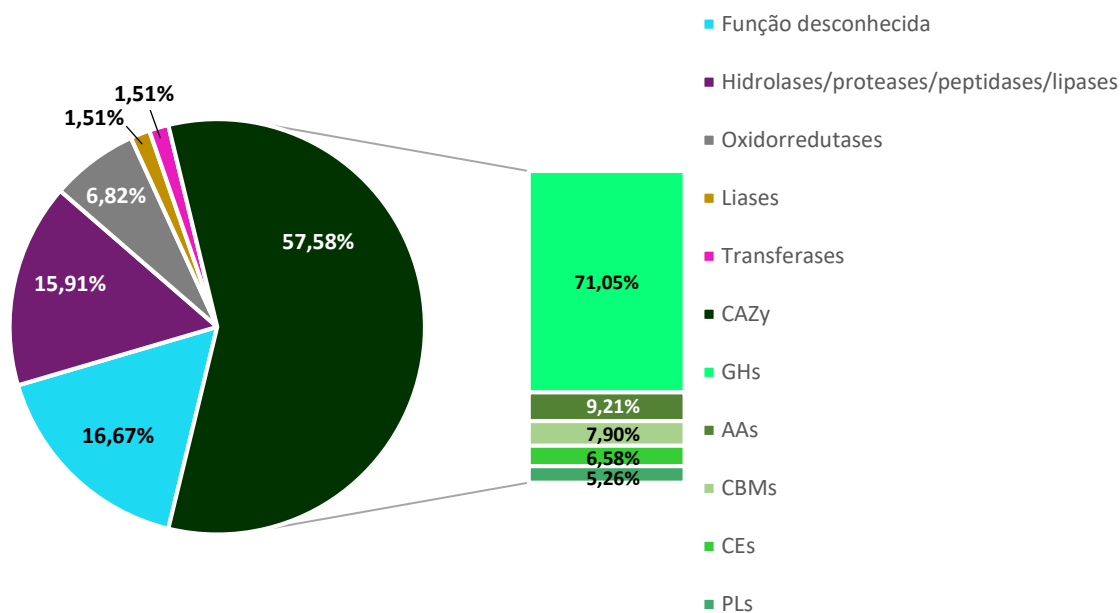


**Figura 7:** Mecanismo de reação das enzimas das LPMOs (AA9) baseado no consumo de  $O_2$  com abstração dos hidrogênios nas posições 1 e 4 (esquerda) e produtos gerados pela oxidação da celulose (direita). (Figura adaptada) (fontes: Phillips *et al.*, 2011; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017).

Diferentes estudos têm demonstrado o efeito das LPMOs nos processos de hidrólise. A suplementação de um coquetel enzimático contendo celulases e xilanases (*GtCel5B* e *GtXyl10G*, respectivamente) com a AA9 secretada pelo *Gloeophyllum trabeum* (*GtGH61*), provocou um aumento em cerca de 21% na liberação de açúcares redutores em meios de crescimento contendo 1% de carvalho pré-tratado, quando comparado com o controle contendo apenas o coquetel (Jung *et al.*, 2015). Da mesma forma a produção das AA9s pelo fungo *L. arvaris* também se mostrou eficiente, verificando-se que do total de 16 LPMOs codificadas pelo seu genoma, o crescimento em meio contendo Avicel induziu a secreção e a expressão de 7 enzimas AA9 e contribuíram para a obtenção de uma atividade celulolítica 7,5 vezes maior que a do fungo modelo *T. reesei* (Navarro *et al.*, 2014). Em bactérias *Hahella chejuensis* foi constatada a presença de uma importante AA10, *HcAA10-2*. Ensaios conduzidos com a enzima na presença de Avicel juntamente com o coquetel Celluloclast (Novozymes) ou de Cel5 (EG) apresentaram um aumento respectivo na liberação de açúcares para o meio de aproximadamente 4 e 6 vezes (Ghatge *et al.*, 2015).

Dados de análise de secretoma obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, conforme pode ser visto na figura 8, revelaram que o fungo *Aspergillus fumigatus* quando incubado por 24 horas na presença de bagaço de cana-de-açúcar explodido, foi capaz de produzir 132 proteínas diferentes, sendo que 58% do total correspondem a enzimas CAZy. Do total das CAZymes, apesar de 71% delas serem pertencentes às famílias de glicosil hidrolases (GHs), também foram identificadas 3 enzimas em particular classificadas como LPMOs da família AA9 codificadas pelos genes AFUA\_1G12560,

AFUA\_2G14490 e AFUA\_4G07850. Corroborando esses resultados, a análise transcricional por técnicas de RNA-seq, mostrou a indução dos genes (AFUA\_3G03870 e AFUA\_4G07850), evidenciando mais uma vez a capacidade do fungo em produzir enzimas com alto potencial biotecnológico (de Gouvêa *et al.*, *submetido*).



**Figura 8** – Caracterização funcional feita com auxílio da base de dados online AspGD ([www.aspgd.org](http://www.aspgd.org)) (Cerqueira *et al.*, 2014) e distribuição percentual das proteínas identificadas no secretoma, com destaque para as enzimas CAZy, após 24 horas de incubação do *A. fumigatus* em meio líquido YNB + 1% (p/v) SEB. Legenda localizada à direita da imagem (de Gouvêa *et al.*, *submetido*).

Nesse contexto, considerando-se que o *Aspergillus fumigatus* demonstra um complexo e eficiente mecanismo para a degradação da biomassa lignocelulósica, após as análises preliminares do crescimento do fungo em bagaço de cana-de-açúcar explodido como fonte de carbono e visto que no banco de dados CAZy das 369 AA9s identificadas apenas 2 são de *A. fumigatus* (Acesso em 24/01/2018), foram escolhidos como pontos de partida desse estudo os genes AFUA\_1G12560 e AFUA\_4G07850, codificantes das enzimas AA9 respectivamente aqui referidas como AfuLPMO9A e AfuLPMO9C.

## 2. Objetivos

O principal objetivo desse trabalho é o melhor entendimento do papel das enzimas mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) de *A. fumigatus* envolvidas na desconstrução do SEB.

Para tanto, como objetivos específicos estão inclusos:

- Caracterização do perfil transcricional dos genes de *A. fumigatus* em SEB e outras fontes de carbono.
- Compreensão da estrutura e análise da sequência das proteínas por bioinformática.
- Clonagem e expressão heteróloga dos genes AFUA\_1G12560 e AFUA\_4G07850 na cepa *E. coli* Rosetta<sup>TM</sup>(DE3)pLysS.
- Caracterização da atividade das enzimas purificadas na presença de Avicel® PH-101.

### **3. Metodologia**

#### **3.1) Cepas e meio de cultivo**

A cepa de *Aspergillus fumigatus* Af293 foi cultivada em placas de Petri com meio YAG sólido [2% (p/v) glicose; 1,8% (p/v) ágar; 1% (p/v) suplemento de vitaminas; 0,5% (p/v) extrato de levedura e 0,1% (p/v) solução de elementos traços] à 37°C, por 48 horas. Após raspagem das placas com solução PBS + 1% Tween® 20 (Sigma), a suspensão de conídios obtida foi filtrada em lã de vidro e armazenada a 4°C.

Culturas líquidas de *A. fumigatus*, contendo 10<sup>8</sup> conídios/mL foram crescidas em 50 mL de meio YNB [5% solução de sais; 0,1% elementos traços e 0,05% extrato de levedura] adicionado de 1% (p/v) frutose como única fonte de carbono por 16 horas à 37°C e 200 rpm (pré-inóculo) (Shaker New Brunswick™ Innova 40®). Após incubação, os micélios foram lavados com H<sub>2</sub>O estéril e transferidos para frascos com 50 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de substratos como bagaço de cana-de-açúcar explodido (SEB); carboximetilcelulose (CMC - Sigma); Avicel® PH-101 (Sigma); β-glucana extraída de cevada (Megazyme); xilana extraída de beechwood (Megazyme); e xiloglucana extraída de tamarindo (Megazyme). Todos os frascos foram mantidos por diferentes tempos de incubação (3, 6, 12, 18 e 24 horas) à 37°C sob agitação de 200 rpm. Culturas controle contendo 1% (p/v) frutose foram mantidas em iguais condições e tempos de cultivo.

#### **3.2) Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar**

O bagaço de cana-de-açúcar explodido, cedido pela usina São Martinho da região de Ribeirão Preto, foi lavado exaustivamente para retirar sujeiras, impurezas e açúcares redutores e em seguida, seco em estufa à 40°C, ralado manualmente e estocado à temperatura ambiente. A determinação do conteúdo de açúcar restante impregnado no bagaço foi realizada através do método de determinação da glicose com DNS. A esterilização do bagaço foi realizada através de autoclavagem no momento do preparo dos meios de cultura YNB.

#### **3.3) Extração e manipulação de RNA**

Para obtenção do RNA, as culturas de *A. fumigatus* foram realizadas conforme descrito no item 3.1. Após incubação, as culturas líquidas foram centrifugadas por 20 minutos a 2050 g e o sobrenadante descartado. O micélio obtido foi congelado em nitrogênio líquido e após a maceração, adicionou-se de 1 mL de reagente Trizol® (Life

Technologies) para cada 100 mg e realizou-se a homogeneização do mesmo. O homogenato foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, e em seguida adicionou-se 200 µL de clorofórmio para cada mL de Trizol<sup>®</sup> e a mistura foi homogeneizada vigorosamente. Após centrifugação a 12000 g por 10 minutos a 4°C, a fase aquosa superior foi transferida para outro tubo contendo 500 µL de isopropanol por mL de Trizol<sup>®</sup>. Novamente, a mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 75% (p/v) preparado com água-DEPC, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em água-DEPC. Ao final da extração, todo o RNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e a determinação da qualidade foi realizada no Bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). Os RNAs foram tratados com RQ1 RNase-Free DNase (Promega) para eliminar possíveis contaminações com DNA, conforme descrito abaixo:

RNA [10 µg] .....	x µL
Tampão 10X .....	2 µL
DNase .....	10 µL
<b>H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p.</b> .....	<b>20 µL</b>

As amostras foram incubadas por 30 min em 37°C e ao final foram adicionadas de 2 uL de Stop Solution e incubadas por 10 min a 65°C. A qualidade do tratamento com DNase pode ser vista em Figura Suplementar 1. Uma quantia de 5 µg de RNA livre de DNA foi submetido à reação de RT-PCR para a síntese de cDNA utilizando-se a enzima transcriptase reversa do kit comercial SuperScript<sup>®</sup> II (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.4) Real-time PCR

As reações de qRT-PCR foram realizadas no equipamento Applied Biosystems<sup>®</sup> 7300/7500 Real-Time PCR System a partir dos cDNAs sintetizados (ver adiante no item 3.5) utilizando-se sondas do tipo TaqMan<sup>®</sup> (Thermo Fisher) para os genes selecionados (LPMOs e β-tubulina), descritos na Tabela 1, e TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, seguindo-se o protocolo a seguir.

Sonda customizada TaqMan® (Thermo Fisher) .....	0,5 µL
TaqMan® Universal PCR Master Mix .....	5,0 µL
cDNA (100ng/µL) .....	1,0 µL
<b>H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. ....</b>	<b>10,0 µL</b>

Programação do termociclador: 1x 50°C por 2 min / 1x 95°C por 10 min / 40x 95°C por 15 seg / 40x 60°C por 1 min.

OBS: Os cDNAs sintetizados já haviam sido previamente tratados com RNase.

**Tabela 1:** Sequência dos componentes das sondas empregadas para a realização do qRT-PCR.

<b>Identificação/ Gene alvo</b>	<b>Primer forward</b>	<b>Primer reverse</b>	<b>Sequência de sinalização</b>
A AFUA_1G12560	CCTGATCGCCAACAACAACAG	CGTGACGCATGACATAGTTACCA	TCCCAGCTCCATCGCC
B AFUA_4G07850	GTGGCCAGAGTCTCACCAT	GTCCACGGTGGCACAGT	CCTCGCTCCATGCAAC

### 3.5) Desenho dos *primers* para clonagem em plasmídeo de expressão

As sequências dos *primers* foram desenhadas de tal forma a inserir sítios de restrição nos genes amplificados, para posterior clonagem no plasmídeo de expressão pET28a(+) (Novagen), como pode ser observado na Tabela 2.



**Tabela 2:** Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes.

Identificação	Primer	Sequência
A	Primer Forward (c/ sítio BamHI) AFUA_1G12560 p/ clonar em pET28a(+)	5'- <u>GGATCC</u> ATGTCTGTCCCTAAGATTGC – 3'
B	Primer Reverse (c/ sítio HindIII) AFUA_1G12560 p/ clonar em pET28a(+)	5'- <u>AAGCTT</u> CTAAGCAGAGAGATCACGAG – 3'
C	Primer Forward (c/ sítio BamHI) AFUA_4G07850 p/ clonar em pET28a(+)	5'- <u>GGATCC</u> ATGACTTTGTCCAAGATCAC – 3'
D	Primer Reverse (c/ sítio HindIII) AFUA_4G07850 p/ clonar em pET28a(+)	5'- <u>AAGCTT</u> TTAAGCGTTGAACAGTGCAG – 3'

OBS: Os sítios de restrição estão sublinhados nas sequências.

### 3.6) Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações foram realizadas de acordo com Saiki *et al.*, (1985) e Mezei & Storts, (1994), utilizando-se um Termociclador (Mastercycler Eppendorf®). As reações foram conduzidas adicionando-se 300 ng dos cDNAs sintetizados a uma mistura contendo os *primers* apropriados (ver Tabela 2), 0,2 mmol/L dNTPs, 2 mmol/L MgSO<sub>4</sub> e tampão de PCR de alta fidelidade 10X (volume final de 50 µL). A reação de amplificação foi iniciada pela adição de 1,0 U da enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e realizada com temperatura de 1x 94°C por 5 minutos/ 30x 94°C por 5 minutos / 30x 55°C por 1 minuto/ 30x 68°C por 2 minutos / 1x 68°C por 10 minutos/ 4°C - ∞.

### 3.7) Extração e purificação dos fragmentos amplificados

Os produtos de PCR foram preparados com DNA loading buffer 6X (Thermo Fisher Scientific) e Gel Red (Biotium) e aplicados em gel de agarose 1% para realização de eletroforese com voltagem de 110 V por cerca de 90 minutos. As bandas foram recortadas e purificadas usando-se QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Ao final do processo, os insertos amplificados foram eluídos em volumes de 50 µL e quantificados em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) para posterior clonagem em vetor pGEM-T Easy (Figura Suplementar 2).

### 3.8) Clonagem dos genes em vetor pGEM-T Easy (Novagen)

A ligação dos insertos purificados no vetor pGEM-T Easy foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante, de acordo com o protocolo abaixo:

Vetor pGEM-T Easy (50 ng/µL) .....	1 µL
Tampão 2X .....	5 µL
Produto de PCR .....	x µL
T4 DNA Ligase (1 U/µL) .....	1 µL
<b>H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p.</b> .....	<b>20 µL</b>

As ligações foram realizadas sob incubação de 1 hora em temperatura ambiente utilizando-se valores de fração molar (FM) inserto/vetor de 3:1 e 5:1. Os cálculos para determinar as quantidades dos produtos de PCR, bem como volumes necessários foram feitos através da seguinte fórmula:

$$\text{Massa de fragmento (ng)} = \frac{\text{Massa vetor (ng)} \cdot \text{Tamanho do fragmento (Kb)}}{\text{Tamanho do vetor (Kb)}} \text{ FM}$$

### 3.9) Preparo de *E. coli* DH10-β quimiocompetentes e transformação

Células de *E. coli* DH10-β foram inoculadas em 10 mL de meio LB líquido, à 37°C, por 200 rpm, durante 16 horas. Após esse período, inoculou-se em 50 mL de meio SOB e incubou-se nas mesmas condições até atingir uma D.O. (600nm) entre 0,4 e 0,6. Posteriormente transferiu-se todo o volume para tubos cônicos, sendo mantidos em gelo por 10 minutos e em seguida centrifugados a 2500 g, por mais 10 minutos, à 4°C. O

sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 16 mL de solução TB resfriada, sendo mantido em gelo por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 4 mL de solução TB resfriada + 300 µL de DMSO. Após manter em gelo por 10 minutos, alíquotas de 200 µL da suspensão de bactérias foram congeladas em nitrogênio líquido para armazenamento em -80°C.

Para transformação das *E. coli* DH10-β com o vetor de clonagem, alíquotas das bactérias foram descongeladas e mantidas em gelo. Volumes de 100 µL dessas alíquotas foram transferidas para novos microtubos juntamente com 5 µL das reações de ligação de interesse. As misturas foram mantidas em gelo por 30 minutos, seguida de choque térmico em temperatura de 42°C por 45 segundos. Em seguida foram mantidas novamente em gelo por 3 minutos e adicionadas de 600 µL de meio SOC, com posterior incubação de 1 hora sob temperatura de 37°C e agitação de 200 rpm.

Ao final da incubação, foram plaqueadas em meios LB sólidos contendo o antibiótico apropriado e mantidas sob 37°C overnight.

### **3.10) Preparo de estoques e miniprep**

Após transformação, os clones positivos foram selecionados para sequenciamento. As colônias obtidas foram inoculadas em 1 mL de meio LB líquido, suplementado com 1 µL de ampicilina (50 mg/mL) e incubadas overnight a 37°C. Posteriormente, após confirmação por PCR de colônia dos clones positivos, as colônias foram preparadas para estocagem a -80°C (714 µL suspensão + 286 µL glicerol 70%). A extração dos vetores recombinantes foi realizada utilizando o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

### **3.11) Análise da sequência dos genes clonados**

Os clones positivos foram preparados para a reação de sequenciamento segundo Sanger *et al.*, (1977), utilizando-se as instruções do kit Big Dye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). As amostras foram sequenciadas no Laboratório de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos da FCFRP-USP. Após sequenciamento, com o auxílio do site Biology Workbench ([workbench.sdsc.edu](http://workbench.sdsc.edu)), as análises de mutações foram realizadas mediante alinhamento das sequências obtidas com aquelas referentes às ORFs do genes disponíveis no banco de dados genômico de *A. fumigatus* CADRE ([www.cadre-genomes.org.uk](http://www.cadre-genomes.org.uk)) (Mabey Gilsenan *et al.*, 2012).

### 3.12) Modelagem 3D, alinhamentos e otimização dos sítios ativos

A modelagem 3D das enzimas AfuLPMO9A e AfuLPMO9C foi realizada a partir da estrutura primária das mesmas utilizando-se o programa Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2>). Para uma melhor visualização das estruturas foi utilizado o programa Discovery Studio 2016 (Accelrys Software Inc.). Alinhamentos múltiplos com outras enzimas de sequências semelhantes identificadas pela base de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (Johnson *et al.*, 2008) foram realizadas utilizando-se o site <http://workbench.sdsc.edu>, como observado nas Figuras Suplementares 9 e 10.

A otimização da geometria dos sítios ativos foi determinada utilizando-se apenas os resíduos possivelmente coordenados ao cobre nas enzimas AfuLPMO9A e AfuLPMO9C, a fim de simplificar o processo. Após manualmente adicionar o centro metálico, uma molécula de água e completar as valências abertas com átomos de hidrogênio, as estruturas foram otimizadas usando Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Os cálculos foram realizados em nível B3LYP (Becke, 1993) com base duplo-zeta 6-31G\* (Hehre *et al.*, 1972; Francl *et al.*, 1982; Rassolov *et al.*, 1998) e correção de dispersão Grimme (Grimme *et al.*, 2010) com termo de *damping* de curto alcance (Grimme *et al.*, 2011). A aproximação de resolução-de-identidade e *chain-of-spheres* (Kossmann & Neese, 2010) foram usadas para aceleração do ciclo auto-consistente (SCF) e otimização, usando critérios de convergência *tight*.

As edições e visualizações das estruturas foram realizadas com auxílio do programa Chemcraft 1.8 - ([www.chemcraftprog.com](http://www.chemcraftprog.com)) e os cálculos de estrutura eletrônica executados no ORCA 4.0 – ([orcaforum.cec.mpg.de](http://orcaforum.cec.mpg.de)) (Neese, 2018).

### 3.13) Clonagem dos genes em vetor pET28a(+) para expressão

Para a clonagem em vetor para expressão pET28a(+) (Novagen) (Figura Suplementar 3), foi realizada a digestão com as enzimas apropriadas dos vetores pGEM – T Easy (novagen) contendo os genes clonados. Os produtos da digestão foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% e os fragmentos de interesse foram extraídos utilizando o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Os fragmentos de DNA extraídos foram ligados no vetor pET28a(+), previamente digerido com as mesmas enzimas, através da reação da T4 DNA Ligase (Invitrogen) por 1 hora a temperatura ambiente, com diferentes proporções entre o

número de pmols de pontas entre inserto e plasmídeo [100 ng] de 3:1, 5:1 e até 8:1. Nas reações, foram utilizados 1,5 U de enzima, 4,0 µL de tampão de ligação 5X e água deionizada totalizando volume final de 20 µL.

### **3.14) Transformação dos vetores pET28a(+) + AFUA\_1G12560 e pET28a(+) + AFUA\_4G07850 em *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS**

Os vetores recombinantes pET28a(+) + AFUA\_1G12560 e pET28a(+) + AFUA\_4G07850 foram transformados em *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS da mesma forma como foi descrito no item 3.9 para a cepa DH10-β.

### **3.15) Expressão dos genes AFUA\_1G12560 e AFUA\_4G07850 em *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS e análise eletroforética em SDS-PAGE**

Bactérias *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS contendo os genes AFUA\_1G12560 e AFUA\_4G07850 ligados em vetor pET28a(+) foram crescidas overnight (200 rpm e 37°C) em 10 mL de meio LB contendo 0,05 mg/mL de kanamicina e cloranfenicol. Após esse período, 1 mL de cada cultura foi inoculado em 10 mL de meio TB com igual concentração dos mesmos antibióticos mais 1% (p/v) glicose, e foram mantidos sob mesmas condições por cerca de 1 hora. A adição de diferentes concentrações de IPTG foi realizada quando as culturas atingiram D.O. (600 nm) entre 0,4 e 0,6.

A partir de então, alíquotas de 500 µL das induções foram recolhidas após os períodos de 0, 1, 2 e 4 horas de incubação (200 rpm e diferentes temperaturas de incubação). As alíquotas foram centrifugadas a 20800 g por 30 segundos e os pellets estocados em freezer a -20°C. Para a aplicação em gel SDS-PAGE 10%, descrito por Laemmli, (1970), as amostras foram ressuspensas em 80 µL de sample buffer 1X e aquecidas a 98°C por 5 minutos. Volumes de 15 µL foram submetidos a SDS-PAGE. Ver preparo do gel a seguir.

### **Gel de empacotamento 5%**

Acrilamida/bis-acrilamida 37,5/1 (Bio-Rad) .....	325 µL
Tris-HCl 1,0 M pH 6,8 .....	250 µL
SDS 10% (p/v).....	20 µL
Persulfato de amônio 10% (p/v) .....	20 µL
TEMED (Bio-Rad) .....	2,5 µL
<b>H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p.</b> .....	<b>2000,0 µL</b>

### **Gel de corrida 10%**

Acrilamida/bis-acrilamida 37,5/1 (Bio-Rad) .....	1675 µL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 .....	1025 µL
SDS 10% (p/v).....	50 µL
Persulfato de amônio 10% (p/v) .....	50 µL
TEMED (Bio-Rad) .....	2,5 µL
<b>H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p.</b> .....	<b>5000,0 µL</b>

### **3.16) Western Blot**

As proteínas identificadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose segundo Towbin *et al.*, (1979) através de um sistema *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com tampão TBS-T adicionado de 5% (p/v) de leite em pó por 1 hora a 4°C (bloqueio). Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 vezes com tampão TBS-T e incubadas overnight com anticorpo primário Anti-His tag (GE Healthcare) na diluição 1:5000. Na sequência, as membranas foram lavadas por mais 3 vezes e incubadas com o anticorpo secundário

Anti-mouse IgG (Sigma) na diluição 1:5000 por 1 hora. A revelação da marcação foi realizada utilizando o kit “*ECL Western blotting detection reagents and analysis system*” (Amersham Biosciences) e a visualização pelo equipamento ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

### 3.17) Testes de solubilidade

Para determinar a solubilidade das enzimas, assim como as melhores condições de indução, foram feitas várias expressões em pequena escala sob diferentes condições, e os pellets obtidos foram ressuspensos em 250 µL de tampão de lise:

Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (47mM) / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (3mM); pH =7,8 .....	5 mL
NaCl 400 mM .....	2,3 g
KCl 100 mM .....	0,75 g
Glicerol (10%) .....	10 mL
Triton X-100 (0,5%) .....	0,5 mL
Imidazol 10 mM .....	0,68 g
<b>H<sub>2</sub>O q.s.p.</b> .....	<b>100 mL</b>

Após homogeneização, as suspensões (em microtubos) foram sonicadas (Sonicador Fisher Scientific) 4 vezes com pulsos de 10 segundos / amplitude de 50% e intervalos de 10 segundos em gelo). Seguindo-se, os microtubos foram centrifugados em 20800 g à 4°C por 2 minutos. Os sobrenadantes, correspondentes a fração solúvel, foram separados dos pellets formados (fração insolúvel) e ambos foram armazenados a -20°C.

Para verificar em qual das fases se encontravam as enzimas AA9, as frações solúveis e insolúveis receberam adição de tampão de amostra 5X, foram submetidas a aquecimento de 98°C por 5 minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE 10%, assim como descrito em 3.15.

### **3.18) Expressões em maior escala, solubilização e purificação dos corpos de inclusão**

Uma vez estabelecidas as melhores condições para a expressão das enzimas, procedeu-se com a expressão das LPMOs em volumes de 2 L de meio TB contendo 0,05 mg/mL de kanamicina, cloranfenicol e 1% (p/v) glicose. Após atingir D.O. (600 nm) entre 0,4 e 0,6 adicionou-se 0,5 mM de IPTG e para indução das proteínas AfuLPMO9A e AfuLPMO9C, incubou-se a 30°C e 25°C, respectivamente, sob agitação de 200 rpm por 6 horas. Após término desse período, o conteúdo foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e centrifugou-se por 8000 g por 15 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets obtidos foram armazenados a -20°C. Alíquotas de 500 µL foram retiradas antes e após o término da expressão.

Para a purificação e solubilização das enzimas AfuLPMO9A e AfuLPMO9C dos corpos de inclusão, foram utilizadas modificações do kit iFOLD Protein Refolding System I (Novagen). Os pellets armazenados receberam adição de tampão de ressuspensão (10 mL/g pellet), sendo homogeneizados até a completo desaparecimento. Adicionou-se lisozima (Sigma) 50 mg/mL (20 µL/g pellet) e incubou-se em temperatura ambiente por 15 minutos em agitação leve. Em seguida, as amostras foram sonicadas por 5 vezes com pulsos de 10 segundos (50% amplitude) e intervalos de 10 segundos em gelo. Após adição de Triton X-100 para concentração final de 1%, todos os tubos foram centrifugados em 8000 g por 15 minutos a 4°C. Após a coleta de uma alíquota de 500 µL, o sobrenadante foi descartado e ao pellet, adicionou-se tampão de lavagem (10 mL/g pellet) seguido de homogeneização. Novamente foram centrifugados nas mesmas condições e os sobrenadantes descartados. Esse procedimento foi repetido por 4 vezes com coleta de 500 µL dos volumes descartados em cada lavagem. Para remoção de traços de Triton X-100, 3 lavagens foram realizadas com adição de tampão de ressuspensão (10 mL/g pellet) e novamente foram centrifugados descartando-se o sobrenadante e coletando-se alíquota de 500 µL.

Ao pellet restante, adicionou-se tampão de desnaturação aos tubos (20 mL/g pellet) e após homogeneização foram sonicados conforme descrito previamente. Adicionou-se 30% SLS (lauril sarcosinato de sódio) (3,5 mL/g pellet) e após 1 hora e 50 minutos em temperatura ambiente sob agitação leve, repetiu-se centrifugação nas condições já descritas para coletar o sobrenadante e passar em filtro de 25 µM. Retirou-se novamente uma alíquota de 500 µL e procedeu-se com a diálise do sobrenadante, por 2 dias a 4°C, sendo que o tampão foi substituído após 24 horas. Ao final, as enzimas



AfuLPMO9A e AfuLPMO9C foram concentradas em filtro Amicon Ultra-15, adicionadas de 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) e armazenadas em -20°C. A verificação da purificação foi realizada através de SDS-PAGE como descrito em 3.15.

Todos os tampões preparados estão descritos abaixo:

**Tampão de ressuspensão (pH 8,0)**

Tampão Tris-HCl 1M, pH= 8,0 .....	22,5 mL (50 mM)
NaCl 4M .....	5625 µL (50 mM)
TCEP 1M .....	450 µL (1 mM)
EDTA 0,5 M, pH= 8,0 .....	450 µL (0,5 mM)
Glicerol (50%) .....	45 mL (5%)
<b>H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. ....</b>	<b>450 mL</b>

**Tampão de lavagem (pH 8,0)**

Tampão Tris-HCl 1M, pH= 8,0 .....	22,5 mL (50 mM)
NaCl 4M .....	5625 µL (50 mM)
TCEP 1M .....	450 µL (1 mM)
EDTA 0,5 M, pH= 8,0 .....	450 µL (0,5 mM)
Glicerol (50%) .....	45 mL (5%)
Triton X-100 (100%) .....	4,5 mL (1%)
<b>H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. ....</b>	<b>450 mL</b>

**Tampão de denaturação (pH 8,0)**

Tampão Tris-HCl 1M, pH= 8,0 .....	15 mL (50 mM)
NaCl 4M .....	3750 µL (50 mM)
TCEP 1M.....	1,5 mL (5 mM)
EDTA 0,5 M, pH= 8,0 .....	300 µL (0,5 mM)
Glicerol (50%) .....	30 mL (5%)
<b>H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. ....</b>	<b>300 mL</b>

**Tampão de diálise (pH 7,5)**

Tampão Tris-HCl 1M, pH= 7,5 .....	20 mL (20 mM)
<b>H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. ....</b>	<b>1 L</b>

**3.19) Análise e quantificação das enzimas AfuLPMO9A e AfuLPMO9C purificadas**

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando reagente de Greenberg (Greenberg & Craddock, 1982), preparado como descrito a seguir:

EtOH (96%).....	4 mL
Ácido acético .....	0,6 mL
Triton X-100 .....	1 mL
Azul de bromofenol .....	15 mg
H <sub>2</sub> O deionizada.....	44,4 mL
<b>H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. ....</b>	<b>50 mL</b>

A reação foi realizada em triplicata em microplaca, com curva padrão contendo 20 µL BSA em concentrações (0,1 mg/mL até 2,0 mg/mL) e alíquotas de 20 µL das proteínas. Adicionou-se 180 µL do reagente de Greenberg e após 5 minutos de

incubação em temperatura ambiente as leituras de absorvância foram realizadas em 610 nm.

### 3.20) Testes de Atividade das LPMOs

A atividade das enzimas AfuLPMO9A e AfuLPMO9C purificadas foram avaliadas de acordo com Kim *et al.*, (2017), porém com algumas modificações. Em tubos de 2 mL, foram realizadas adicionando-se 1% (p/v) de Avicel® PH-101; 0,9 FPU do coquetel enzimático Celluclast 1,5L (Sigma)/ g de Avicel; 1mM de ácido ascórbico ou 0,02% de NaN<sub>3</sub> (substâncias redutoras); 1mM de solução CuSO<sub>4</sub> (pH=5,0), como proposto por Vuong *et al.*, (2017); 50 mM de tampão acetato de sódio (pH=5,0); e proteínas de 1 ou 10 mg de AA9/ g de Avicel, em volume final de 1 mL.

As reações foram mantidas a 50°C por 48 horas sob agitação de 230 rpm e ao final, após centrifugar os microtubos a 2000 g por 3 minutos, 100 µL de cada uma das reações receberam adição de igual volume de DNS (Miller, 1959) e foram aquecidas por 5 minutos a 95°C. Os volumes resultantes de 200 µL foram então transferidos para microplaca de 96 poços de fundo chato, de modo que o percentual de conversão do Avicel em açúcares redutores foi determinado através da leitura das absorvâncias realizada com  $\lambda = 540$  nm. Vale destacar que paralelamente foram incubadas reações sem adição das LPMOs (controles) e reações sem a presença das LPMOs e adição de coquetel (brancos). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

#### 4. Conclusões

Através das análises de nível de expressão das enzimas, alinhamentos e predições das estruturas das mesmas por meio das sequências de aminoácidos, foi possível determinar a estrutura do sítio ativo das duas AA9s utilizando-se cálculos computacionais de DFT. Juntamente, após estabelecidos os procedimentos adequados para expressar ambas as enzimas e purificá-las, finalmente procedeu-se com a realização de testes para verificar a atividade das mesmas, e de um modo geral, os resultados obtidos ao longo de todas as etapas nos permitiram concluir que:

- ➔ As LPMOs são diferencialmente induzidas dentro de 24 horas por fontes de carbono como xiloglucana,  $\beta$ -glucana, Avicel, SEB e CMC, demonstrando que atuam tanto em açúcares da hemicelulose como na própria celulose. No entanto, os genes que as codificam apresentaram níveis de expressão superiores quando na presença de CMC, SEB e Avicel, de modo que na presença dos mesmos, o gene AFUA\_1G1260 mostrou-se respectivamente até 16X, 13X e 6X mais induzido, ao passo que o gene AFUA\_4G07850, também respectivamente, chegou a registrar expressivos aumentos na expressão em até 3500X, 2000X e 1000X.
- ➔ De acordo com os resultados de análise bioinformática das AA9s, observou-se que além de ambas serem ativas em C1 e C4 e não possuírem módulos de ligação, o conteúdo de estruturas secundárias como  $\alpha$ -hélices e estruturas  $\beta$  respectivamente representam 12% e 20% das enzimas AfuLPMO9A e 9% e 36% das AfuLPMO9C.
- ➔ Por meio da otimização da estrutura dos sítios ativos concluiu-se que de fato ambos apresentam geometria piramidal de base quadrada em que os resíduos envolvidos com a coordenação ao cobre são H20, H105 e Y194 para a AfuLPMO9A; e H22, H107 e Y196 para a AfuLPMO9C.
- ➔ A expressão heteróloga das enzimas em bactérias *E. coli* Rosetta<sup>TM</sup>(DE3)pLysS foi bem sucedida e apesar de obtidas inicialmente em formas de corpos de inclusão, ambas as foram solubilizadas, purificadas e obtidas com alguma

atividade residual, de modo que para as condições utilizadas nos ensaios em conjunto com o coquetel enzimático Celluclast ®1,5L foi registrado aumento na liberação de açúcares de até 1,26X e 1,20X para a enzima AfuLPMO9A; e de 1,09X e 1,20X para a AfuLPMO9C (ambas respectivamente nas concentrações de 1 e 10 mg/g de Avicel quando na presença de NaN<sub>3</sub>).

Dessa forma pode-se concluir que os resultados aqui obtidos corroboram outros já presentes na literatura, e mais do que isso, contribuem para demonstrar o potencial das AA9s e que ainda muitos estudos são necessários para encontrar a dose ideal das mesmas a ser adicionada a coquetéis enzimáticos, o que por exemplo, parece ser imprescindível para a produção de etanol 2G.

## 5. Referências bibliográficas

- Adav et al., (2015)** Sunil S. Adav *et al.* Quantitative proteomic study of *Aspergillus Fumigatus* secretome revealed deamidation of secretory enzymes. *Journal of Proteomics*. 119, (2015), 154–168. doi: 10.1016/j.jprot.2015.02.007.
- Alves, (2006)** Josias Manoel Alves. Paradigma técnico e co-geração de energia com bagaço de cana de açúcar em Goiás. *Proceedings of the 6. Encontro de Energia no Meio Rural* (2006).
- Basso et al., (2010)** Thalita Peixoto Basso *et al.* Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 45, 11 (2010), 1282–1289. doi: 10.1590/S0100-204X2010001100008.
- Becke, (1993)** Axel D. Becke. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*. 98, 7 (1993), 5648–5652. doi: 10.1063/1.464913.
- Bennett, (1998)** J. Bennett. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 66, 2–3 (1998), 101–107. doi: 10.1016/S0168-1656(98)00133-3.
- Bertini et al., (2018)** Luca Bertini *et al.* Catalytic Mechanism of Fungal Lytic Polysaccharide Monooxygenases Investigated by First-Principles Calculations. *Inorganic Chemistry*. 57, 1 (2018), 86–97. doi: 10.1021/acs.inorgchem.7b02005.
- Bey et al., (2013)** Mathieu Bey *et al.* Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (Family GH61) from *Podospora anserina*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79, 2 (2013), 488–496. doi: 10.1128/AEM.02942-12.
- Biology Workbench**, fonte: workbench.edu.gov (Acesso em 24/01/2018).
- Bissaro et al., (2017)** Bastien Bissaro *et al.* Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nature Chemical Biology*. 13, 10 (2017), 1123–1128. doi: 10.1038/nchembio.2470.

- Budziak et al., (2004)** Cristiane R. Budziak *et al.* Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. *Quimica Nova*. 27, 3 (2004), 399–403. doi: 10.1590/S0100-40422004000300007.
- Cantarel et al., (2009)** B. L. Cantarel *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*. 37, Database (2009), D233–D238. doi: 10.1093/nar/gkn663.
- Carvalho et al., (2009)** Walter Carvalho *et al.* Revisão. 32, 8 (2009), 2191–2195.
- Cerqueira et al., (2014)** Gustavo C. Cerqueira *et al.* The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Research*. 42, D1 (2014), D705–D710. doi: 10.1093/nar/gkt1029.
- Chemcraft 1.8 (b523)**, fonte: [www.chemcraftprog.com](http://www.chemcraftprog.com) (Acesso em 25/10/2017).
- Chohfi et al., (2004)** Felipe Moreton Chohfi *et al.* Balanço, análise de emissão e seqüestro de CO<sub>2</sub> na geração de eletricidade excedente no setor sucro-alcooleiro. *Proceedings of the 5th Encontro de Energia no Meio Rural* (2004).
- ClipartFest**, fonte: [clipartfest.com](http://clipartfest.com) (Acesso em 08/03/2017).
- CONAB**, fonte: [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br) (Acesso em 24/01/2018).
- Corrêa et al., (2016)** Thamy Livia Ribeiro Corrêa *et al.* AA9 and AA10: from enigmatic to essential enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100, 1 (2016), 9–16. doi: 10.1007/s00253-015-7040-0.
- Cota et al., (2015)** Junio Cota *et al.* Comparative analysis of three hyperthermophilic GH1 and GH3 family members with industrial potential. *New Biotechnology*. 32, 1 (2015), 13–20. doi: 10.1016/j.nbt.2014.07.009.
- Courtade et al., (2017)** Gaston Courtade *et al.* A novel expression system for lytic polysaccharide monoxygenases. *Carbohydrate Research*. 448, (2017), 212–219. doi: 10.1016/j.carres.2017.02.003.
- Damasio et al., (2017)** André Ricardode Lima Damasio *et al.* Xyloglucan breakdown

by endo-xyloglucanase family 74 from *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101, 7 (2017), 2893–2903. doi: 10.1007/s00253-016-8014-6.

**Dimarogona et al., (2012)** Maria Dimarogona *et al.* Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Computational and structural biotechnology journal*. 2, 3 (2012), e201209015. doi: 10.5936/csbj.201209015.

**Discovery Studio**, *Accelrys Software Inc.* (2016).

**Fernández-Fueyo et al., (2014)** Elena Fernández-Fueyo *et al.* Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnology for Biofuels*. 7, 1 (2014), 2. doi: 10.1186/1754-6834-7-2.

**Francl et al., (1982)** Michelle M. Francl *et al.* Self-consistent molecular orbital methods. XXIII. A polarization-type basis set for second-row elements. *The Journal of Chemical Physics*. 77, 7 (1982), 3654–3665. doi: 10.1063/1.444267.

**Frommhagen et al., (2015)** Matthias Frommhagen *et al.* Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase. *Biotechnology for Biofuels*. 8, 1 (2015), 4–15. doi: 10.1186/s13068-015-0284-1.

**Ghatge et al. (2015)** Sunil S. Ghatge *et al.* Multifunctional cellulolytic auxiliary activity protein HcAA10-2 from *Hahella chejuensis* enhances enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99, 7 (2015), 3041–3055. doi: 10.1007/s00253-014-6116-6.

**de Gouvêa et al., (2018)** P. F. de Gouvêa *et al.* Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels*. (2018). *Submetido*.

**Greenberg & Craddock, (1982)** C. S. Greenberg & P. R. Craddock. Rapid single-step membrane protein assay. *Clinical chemistry*. 28, 7 (1982), 1725–1726.

**Grimme et al., (2010)** Stefan Grimme *et al.* A consistent and accurate ab initio



- parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *The Journal of Chemical Physics*. 132, 15 (2010), 154104. doi: 10.1063/1.3382344.
- Grimme *et al.*, (2011)** Stefan Grimme *et al.* Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. *Journal of Computational Chemistry*. 32, 7 (2011), 1456–1465. doi: 10.1002/jcc.21759.
- Hehre *et al.*, (1972)** W. J. Hehre *et al.* Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *The Journal of Chemical Physics*. 56, 5 (1972), 2257–2261. doi: 10.1063/1.1677527.
- Heinzkill *et al.*, (1998)** Marion Heinzkill *et al.* Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 5 (1998), 1601–1606. doi: 10.1016/0038-0717(90)90187-5.
- Hemsworth *et al.*, (2014)** Glyn R. Hemsworth *et al.* Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature chemical biology*. 10, 2 (2014), 122–126. doi: 10.1038/nchembio.1417.
- Huang *et al.*, (2014)** Xuenian Huang *et al.* Direct production of itaconic acid from liquefied corn starch by genetically engineered *Aspergillus terreus*. *Microbial Cell Factories*. 13, 1 (2014), 108. doi: 10.1186/s12934-014-0108-1.
- Jin *et al.*, (2016)** Mingjie Jin *et al.* Toward lower cost cellulosic biofuel production using ammonia based pretreatment technologies. *Green Chem*. 18, 4 (2016), 957–966. doi: 10.1039/C5GC02433A.
- Johnson *et al.*, (2008)** M. Johnson *et al.* NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*. 36, Web Server (2008), W5–W9. doi: 10.1093/nar/gkn201.
- Jung *et al.*, (2015)** Sera Jung *et al.* Enhanced lignocellulosic biomass hydrolysis by oxidative lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) GH61 from *Gloeophyllum trabeum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 77, (2015), 38–45. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.05.006.

- Kim et al., (2015)** In Jung Kim *et al.* Optimization of synergism of a recombinant auxiliary activity 9 from *Chaetomium globosum* with cellulase in cellulose hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99, 20 (2015), 8537–8547. doi: 10.1007/s00253-015-6592-3.
- Kim et al., (2017)** In Jung Kim *et al.* Type-dependent action modes of TtAA9E and TaAA9A acting on cellulose and differently pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels*. 10, 1 (2017), 1–8. doi: 10.1186/s13068-017-0721-4.
- Kossmann & Neese, (2010)** Simone Kossmann & Frank Neese. Efficient Structure Optimization with Second-Order Many-Body Perturbation Theory: The RIJCOSX-MP2 Method. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 6, 8 (2010), 2325–2338. doi: 10.1021/ct100199k.
- Laemmli, (1970)** U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 5259 (1970), 680–685. doi: 10.1038/227680a0.
- Latgé, (2001)** Jean-Paul Latgé. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*. 9, 8 (2001), 382–389. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02104-7.
- Levasseur et al., (2013)** Anthony Levasseur *et al.* Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*. 6, 1 (2013), 41. doi: 10.1186/1754-6834-6-41.
- Li et al., (2012)** Xin Li *et al.* Structural Basis for Substrate Targeting and Catalysis by Fungal Polysaccharide Monooxygenases. *Structure*. 20, 6 (2012), 1051–1061. doi: 10.1016/j.str.2012.04.002.
- Li et al., (2015)** Xin Li *et al.* Cellobionic acid utilization: from *Neurospora crassa* to *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 8, 1 (2015), 120. doi: 10.1186/s13068-015-0303-2.
- Lin et al., (2017)** Chaoyang Lin *et al.* Characterization of Xylanase and Cellulase Produced by a Newly Isolated *Aspergillus fumigatus* N2 and Its Efficient Saccharification of Barley Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 182, 2 (2017), 559–569. doi: 10.1007/s12010-016-2344-9.

- Liu et al., (2017)** Bing Liu *et al.* Biochemical studies of two lytic polysaccharide monoxygenases from the white-rot fungus *Heterobasidion irregulare* and their roles in lignocellulose degradation. *PLoS ONE*. 12, 12 (2017), e0189479. doi: 10.1371/journal.pone.0189479.
- Lopes et al., (2016)** Mario Lucio Lopes *et al.* Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47, (2016), 64–76. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.003.
- Mabey Gilsenan et al., (2012)** J. Mabey Gilsenan *et al.* CADRE: the Central *Aspergillus* Data REpository 2012. *Nucleic Acids Research*. 40, D1 (2012), D660–D666. doi: 10.1093/nar/gkr971.
- Mezei & Storts, (1994)** L. M. Mezei & D. R. Storts. Purification of PCR products. *PCR Technology: Current Innovations*. 21, (1994).
- Miller, (1959)** G. L. Miller. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 3 (1959), 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030.
- Miyauchi et al., (2017)** Shingo Miyauchi *et al.* The integrative omics of white-rot fungus *Pycnoporus coccineus* reveals co-regulated CAZymes for orchestrated lignocellulose breakdown. *PLOS ONE*. 12, 4 (2017), e0175528. doi: 10.1371/journal.pone.0175528.
- Navarro et al., (2014)** David Navarro *et al.* Fast solubilization of recalcitrant cellulosic biomass by the basidiomycete fungus *Laetisaria arvalis* involves successive secretion of oxidative and hydrolytic enzymes. *Biotechnology for Biofuels*. 7, 1 (2014), 143. doi: 10.1186/s13068-014-0143-5.
- Neese, (2018)** Frank Neese. Software update: the ORCA program system, version 4.0. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 8, 1 (2018), e1327. doi: 10.1002/wcms.1327.
- Nierman et al., (2005)** William C. Nierman *et al.* Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 438, 7071 (2005), 1151–1156. doi: 10.1038/nature04332.

**Novacana**, fonte: [www.novacana.com](http://www.novacana.com) (Acesso em 23/01/2017).

**PFDB**, fonte: [www.pfdb.net](http://www.pfdb.net) (Acesso em 11/03/2017).

**Phillips et al., (2011)** Christopher M. Phillips *et al.* Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chemical Biology*. 6, 12 (2011), 1399–1406. doi: 10.1021/cb200351y.

**Quinlan et al., (2011)** R. J. Quinlan *et al.* Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108, 37 (2011), 15079–15084. doi: 10.1073/pnas.1105776108.

**Rassolov et al., (1998)** Vitaly A. Rassolov *et al.* 6-31G \* basis set for atoms K through Zn. *The Journal of Chemical Physics*. 109, 4 (1998), 1223–1229. doi: 10.1063/1.476673.

**Rodrigues et al., (2017)** Kelly B. Rodrigues *et al.* Recombinant expression of *Thermobifida fusca* E7 LPMO in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* and their functional characterization. *Carbohydrate Research*. 448, (2017), 175–181. doi: 10.1016/j.carres.2017.04.008.

**Saiki et al., (1985)** R. Saiki *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230, 4732 (1985), 1350–1354. doi: 10.1126/science.2999980.

**Sana et al., (2017)** Barindra Sana *et al.* Development of a genetically programmed vanillin-sensing bacterium for high-throughput screening of lignin-degrading enzyme libraries. *Biotechnology for Biofuels*. 10, 1 (2017), 32. doi: 10.1186/s13068-017-0720-5.

**Sanger et al., (1977)** F. Sanger *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74, 12 (1977), 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.

**Santos et al., (2012)** Fernando a Santos *et al.* Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. *Quimica nova*. 35, 5 (2012), 1004–1010. doi: 10.1007/s13398-

014-0173-7.2.

- Scheller & Ulvskov (2010)** Henrik Vibe Scheller & Peter Ulvskov. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. 61, 1 (2010), 263–289. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.
- Schuster et al., (2002)** E. Schuster et al. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59, 4–5 (2002), 426–435. doi: 10.1007/s00253-002-1032-6.
- Tangthirasunun et al., (2017)** Narumon Tangthirasunun et al. Inactivation of Cellobiose Dehydrogenases Mechanism of *Podospora anserina*. *Applied and environmental microbiology*. 83, 2 (2017), 1–13. doi: 10.1128/AEM.02716-16.
- Torres et al., (2016)** Andres F. Torres et al. Maize feedstocks with improved digestibility reduce the costs and environmental impacts of biomass pretreatment and saccharification. *Biotechnology for Biofuels*. 9, 1 (2016), 63. doi: 10.1186/s13068-016-0479-0.
- Towbin et al., (1979)** H. Towbin et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76, 9 (1979), 4350–4354. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
- Vaaje-Kolstad et al., (2017)** Gustav Vaaje-Kolstad et al. Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*. 44, (2017), 67–76. doi: 10.1016/j.sbi.2016.12.012.
- Varanasi et al., (2013)** Patanjali Varanasi et al. Survey of renewable chemicals produced from lignocellulosic biomass during ionic liquid pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 6, 1 (2013), 14. doi: 10.1186/1754-6834-6-14.
- Vu et al., (2014)** V. V. Vu et al. A family of starch-active polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111, 38 (2014), 13822–13827. doi: 10.1073/pnas.1408090111.
- Vuong et al., (2017)** Thu V. Vuong et al. Microplate-Based Detection of Lytic

Polysaccharide Monooxygenase Activity by Fluorescence-Labeling of Insoluble Oxidized Products. *Biomacromolecules*. 18, 2 (2017), 610–616. doi: 10.1021/acs.biomac.6b01790.

**Wang et al., (2017)** Baoshi Wang *et al.* High-efficient production of citric acid by *Aspergillus niger* from high concentration of substrate based on the staged-addition glucoamylase strategy. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 40, 6 (2017), 891–899. doi: 10.1007/s00449-017-1753-7.

**Whitaker, (1993)** John R. Whitaker. Principles of enzymology for the food sciences. *CRC Press*. 61, (1993).

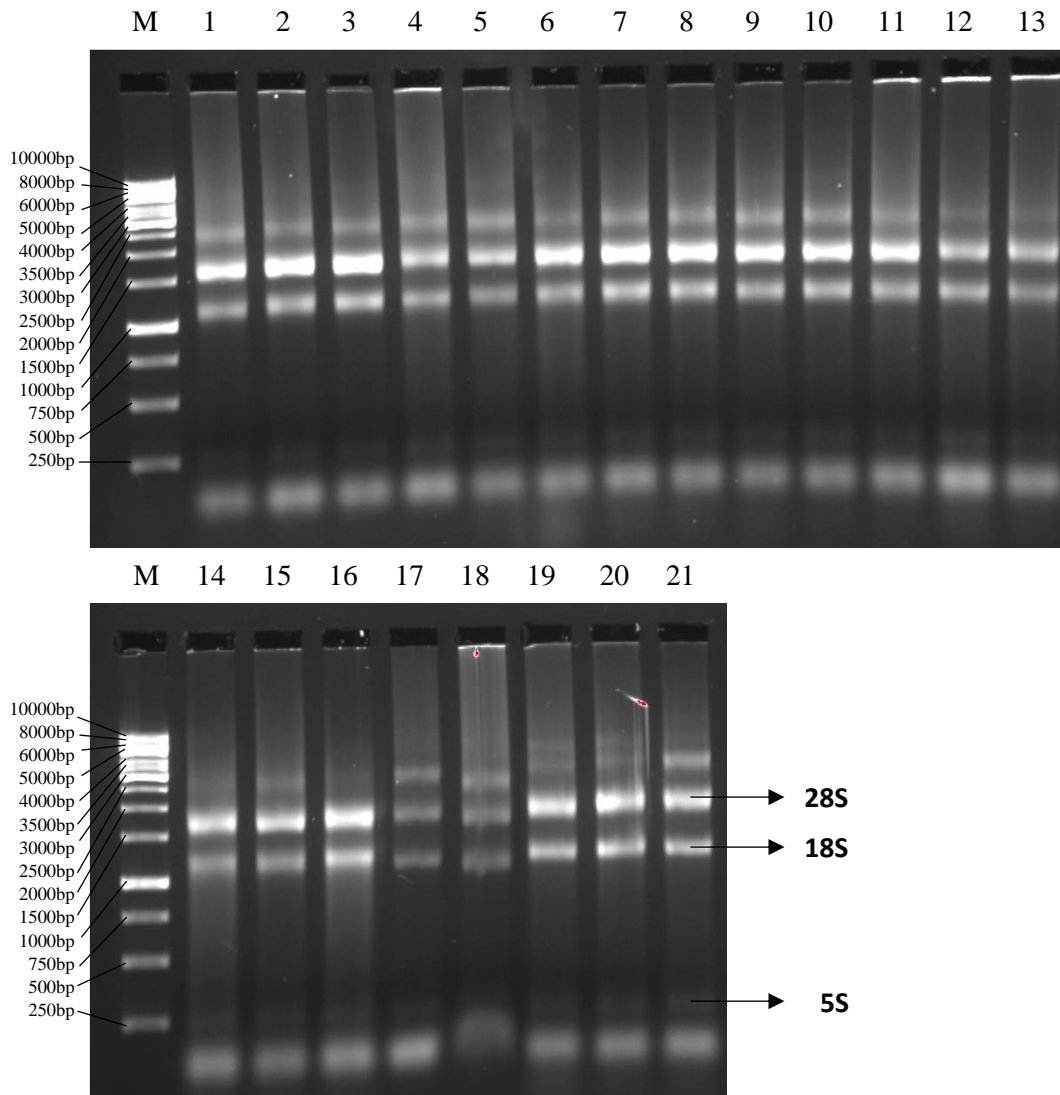
**Word Atlas**, fonte: [www.worldatlas.com](http://www.worldatlas.com) (Acesso em 10/01/2018).

**Xavier et al., (2006)** Melissa Orzechowski Xavier *et al.* ASPERGILOSE EM PINGÜIM-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) RELATO DE CASO. *Veterinária e Zootecnia*. 13, 1 (2006), 28–32.

**Xu & Ng (2015)** Chengchao Xu & Davis T. W. Ng. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 16, 12 (2015), 742–752. doi: 10.1038/nrm4073.

**Zhang, (2008)** Y. H.Percival Zhang. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 35, 5 (2008), 367–375. doi: 10.1007/s10295-007-0293-6.

## 6. Parte Suplementar



**Figura Suplementar 1:** Análise qualitativa da purificação das amostras de RNA total extraído de *A. fumigatus* crescido em meios contendo 1% (p/v) SEB ou 1% (p/v) frutose por diferentes tempos de incubação.

**Legenda:** 1- Frutose 3h, 2- Frutose 6h, 3- Frutose 12h, 4- Frutose 18h, 5- SEB 3h(1), 6- SEB 3h(2), 7- SEB 3h(3), 8- SEB 6h(1), 9- SEB 6h(2), 10- SEB 6h(3), 11- SEB 12h(1), 12- SEB 12h(2), 13- SEB 12h(3), 14- SEB 18h(1), 15- SEB 18h(2), 16- SEB 18h(3), 17- Frutose 24h(1), 18- Frutose 24h(2), 19- SEB 24h(1), 20- SEB 24h(2), 21- SEB 24h(3).

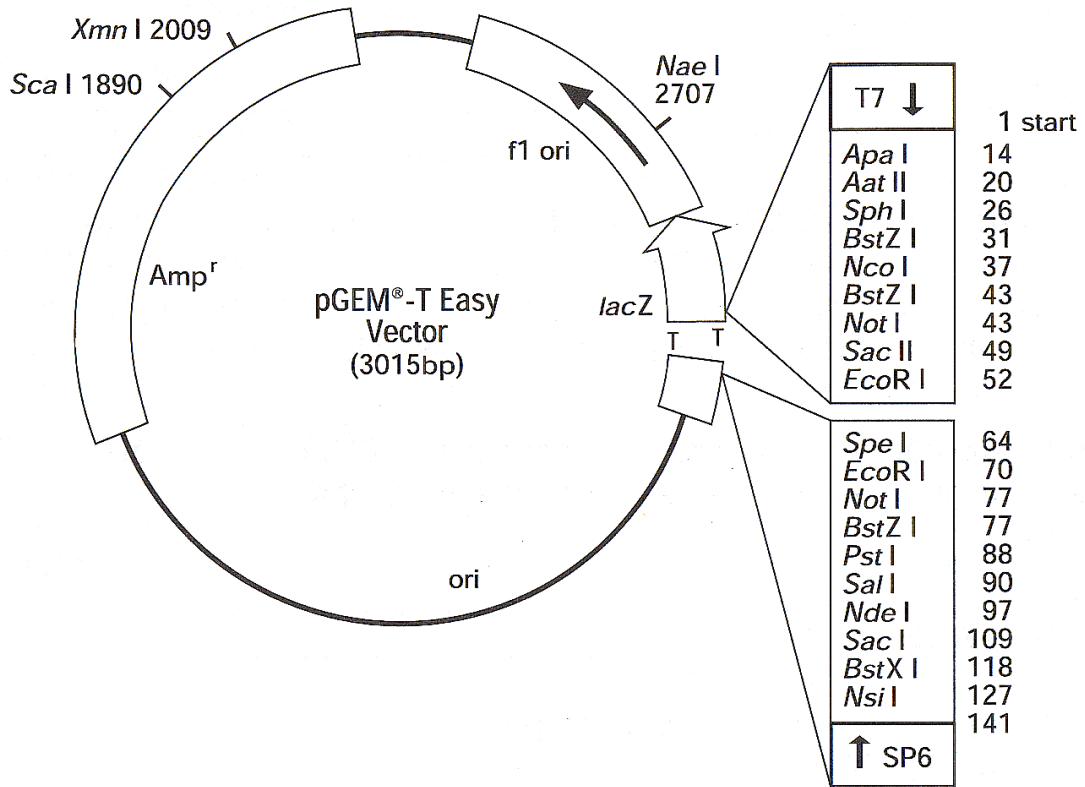


Figura Suplementar 2: Mapa do vetor pGEM – T Easy (Novagen).

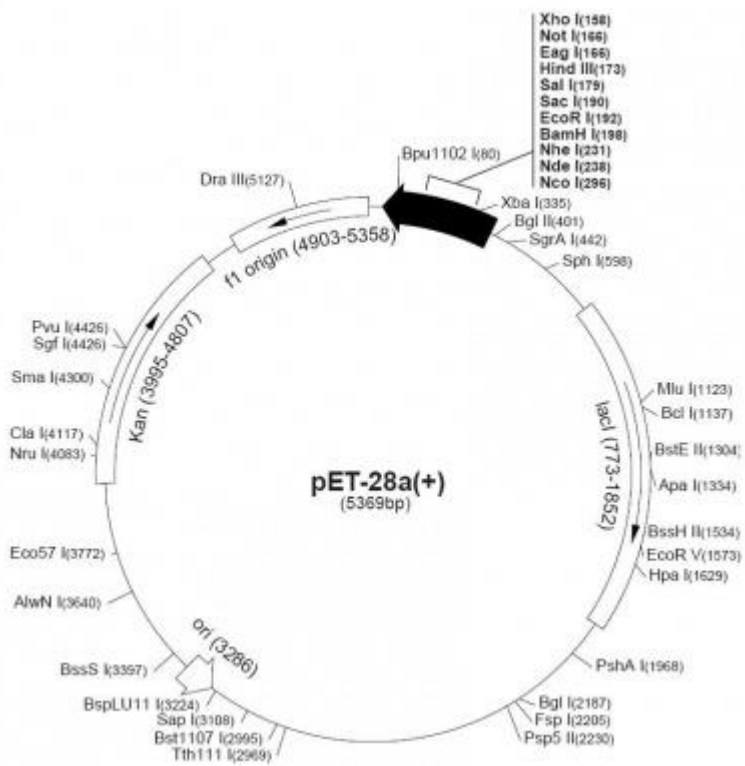


Figura Suplementar 3: Mapa do vetor pET28a(+) (Novagen).