UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

PAULA MIWA RABELO HIGASI

Caracterização de uma aril-álcool oxidase do fungo termofílico *Myceliophthora
thermophila*

São Carlos

2018

PAULA MIWA RABELO HIGASI

Caracterização de uma aril-álcool oxidase do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientação: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Versão Original

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Higasi, Paula Miwa Rabelo

Caracterização de uma aril-álcool oxidase do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* / Paula Miwa Rabelo Higasi; orientador Igor Polikarpov -- São Carlos, 2018.
83 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Aril-álcool oxidase. 2. *Myceliophthora thermophila*.
3. AA3_2. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paula Miwa Rabêlo Higasi

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 20/07/2018

Comissão Julgadora

Dr(a). Igor Polikarpov

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Mario Sergio Palma

Instituição: (UNESP/Rio Claro)

Dr(a). Carlos Alberto Labate

Instituição: (ESALQ/USP)

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Glória e Paulo, e ao meu irmão Pedro, pelo amor, apoio e educação que sempre estiveram presentes.

Aos meus avós Vadu e Zelita e aos meus tios e tias Valdeci, Osmar e Gal, Elma e Arival, Nalva, Nilson e Tati, Juca, Bó e Maristela, Dani e Eduardo, e Zéu, por todo o apoio dado e imprescindível.

Ao Professor Dr. Igor Polikarpov, pela oportunidade de fazer parte do Grupo de Biotecnologia Molecular, aprender e crescer intelectualmente, por todas as oportunidades de trabalho e pela orientação.

Ao Dr. Marco Kadowaki pelas instruções e discussões.

A Ana Elisa e Aline, pela amizade e suporte.

Aos membros atuais e passados do GBM: Vanessa, Atílio, Mariana, Melissa, Simara, Danilo, Lorenzo, Evandro, Angela, Natália, Érika, Vassily e Rejane, assim como aos técnicos Livia e Josimar, pela amizade e conversas diárias.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

RABELO HIGASI, P. M. **Caracterização de uma aril-álcool oxidase do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila***. 2018. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A biomassa vegetal é a maior fonte de carbono renovável disponível, e é composta de celulose, hemicelulose e lignina. A lignina, um heteropolímero polifenólico complexo, é uma barreira a utilização mais eficiente da biomassa. Fungos desenvolveram formas de superar o obstáculo imposto pela lignina, através da atividade de enzimas como peroxidases, e da ação de pequenas moléculas reativas. As duas formas dependem da presença de peróxido de hidrogênio, que é produzido pela atividade de enzimas como aril-álcool oxidases (AAOs). AAOs são enzimas pertencentes a superfamília GMC de oxidoredutases e, portanto, possuem FAD como grupo prostético. Realizam a conversão de álcoois aromáticos à aldeídos, com concomitante produção de peróxido de hidrogênio. Devido à capacidade de oxidação de substratos variados, e dependente somente de oxigênio molecular, AAOs têm potencial aplicação na indústria biotecnológica, tanto como produtoras de peróxido de hidrogênio quanto na produção de químicos-plataforma a partir da biomassa. No entanto, AAOs ainda têm poucos exemplares caracterizados, e a maior parte dos estudos publicados é referente a enzimas do gênero de fungos basidiomicetos *Pleurotus* sp.. A enzima *MtAAOx* do fungo ascomiceto termofílico *M. thermophila* foi produzida de forma heteróloga em *A. nidulans*, e algumas de suas propriedades bioquímicas e estruturais foram determinadas. *MtAAOx* é uma enzima extracelular monomérica glicosilada, com grupo FAD dissociável, e capaz de oxidar álcoois aromáticos fenólicos e não fenólicos, incluindo um monômero da lignina, coniferil álcool, substrato para o qual a enzima teve mais afinidade. *MtAAOx*, além de oxidar álcoois aromáticos, também foi capaz de oxidar um substrato heterocíclico, 5-HMF, e de utilizar outro aceptor de elétrons além do oxigênio. Esses resultados, aliados a baixa similaridade entre sequências de aminoácidos indicam que *MtAAOx* tem sítio catalítico e canal de acesso do substrato distintos das AAOs até o momento caracterizadas. A enzima *MtAAOx* deglicosilada teve estabilidade térmica reduzida em comparação com a enzima nativa. A atividade enzimática foi afetada positivamente com a presença de alguns cátions, entre eles Ca^{2+} . Além de afetar a atividade, Ca^{2+} proporcionou ganho de estabilidade térmica, com aumento da temperatura de melting em 5 °C. Esta enzima é uma nova aril-álcool oxidase

caracterizada, a primeira de um fungo ascomiceto, e acredita-se que tenha papel na degradação da lignina da biomassa vegetal.

Palavras-chave: Aril-álcool oxidase. *Myceliophthora thermophila*. AA3_2.

ABSTRACT

RABELO HIGASI, P. M. **Characterization of a new aryl-alcohol oxidase from thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila***. 2018. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Plant biomass is the largest source of available renewable carbon, and is composed of cellulose, hemicellulose and lignin. Lignin, a complex polyphenolic heteropolymer, is a barrier to a more efficient use of biomass. Fungi have developed ways to overcome the obstacle imposed by lignin through the activity of enzymes such as peroxidases and the action of small reactive molecules. The two forms depend on the presence of hydrogen peroxide, which is produced by the activity of enzymes such as aryl-alcohol oxidases (AAOs). AAOs are enzymes belonging to the GMC superfamily of oxidoreductases and therefore have FAD as the prosthetic group. They perform the conversion of aromatic alcohols to aldehydes, with simultaneous production of hydrogen peroxide. Because of their capacity of oxidizing various substrates, and dependence only on molecular oxygen, AAOs have potential applications in the biotech industry, both as hydrogen peroxide producers and in the production of platform chemicals derived from biomass. However, characterized AAOs are few, most of the published studies being on enzymes of basidiomycete fungi from genus *Pleurotus* sp.. The *MtAAOx* enzyme of the thermophilic ascomycete *M. thermophila* was produced heterologously in *A. nidulans*, and some of its biochemical and structural properties were determined. *MtAAOx* is a glycosylated, monomeric, extracellular enzyme with a dissociable FAD group, capable of oxidizing phenolic and non-phenolic aromatic alcohols, including a lignin monomer, coniferyl alcohol, the substrate for which the enzyme has the highest affinity. *MtAAOx*, besides oxidizing aromatic alcohols, was also able to oxidize a heterocyclic substrate, 5-HMF, and to use another electron acceptor in addition to oxygen. These results, combined with the low similarity between amino acid sequences, indicate that *MtAAOx* has a catalytic site and substrate access channel distinct from characterized AAOs'. The deglycosylated *MtAAOx* enzyme had reduced thermal stability compared to the native enzyme. The enzymatic activity was positively affected by the presence of some cations, including Ca^{2+} . In addition to affecting the activity, Ca^{2+} improved thermal stability, with 5 °C increase of the melting temperature. This enzyme is a novel aryl-alcohol oxidase characterized, the first of an ascomycete fungus, and is believed to play a role in the lignin degradation of plant biomass.

Keywords: Aryl-alcohol oxidase. *Myceliophthora thermophila*. AA3_2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Monolignóis que constituem a lignina.	24
Figura 2 - Estruturas de flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O anel isoaloxazina oxidado é responsável pela cor amarela intensa.....	27
Figura 3 - Reação do grupo FAD com substrato álcool. Durante a meia-reação redutiva, o FAD é reduzido a FADH ₂ e o álcool convertido a aldeído; e posterior meia-reação oxidativa, com reoxidação e liberação de H ₂ O ₂	29
Figura 4 - Oxidação de 5-HMF a FDCA. HMF, 5-hidróximetil furfural; DFF, 2,5-furandicarboxaldeído; HmFCa, 5-hidróximetil-2ácido furancarboxílico; FFCA, 5-formil-2-ácido furóico; FDCA, 2,5-ácido furandicarboxílico.....	32
Figura 5 - Gel de eletroforese SDS-PAGE da cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephadex. M, massa molecular dos padrões; 1, extrato bruto; 2-6, eluições com 100, 200, 300, 400 e 500 mM de NaCl, respectivamente.	47
Figura 6 - Cromatograma da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose. Os dois picos mais altos são correspondentes a enzima MtAAOx.....	48
Figura 7 - Gel de eletroforese SDS-PAGE da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose. As bandas são referentes as populações de MtAAOx eluídas em concentrações diferentes de NaCl. Fonte: elaborado pela autora.	49
Figura 8 - Cromatograma de eluição da enzima em cromatografia de exclusão molecular.	50
Figura 9 - Gel de eletroforese SDS-PAGE da cromatografia de exclusão molecular. A enzima eluiu majoritariamente pura, com pequena banda de degradação.	50
Figura 10 -Cromatograma da etapa de cromatografia de exclusão molecular da enzima MtAAOx após deglicosilação com EndoH..	52
Figura 11 - Gel de eletroforese SDS-PAGE. 1, massa molecular dos padrões; 2, MtAAOx nativa; 3, MtAAOx deglicosilada.....	53
Figura 12 - Cristais formados da enzima com o substrato coniferil álcool.	54
Figura 13 -Gráfico do espectro de absorbancia da enzima nativa e após tratamento, com liberação do grupo FAD.....	55
Figura 14 -Espectro de absorbancia da enzima nas formas oxidada e após redução com veratril álcool.	56
Figura 15 -Detalhe do espectro de absorbancia antes e após redução com substrato..	56
Figura 16 -Atividade residual da enzima glicosilada e deglicosilada após incubação a 50 °C. a.	57
Figura 17 -Atividade residual da enzima glicosilada e deglicosilada após incubação a 60 °C. a.	57
Figura 18 - Produtos de oxidação de 5-HMF por MtAAOx.	59
Figura 19 - Atividade relativa da enzima após incubação com moduladores de atividade.....	60

Figura 20 - Curva de transição em 222 nm na presença e ausência de Ca^{2+}	61
Figura 21 - Curva de transição em 218 nm na presença e ausência de Ca^{2+}	62
Figura 22 - Espectro CD da enzima nativa, nas temperaturas de 30 até 90 °C.....	63
Figura 23 - Espectro CD da enzima na presença de Ca^{2+} , nas temperaturas de 30 até 90 °C.	63
Figura 24 - Detalhe dos espectros da enzima na presença e ausência de Ca^{2+}	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de purificação da enzima <i>MtAAOx</i>	51
Tabela 2 - Tabela de atividade específica da enzima..	58
Tabela 3 - Tabela das constantes catalíticas.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,5-FDCA	2,5-Ácido furandicarboxílico
5-HMF	5-hidróximetil furfural
AA	Atividade auxiliar
AAO	Aril-álcool oxidase
DCPIP	2,6-dicloroindofenol
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GMC	Glucose-metanol-colina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	COMPOSIÇÃO DA LIGNOCELULOSE	23
1.2	OXIDOREDUTASES DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO	26
1.3	SUPERFAMÍLIA GMC	28
1.4	ARIL-ÁLCOOL OXIDASE	28
1.5	APLICAÇÕES DE AAOS E OUTRAS OXIDOREDUTASES	30
1.6	BIORREFINARIAS E COMO OXIDOREDUTASES E PRODUTOS DE AAO SE ENCAIXAM	32
1.7	SOBRE O ORGANISMO	33
2	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVOS GERAIS	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	41
3.2	DEGLICOSILAÇÃO	42
3.3	TABELA DE PURIFICAÇÃO	42
3.4	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA E MODELO POR HOMOLOGIA	42
3.5	LIGAÇÃO AO FAD	43
3.6	ESTABILIDADE TÉRMICA DAS FORMAS GLICOSILADA E DEGLICOSILADA	43
3.7	ATIVIDADE ESPECÍFICA	43
3.8	CINÉTICA	43
3.9	ATIVIDADE COM HMF	43
3.10	EFEITO DE ÍONS E OUTROS ADITIVOS	44
3.11	DICROÍSMO CIRCULAR	44
3.12	CRISTALIZAÇÃO	44
4	RESULTADOS	47
4.1	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	47
4.2	DEGLICOSILAÇÃO	51
4.3	CRISTALIZAÇÃO	53
4.4	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA	54
4.5	PROPRIEDADES ESPECTRAIS	54
4.6	REDUÇÃO DO FAD	55

4.7	ESTABILIDADE TÉRMICA DAS FORMAS GLICOSILADA E DEGLICOSILADA.....	57
4.8	CONSTANTES CATALÍTICAS	58
4.9	ATIVIDADE COM 5-HMF	59
4.10	EFEITO DE ÍONS E OUTROS ADITIVOS	60
4.11	DICROÍSMO CIRCULAR.....	61
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	79

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A indústria moderna foi construída baseada na utilização de petróleo, carvão e gás natural. Esses recursos fósseis são finitos, além de seu consumo acarretar prejuízos ambientais como poluição e aquecimento global. Portanto, ao longo das últimas décadas a busca de matérias-primas renováveis para produção de combustíveis, químicos-plataforma, e seus derivados de alto valor agregado se intensificou.

A principal alternativa ao petróleo e carvão para suprir as necessidades energéticas e químicas é a biomassa lignocelulósica vegetal, que é barata, abundante e sustentável.(1) A biomassa lignocelulósica é a maior fonte natural de carbono renovável.(2) O uso de biomassa renovável para produção de combustíveis e produtos químicos tem as vantagens de maior retorno de investimentos na co-produção no sistema de biorrefinarias e diminuição da pegada de carbono.(3)

A biomassa é composta de proteínas, lipídios, ácidos graxos, lignina, e principalmente, de carboidratos, fonte muito rica de carbono.(2) A parede celular vegetal é composta de carboidratos e lignina, altamente resistente ao ataque de patógenos.

1.1 COMPOSIÇÃO DA LIGNOCELULOSE

A lignocelulose é um heteropolímero, e as subunidades estão conectadas por diferentes tipos de ligações. De maneira geral, a lignocelulose é composta de celulose (40%), hemicelulose (25%) e lignina (20%).(4) As porcentagens, assim como a composição de cada fração, variam de acordo com a origem da biomassa vegetal.

Celulose, componente de maior presença na biomassa e de importante papel estrutural, é um homopolímero composto de resíduos de glicose conectados por ligações β -(1,4). Hemicelulose, por sua vez, é um heteropolímero ramificado composto de resíduos de xilose e arabinano (pentoses), e de manose, glucose e galactose (hexoses), além de ácidos de açúcares; a composição de cada polímero varia, assim como as ligações que conectam os resíduos.(4)

A lignina é uma estrutura heterogênea, ramificada polifenólica, que confere rigidez e proteção contra invasão microbiana. Suas unidades básicas mais comuns são chamadas de monolignóis. Os três principais monolignóis são os álcoois *p*-cumaril, coniferil e sinapil

(Figura 1). Apesar de seus monômeros serem fenólicos, devido às ligações que os unem, que são variadas, e das quais a ligação β -aril éter (β -O-4) é a mais comum (5), o polímero final não tem caráter fenólico.(6)

Figura 1 - Monolignóis que constituem a lignina.
 Fonte: Elaborada pela autora.

A celulose e a hemicelulose podem ser convertidas em pentoses e hexoses, e subsequentemente utilizadas na produção de biocombustíveis e produtos químicos. Atualmente a lignina é queimada em biorrefinarias para suprir calor e eletricidade (5), mas tem grande potencial de utilização na produção de compostos de maior valor agregado como polihidróxialcanoatos e ácido mucônico (ambos com potencial uso em bioplásticos), ácidos graxos etc.(7) No entanto o uso mais eficiente desses polímeros depende de superar os problemas de recalcitrância e heterogeneidade, e do entrave na despolimerização completa ou mais eficiente da lignocelulose.

Como a lignocelulose é bastante recalcitrante e de difícil acesso as enzimas; para que as enzimas hidrolíticas tenham acesso à celulose e a hemicelulose, é comum que aconteça um processo de pré-tratamento. O pré-tratamento rompe a estrutura da lignina e da celulose cristalina, e permite que enzimas tenham acesso à celulose.(8) No entanto, o pré-tratamento químico, como o ácido, resulta também na formação de ácidos fracos, compostos fenólicos, e aldeídos furânicos etc, subprodutos indesejados por sua abundância, toxicidade e efeitos inibitórios sobre microrganismos utilizados em processos

downstream (8) Um pré-tratamento com custo/benefício eficiente também é uma preocupação.

A degradação da lignocelulose exige uma combinação de enzimas hidrolíticas e oxidoredutivas, que sejam capazes de quebrar as diferentes ligações presentes nos polímeros, e gerar moléculas que podem ser usadas na indústria.

No banco de dados de enzimas que atuam em carboidratos (Carbohydrate Active Enzyme Database – Cazy) (www.cazy.org), as enzimas estão classificadas em famílias, levando em consideração a sequência de aminoácidos. Entre essas famílias estão as hidrolases de glicosídeos (GHs), liases de polissacarídeos (PLs), esterases de carboidratos (CEs) e transferases de glicosídeos (GTs), assim como famílias de módulos de ligação aos carboidratos (CBMs). Em 2013 foi proposta uma nova categoria de família (9), a de enzimas de atividades auxiliares (AAs) caracterizadas por serem enzimas redox que atuam junto com as outras famílias na desconstrução dos carboidratos.

Na quebra da celulose atuam principalmente hidrolases, envolvendo geralmente três tipos: 1 - endocelulases, que clivam as ligações internas de forma aleatória, 2 - exocelulases que clivam a partir das extremidades redutoras e não redutoras, e 3 - beta-glucosidases clivam celo-oligossacarídeos (gerados pelos outros dois tipos) em glucose. Extratos secretados por fungos como *Trichoderma reesei* são utilizados na hidrólise enzimática de celulose.

Como a hemicelulose é um heteropolímero e, portanto, composta de diversos tipos de monômeros e ligações, sua decomposição exige a atividade não só de enzimas que atuam na quebra de ligações glicosídicas, mas também em ligações éster e outras, como as que ligam as cadeias laterais. Algumas das enzimas que atuam incluem: xilanases e xilosidases, mananases, acetil esterases.(4)

Os compostos modelo que compõem a lignina só podem ser desfeitos pela atuação de um pequeno grupo de enzimas, que precisam ser capazes de atacar estruturas fenólicas e não fenólicas. Os fungos que são capazes de atuar na lignina são divididos em dois grupos: *white-rot* e *brown-rot*, assim denominados pela cor dos resíduos formados após sua ação na lignina, sendo um resíduo branco celulósico e resíduo marrom de lignina, respectivamente.(6)

Fungos de tipo *white-rot* são valorizados por serem capazes de mineralizar a lignina sem consumo significativo dos carboidratos. Alguns degradam a lignina e celulose simultaneamente, enquanto outros degradam a lignina e depois a celulose. Secretam uma variedade de enzimas não específicas, como Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP), Peroxidase Versátil (VP) e lacases.(10)

Fungos do tipo *brown-rot*, por sua vez, fazem ataque não-enzimático à lignina, mas podem modificá-la, através de espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas a partir da reação de Fe^{2+} com H_2O_2 por reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} + \text{OH}\cdot$), e através de demetoxilação da lignina.(10)

Tanto *white-rot* quanto *brown-rot* possuem enzimas produtoras de H_2O_2 , e usam esse peróxido de hidrogênio na degradação da lignina (11)

Um problema do uso de fungos na degradação da lignina é que enzimas que participam da degradação também podem estar envolvidas na biossíntese de lignina, como as enzimas lacase e peroxidase versátil.(7,12) A repolimerização de lignina pode ser evitada pela atividade de enzimas como aril-álcool oxidase (AAOs) que oxidam radicais aromáticos, além de fornecerem H_2O_2 utilizado por peroxidases. (7) O uso de coquetéis de fungos *white-rot*, como *Bjerkandera* sp. e *Pleurotus eryngii*, tem potencial aplicação na degradação da lignina, e um estudo (7) mostrou que a atividade desses coquetéis está relacionada a presença de oxidoredutases, especialmente a lacases e flavoenzimas como AAO.

1.2 OXIDOREDUTASES DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Oxidoredutases são enzimas que catalisam a transferência de elétrons de uma molécula para outra, e para tal possuem cofatores (grupos prostéticos). Uma mesma enzima pode ter tipos diferentes de grupos prostéticos. No banco de dados Cazy essas enzimas estão agrupadas nas famílias AAs, e tratam principalmente das enzimas que atuam na lignina, como oxidases, desidrogenases, peroxidases e peroxigenases. Mas também incluem as que atuam em carboidratos (mono-oxigenases líticas de polissacarídeos, ou LPMOs).

Algumas das enzimas oxidoredutases que atuam sobre a lignina possuem íons metálicos no grupo prostético, incluindo as peroxidases ligninolíticas como lignina peroxidase, manganês peroxidase e peroxidase versátil, assim como peroxidase

inespecífica (UPO) e cloroperoxidase. Todas as mencionadas anteriormente possuem grupo heme. Mas os dois principais grupos de cofatores são: o grupo de enzimas que dependem de cofator cobre e o grupo que depende de cofator flavina. O íon cobre está presente nas enzimas glioxal oxidase, galactose oxidase, lacase e LPMO. (13)

Flavoenzimas são enzimas que possuem como grupo prostético flavina mononucleotídeo (FMN) ou flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) (Figura 2). Na maior parte das enzimas, o grupo prostético está fortemente ligado à enzima, mas em cerca de 10% a ligação é covalente. (14), e podem existir em três estados: estado oxidado, também chamado de quinona, reduzido em um elétron (semiquinona), e reduzido em dois elétrons (hidroquinona).(15)

Figura 2- Estruturas de flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O anel isoaloxazina oxidado é responsável pela cor amarela intensa.
Fonte: Elaborada pela autora.

A classificação das flavoenzimas depende de como o oxigênio é utilizado pelas enzimas, da afinidade da enzima por oxigênio, e dos produtos formados, podendo, dessa forma, serem descritas como oxidases, desidrogenases ou monooxigenases.(15) Glucose oxidase, álcool oxidase, aril-álcool oxidase, celobiose desidrogenase são algumas das flavoenzimas encontradas em fungos. Todas catalisam a retirada de dois elétrons do substrato, podendo o grupo flavina passa-los então para uma molécula de oxigênio,

gerando peróxido; sendo classificadas como oxidases nessa situação. Se os elétrons extraídos do substrato forem transferidos preferencialmente para outras moléculas que não oxigênio, as enzimas são classificadas como desidrogenases.(13)

Oxidases são importantes pois utilizam oxigênio molecular como aceptor de elétrons, em uma reação praticamente irreversível. (16)

Por só precisarem de oxigênio para catalisar reações, flavoenzimas são bastante atrativas como ferramenta biotecnológica; um exemplo de aplicação é a glucose oxidase presente em biossensores de monitoramento de glicose.(17)

As oxidases que possuem grupo flavina são divididas em seis superfamílias principais: GMC (glucose-metanol-colina), AO (amino), VAO (vanillil), ACO (acil-CoA), SO (sulfidril), estas cinco com FAD como grupo prostético. A sexta superfamília é HAC (hidróxiácido), que tem FMN como grupo prostético.(15)

1.3 SUPERFAMÍLIA GMC

A superfamília GMC foi proposta por Cavener em 1992 (18) e inclui as enzimas que dão nome a superfamília: glucose oxidase e glucose desidrogenase, metanol oxidase e colina desidrogenase. Os membros dessa superfamília catalisam reações distintas e são capazes de utilizar diferentes substratos, mas possuem arquitetura similar, com domínio de ligação ADP conservado, chamado de Rossmann *fold*, *fold* βαβ próximo ao amino terminal. As enzimas pertencentes a esta subfamília estão classificadas, no banco de dados Cazy, sob as famílias AA3_1 (celobiose desidrogenase, CDH), AA3_2 (glucose oxidase ou GOX, aril-álcool oxidase), AA3_3 (metanol oxidase ou MOX) e AA3_4 (piranose 2-oxidase ou P2O).

1.4 ARIL-ÁLCOOL OXIDASE

Aril-álcool oxidase (AAO), como o nome indica, é capaz de oxidar álcoois aromáticos. AAOs foram inicialmente identificadas na década de 1960 em culturas de *Trametes versicolor* (10), mas só foram caracterizadas algumas décadas depois, de fungos *Pleurotus* sp., e até os dias atuais são as mais caracterizadas. (8)

De forma geral, AAOs têm dois domínios, um domínio de ligação ao FAD e um domínio de ligação ao substrato.(19)

AAOs catalisam a oxidação de álcoois aromáticos a aldeídos aromáticos, com a liberação de peróxido de hidrogênio. Vários estudos que investigaram o mecanismo de reação de AAO já foram publicados (20-22), e mostram que esta reação acontece em duas partes: meia-reação redutiva seguida de meia-reação oxidativa. Durante a meia-reação redutiva dois elétrons são retirados do substrato, o grupo FAD é oxidado a FADH₂, e o aldeído é produzido. Na segunda etapa, os dois elétrons são transferidos para a molécula de oxigênio, que é reduzido, liberando H₂O₂, e assim o grupo FAD é reoxidado, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Reação do grupo FAD com substrato álcool. Durante a meia-reação redutiva, o FAD é reduzido a FADH₂ e o álcool convertido a aldeído; posteriormente ocorre a meia-reação oxidativa, com reoxidação e liberação de H₂O₂.

Fonte: Elaborada pela autora.

AAOs são capazes de oxidar derivados da lignina e metabólitos secundários dos próprios fungos, como ácidos e aldeídos convertidos a álcoois por desidrogenases. As AAOs caracterizadas mostraram grande variedade na especificidade de substratos que podem ser oxidados. Álcoois aromáticos fenólicos e não fenólicos em geral são aceitos, assim como já foram reportadas algumas AAOs capazes de oxidar também aldeídos aromáticos, substratos clorinados, e também substratos não aromáticos, como álcool alifático primário (23) e derivados de furanos. (24)

Acredita-se que AAOs estão envolvidas na degradação da lignina de duas formas principais, ambas relacionadas ao peróxido de hidrogênio que é produto da reação destas enzimas. Uma das formas com qual AAOs contribuem para ligninólise é a utilização do peróxido de hidrogênio que sustenta a atividade de peroxidases, presentes nos fungos do tipo *white-rot*. Estudos revelaram a presença de múltiplos genes para AAO nos genomas de fungos deste tipo, sendo os genes codificadores de enzimas GMC mais abundantes em

Bjerkandera adusta e *Ganoderma* sp.,(11) A segunda forma é que o peróxido de hidrogênio pode ser reduzido ao radical livre OH⁻, que pode então agir na lignina. Uma terceira forma, já mencionada anteriormente, é que a oxidação de certas moléculas liberadas durante a quebra da lignina previne que esta seja repolimerizada.

As AAOs caracterizam-se por serem monoméricas, ativas em pHs neutros e temperaturas de 25-45 °C. (25) Compatível com esse papel na degradação da lignina, AAOs são quase todas extracelulares (11, 26), como esperado de uma enzima que produz peróxido de hidrogênio que impulsiona peroxidases ligninolíticas. A produção contínua de peróxido de hidrogênio por AAOs provavelmente está inserida num ciclo redox juntamente com aril-álcool desidrogenases (AADs) miceliais, utilizando metabólitos aromáticos como substratos. (27)

Genes para enzimas AAOs são encontrados tanto em fungos *white-rot* quanto *brown-rot*, apesar de serem mais abundantes em *white-rot*.(11)

1.5 APLICAÇÕES DE AAOS E OUTRAS OXIDOREDUTASES

A utilização de enzimas na indústria já é comum, e novas aplicações continuam sendo investigadas. A utilização de enzimas como biocatalisadores apresenta algumas vantagens, e as principais razões são: condições amenas de reações, ao invés de condições extremas de pH, temperatura e pressão frequentemente encontradas em processos industriais; e seletividade do biocatalisador, que resulta em produtos com maior grau de pureza, e consequentemente, menos subprodutos indesejados são co-produzidos (28). As mesmas vantagens que o uso de enzimas proporciona também são gargalos na sua aplicação na indústria, que ainda busca enzimas de seletividade desejada e que sejam compatíveis com as condições extremas já mencionadas (13), e a produção de compostos aromáticos a partir da lignina ainda é um dos grandes desafios. Na indústria de biocombustíveis, enzimas ligninolíticas podem ter atuação na delignificação e detoxificação de compostos tóxicos.

Oxidoredutases tem grande potencial biotecnológico, mas dentre estas enzimas, as oxidases tem certa vantagem pois só precisam de oxigênio para a atividade, enquanto oxigenases e desidrogenases dependem do fornecimento de outras moléculas como doadores e receptores de elétrons, como NAD(P)H, que frequentemente encarecem o processo e sua aplicação.(17)

Aril-álcool oxidases têm potencial aplicação na indústria. Por seu conhecido papel na degradação da lignina, AAOs tem potencial aplicação como produtores de peróxido de hidrogênio, que possibilita a atividade de outras enzimas ligninolíticas. Nesse contexto AAOs podem ser usadas na indústria de papel.(10)

Na indústria de aromatizantes, a vanilina (aldeído) é um dos produtos de interesse, em sua maior parte produzida de origem petroquímica, e somente 1% de origem natural. No entanto já é produzido há muitos anos em escala industrial a partir da lignina da biomassa. (29) Mas o processo de produção e purificação inclui grande uso de solventes. Enzimas como a AAO caracterizada de *Bjerkandera adusta* são capazes de utilizar álcool vanílico como substrato. (30) Além de uso como aromatizantes, também foi proposto o uso de vanilina como químico-plataforma em substituição a monômeros aromáticos de origem fóssil.(29) Também na indústria de aromatizantes, *p*-anisaldeído e benzaldeído (odor de amêndoas) são produtos da oxidação de *p*-anisil álcool e benzil álcool, respectivamente, sendo *p*-anisil álcool o substrato preferencial de muitas AAOs e parte do ciclo de produção de H₂O₂ no processo ligninolítico.(27)

AAOs também vem sendo alvo de estudos para a síntese de 2,5-ácido furandicarboxílico (FDCA). FDCA foi listado, em relatório encomendado pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (31), como um dos doze principais *building blocks* produzidos a partir da biomassa, juntamente com ácidos succínico, fumárico e málico, ácido 3-hidróxi propiônico, ácido aspártico, ácido glucárico, ácido glutâmico, ácido itacônico, ácido levulínico, 3-hidróxibutirolactona, glicerol, sorbitol e xilitol. Estes *building blocks* são moléculas com diferentes grupos funcionais que podem dar origem a outros produtos químicos de maior valor. FDCA é investigado como um análogo do ácido tereftálico, precursor de PET (politereftalato de etileno), utilizado, por exemplo, em plásticos e tecidos, e de origem fóssil. AAOs teriam aplicação na produção de FDCA a partir da molécula 5-hidróximetil furfural (5-HMF), após oxidação dos grupos funcionais álcool e aldeído a grupos ácido carboxílico. A síntese de FDCA a partir de 5-HMF também é interessante pois 5-HMF é um subproduto da degradação da lignocelulose, formado da desidratação das hexoses, quando pré-tratamentos ácidos são utilizados. 5-HMF e furfural são os subprodutos mais tóxicos do pré-tratamento, inibindo o crescimento e fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*.(32) Sistemas que utilizam AAO em conjunto com outras enzimas redox para a conversão de 5-HMF a 2,5-FDCA já foram testados(24). A Figura 4 mostra a via de oxidação de 5-HMF a FDCA.

Figura 4 - Oxidação de 5-HMF a FDCA. HMF, 5-hidróximetil furfural; DFF, 2,5-furandicarboxaldeído; HmFCA, 5-hidróximetil-2-ácido furancarboxílico; FFCA, 5-formil-2-ácido furóico; FDCA, 2,5-ácido furandicarboxílico.

Fonte: Elaborada pela autora.

AAO também foi investigada como fornecedora de peróxido de hidrogênio para peroxidases, como foi o caso no qual AAO forneceu H_2O_2 para atividade de uma Peroxidase Descolorante (DyP), que teve atividade melhorada com o H_2O_2 suprido continuamente pela AAO do que o suprido de forma direta, e foi então capaz de degradar um corante.(33)

Uma das características das reações catalisadas por enzimas é a regioseletividade com que a maioria delas age, e a preferência de substratos. Devido a essas características, AAOs, assim como outras oxidoredutases têm potencial aplicação nas indústrias farmacêuticas e de química fina, nas quais misturas racêmicas são indesejadas, e somente um dos isômeros é de interesse.(10)

A utilização de enzimas, e especificamente oxidoredutases se encaixa no conceito de química verde, que é baseada em três pilares: i) minimização de resíduos, ii) evitar utilização de substâncias tóxicas ou perigosas e iii) uso de biomassa renovável.(3)

1.6 BIORREFINARIAS E COMO OXIDOREDUTASES E PRODUTOS DE AAO SE ENCAIXAM

Com o objetivo de eventualmente substituir as atuais refinarias de petróleo foi proposto o conceito de biorrefinarias que utilizem biomassa para a produção de combustíveis e produtos químicos-plataforma. A produção comercial de alguns dos *building blocks* já mencionados (e listados com 2,5-FDCA) a partir de fermentação já acontece, mas ainda sofre

com impedimentos, que incluem os baixos rendimentos obtidos e a dificuldade de separação dos produtos.(34) O processo de produção pode se tornar viável através da produção de produtos de alto e baixo valor na mesma planta. O aproveitamento da lignina, que atualmente é queimada como fonte de energia, para a produção de compostos aromáticos de maior valor poderia ser uma solução. Mas a otimização de processos enzimáticos exige coordenação de fatores como estabilidade das enzimas, taxas de reação, meios e design do sistema.(34)

A integração de produtos de baixo valor (biocombustíveis) com de alto valor (químicos) é problemática pela falta de tecnologia de conversão (por isso vale a pena estudar as oxidoredutases) e excesso de alvos, que são tanto os químicos plataforma produzidos atualmente pela indústria petroquímica quanto os novos, resultado da bioindústria, e que tem potencial de substituir os tradicionais (FDCA é um alvo a ser estudado).(35)

A lignina é gerada em grande escala como subproduto da produção de biocombustíveis, e da indústria de papel e celulose, e em muitos casos é queimada (5), mas tem muito potencial como fonte de moléculas aromáticas que não são obtidas por métodos químicos. (36)

1.7 SOBRE O ORGANISMO

Myceliophthora thermophila é um fungo ascomiceto filamentoso, termofílico, e que produz muitas enzimas hidrolases celulolíticas e hemicelulolíticas, além de ser fonte de várias enzimas de atividade auxiliar, como LPMOs e CDHs que também atuam na depolimerização da celulose, lacases e outras enzimas extracelulares que tem papel na degradação da lignina.(37)

Em experimentos nos quais *Myceliophthora thermophila* M77 foi incubada com diferentes fontes de carbono (que incluíram celulose, hemicelulose e biomassa), e os secretomas analisados, tanto celulasas hidrolíticas quanto enzimas de mecanismo redox foram detectadas, especialmente celobiose desidrogenase, monooxigenases líticas de polissacarídeos, uma enzima GMC oxidoredutase e uma glioxal oxidase. Estas duas últimas mais especificamente foram detectadas em grande abundância quando *M. thermophila* M77 cresceu em formas completas de biomassa, enquanto em biomassa delignificada não foram abundantes, (38) indicando seu envolvimento na degradação da lignina.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Produção heteróloga em *Aspegillus nidulans* da oxidase de álcoois aromáticos *MtAAOx*, de *Myceliophthora thermophila*, caracterização bioquímica e estrutural de *MtAAOx*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressão heteróloga em *A. nidulans* de *MtAAOx*;
- Purificação de *MtAAOx*;
- Determinação de especificidade de substrato e constantes catalíticas;
- Determinação de produtos de oxidação de 5-HMF;
- Modulação da atividade enzimática na presença de íons;
- Determinação de estabilidade térmica da enzima glicosilada e deglicosilada;
- Co-cristalização da enzima com substratos e determinação da estrutura..

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

O gene codificante para a enzima oxidase de álcoois aromáticos *MtAAOx*, de *Myceliophthora thermophila* foi clonado por Dr. Marco A. S. Kadowaki como descrito (39), e expresso em *Aspergillus nidulans*. Clones de *A. nidulans* foram mantidos em meio mínimo sólido composto de 5 g/L de glicose, 1 g/L piridoxina, 5% (v/v) sais de nitrato (360 g/L NaNO₃, 10,4 g/L KCl, 10,4 g/L MgSO₄, 30,4 g/L KH₂PO₄), 0,1% (v/v) elementos-traço (22 g/L ZnSO₄, 11 g/L H₃BO₃, 5 g/L MnCl₂.4H₂O, 5 g/L FeSO₄.7H₂O, 1,6 g/L CaCl₂.5H₂O, 1,6 g/L CuSO₄.5H₂O, 1,1 g/L NaMoO₄.4H₂O, 50 g/L NaEDTA, pH 6,5) e 9,5 g/L ágar, pH 6,5. O meio foi autoclavado e os esporos foram repicados em condições estéreis e incubados a 37 °C por 72 horas.

A enzima foi produzida de forma heteróloga em 3 L de meio líquido contendo 50 g/L xarope de milho de alta glicose (Corn Products Brasil), 5% (v/v) sais de nitrato, 0,1% (v/v) elementos-traço e 1 g/L piridoxina, pH 6,5, e filtrado de forma estéril (Corning). Os esporos foram raspados do meio sólido usando meio líquido e misturados e a expressão aconteceu em bandejas estáticas, a 37 °C por 40 horas.

O tapete micelial foi separado e descartado, e o extrato bruto foi filtrado em membrana Miracloth (Calbiochem), centrifugado (10000 g, 10 minutos) e o sobrenadante foi filtrado em Miracloth novamente. O filtrado foi então concentrado em membrana Hollowfiber (GE Healthcare) (*cutoff* 10 kDa) de fluxo tangencial, e mantido em gelo durante as etapas cromatográficas.

O concentrado proveniente da filtração em membrana Hollowfiber foi submetido a três etapas cromatográficas. Primeiro foi realizada a cromatografia de troca aniônica fraca em resina DEAE-Sephadex (Sigma-Aldrich), pré-equilibrada para retirada do contra íon, e efetuadas eluições com concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 mM NaCl em 50 mM Tris-HCl pH 8,0. As frações de eluição que continham a enzima foram reunidas, concentradas e dialisadas em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0 utilizando concentradores Vivaspin (GE Healthcare) com 30 kDa de *cutoff*. A segunda etapa cromatográfica foi de troca aniônica forte utilizando resina HiLoad 16/10 Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), pré-equilibrada com tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0 e realizada eluições em gradiente 0-1 M NaCl em 20 mM

Tris-HCl pH 8,0 em 20 volumes de coluna, com fluxo de 3 ml/min. As frações de eluição que continham *MtAAOx* foram concentradas em concentradores Vivaspin 30 kDa *cutoff* e submetidas a uma terceira etapa cromatográfica, de exclusão molecular, em coluna HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare) pré-equilibrada em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl, e com fluxo de 1 ml/min.

3.2 DEGLICOSILAÇÃO

Para os ensaios com enzima deglicosilada, 400 µL (8,8 mg/ml) de *MtAAOx* foram incubados com 0,5 µL Endo H (500,000 U/ml), 60 µL tampão G5 (10X) (ambos NEB) e incubados a 37 °C por 16 horas. Uma nova etapa de cromatografia de exclusão molecular foi necessária, em HiLoad 16/60 Superdex 200 pg equilibrada em tampão 50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl.

3.3 TABELA DE PURIFICAÇÃO

A eficácia das etapas de purificação foi monitorada por eletroforese SDS-PAGE com géis 15%, e as concentrações proteicas foram medidas por método de Bradford.(40) A atividade enzimática foi medida por meio de ensaios colorimétricos (mudança de absorção em 600 nm) utilizando 20 mM 3,4-dimetoxibenzil álcool (veratril álcool, Sigma), 100 mM tampão fosfato de sódio pH 6,0 e 0,2 mM 2,6-dicloroindofenol (DCPIP, Sigma) comoceptor de elétrons.

3.4 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA E MODELO POR HOMOLOGIA

A sequência de aminoácidos da enzima *MtAAOx* foi utilizada em busca na plataforma BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e alinhada com as sequências de AAOs conhecidas, retiradas do banco de dados Cazy. O modelo por homologia foi construído usando o servidor Phyre2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/), usando com a estrutura da AAO de *Pleurotus eryngii* (3FIM) como modelo.

3.5 LIGAÇÃO AO FAD

O espectro de absorbância da enzima foi registrado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), de 190-840 nm, antes e depois de tratamento térmico de 80 °C por 5 minutos (30) para verificar o tipo de ligação do grupo FAD. A redução do grupo FAD foi observada com a adição de 1 mM de veratril álcool.

3.6 ESTABILIDADE TÉRMICA DAS FORMAS GLICOSILADA E DEGLICOSILADA

Para medir as atividades da enzima *MtAAOx* nas formas glicosilada e deglicosilada, a enzima foi incubada por 0, 30, 60 e 120 minutos nas temperaturas de 50 e 60 °C. Após incubação, alíquotas da enzima foram retiradas e adicionadas a mistura de tampão 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 0,2 mM DCPIP, incubadas a 50 °C por 2 minutos, e a reação foi iniciada com a adição de 5 mM de veratril álcool. A diminuição na absorbância foi monitorada em 600 nm.

3.7 ATIVIDADE ESPECÍFICA

Atividade específica foi calculada com 2 mM dos substratos glicose, veratril álcool, anisil álcool, cinamil álcool e 5-HMF, em 100 mM tampão fosfato de sódio pH 6.0, em reação acoplada com 6 U/ml HRP e 60 µM Amplex Red (Thermo Fischer Scientific), e monitorada a 563 nm. Alternativamente, para 2 mM de 4-hidroxibenzil álcool e coniferil álcool, 100 mM tampão fosfato de sódio pH 6.0, a atividade foi medida por DCPIP. Em ambos os casos as reações foram incubadas a 30 °C. Todos os substratos foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.8 CINÉTICA

As constantes catalíticas K_m e V_{max} foram determinadas para os mesmos substratos e da mesma maneira que na atividade específica, nas concentrações que variaram de 0,025-40 mM de substrato. As constantes foram calculadas utilizando o software Origin.

3.9 ATIVIDADE COM HMF

Para verificar os produtos de oxidação de *MtAAOx* com 5-HMF, 5 µM da enzima foi incubada com 0,25 mM de 5-HMF, em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7.0, a 50 °C sob agitação por 24 horas. As reações foram então filtradas em concentradores centricon 10 kDa de *cutoff* para separar a enzima, o filtrado foi transferido para vials e as amostras injetadas para análise

(1) em coluna Aminex HPX-87H (Biorad 300 mm x 7.8 mm), com eluição de 5 mM H₂SO₄, a 60 °C com fluxo de 0,6 ml/min.

3.10 EFEITO DE ÍONS E OUTROS ADITIVOS

O efeito de 1 mM dos cátions K⁺, Ca²⁺, Li²⁺, Co²⁺, Sr²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺ e Fe³⁺, assim como de 20% (v/v) etanol, 0,1% SDS, 1% (v/v) Triton X-100 e 1% (v/v) Tween 20 foi avaliado na atividade enzimática. As reações continham 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 6.0, 0,5 µM *MtAAOx*, e 0,2 mM DCPIP. As reações foram incubadas por 2 minutos a 30 °C e iniciadas com a adição de 5 mM veratril álcool. A diferença de absorbância em 600 nm foi medida.

3.11 DICROÍSMO CIRCULAR

Análises de dicroísmo circular foram realizadas utilizando 0,2 mg/ml da enzima *MtAAOx* em 20 mM tampão fosfato de potássio pH 7,0 na ausência e presença de 60 µM Ca²⁺. Os espectros foram adquiridos em espectropolarímetro de CD Jasco J-815, em cubeta de 0,1 cm de caminho, com varredura de 200 a 260 nm, na velocidade de 50 nm/min, variado a temperatura de 25-90 °C a cada 5 °C. O conteúdo de estruturas secundárias foi calculado usando o software K2D3.

3.12 CRISTALIZAÇÃO

MtAAOx a 10 mg/ml foi incubada com 5 mM de veratril álcool, anisil álcool, coniferil álcool ou 5-HMF por 10 minutos a 4 °C. As soluções de cristalização foram efetuadas em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 9.0; 15% (w/v) PEG 6000; 0,2 M CaCl₂ nas proporções proteína: solução de cristalização de 1:1, 2:1 e 1:2, pelo método de gota suspensa.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

A oxidase de álcoois aromáticos *MtAAOx*, do fungo *Myceliophthora thermophila*, teve seu gene clonado (por Dr. Marco A. S. Kadowaki) em *Aspergillus nidulans*, no qual a enzima foi produzida de forma heteróloga. O fungo foi cultivado em bandejas estáticas, e a enzima, extracelular, foi purificada do caldo de cultivo. As etapas iniciais de purificação consistiram de filtração, centrifugação e concentração por fluxo tangencial. Três etapas de cromatografias foram necessárias para a purificação de *MtAAOx*. A primeira foi de troca aniônica fraca em resina DEAE-Sephadex, utilizando um gradiente de NaCl, com eluições da enzima nas concentrações de 300, 400 e 500 mM de NaCl (Figura 5).

Figura 5 - Gel de eletroforese SDS-PAGE da cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephadex. M, massa molecular dos padrões; 1, extrato bruto; 2-6, eluições com 100, 200, 300, 400 e 500 mM de NaCl, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

As frações eluídas contendo *MtAAOx* foram reunidas, e dialisadas antes da segunda etapa cromatográfica, troca aniônica forte em Q-Sepharose, e da qual *MtAAOx* também foi eluída com gradiente crescente de NaCl, sendo detectada na fração eluída, em dois picos distintos,

com aproximadamente 40% NaCl (Figura 6), provavelmente resultado de duas populações distintas da enzima (Figura 7).

Figura 6 - Cromatograma da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose. Os dois picos mais altos são correspondentes a enzima *MtAAOx*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 7 - Gel de eletroforese SDS-PAGE da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose. M, marcador de massa molecular, 1 e 2 são referentes aos picos dominantes do cromatograma.
Fonte: Elaborada pela autora.

A terceira e última etapa foi de exclusão molecular (Figura 8), da qual a proteína eluiu em um único pico. Como pode ser observado na Figura 9, do SDS-PAGE relativo a esta etapa, a proteína apresentou-se pura, mas com pequena banda correspondente a massa molecular menor, provavelmente proveniente de processos de degradação.

Figura 8 - Cromatograma de eluição da enzima em cromatografia de exclusão molecular.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 - Gel de eletroforese SDS-PAGE da cromatografia de exclusão molecular. M, marcador de massa molecular; 1, *MtAAOx*, eluída majoritariamente pura, com pequena banda de degradação.
Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 1, mostra a eficácia de cada etapa de purificação, e como pode ser observado 8,4 mg de enzima pura foram obtidos a partir dos 3 litros iniciais de cultivo. A diminuição da atividade específica pode ser causada pela interferência de outras proteínas também capazes de reduzir DCPIP, dificultando a melhor quantificação da atividade.

A GMC oxidoreductase *MtAAOx* aparece como uma banda entre 66 kDa e 97 kDa, sendo que a massa molecular teórica é de 67,55 kDa. A atividade da enzima foi detectada com DCPIP pois a interferência de outras enzimas é menor com este método, quando comparado com método de detecção de H_2O_2 produzido. *MtAAOx* foi concentrada e quantificada por absorção em 280 nm (com coeficiente de extinção teórico de $96050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), apresentando uma cor amarela intensa, característica de enzimas que possuem do grupo FAD.

Tabela 1 - Tabela de purificação da enzima *MtAAOx*.

Etapas	Volume (ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Atividade total	Recuperação (%)
HF TFF	135	65,08	11,77	766,09	100
DEAE- Sephadex	165	28,05	3,36	94,36	12,32
Q- Sephadex	47	12,22	4,16	50,79	6,63
Gel filtração	12	8,4	5,99	50,31	6,57

Fonte: Elaborada pela autora

4.2 DEGLICOSILAÇÃO

Uma parte da enzima foi deglicosilada com Endo H, glicosidase que remove manose e alguns tipos de N-glicosilações, e foi novamente purificada por cromatografia de exclusão

molecular. O deslocamento do pico relativo a *MtAAOx* pode ser visto no cromatograma (Figura 10) e no gel SDS-PAGE (Figura 11), onde a banda da enzima deglicosilada tem massa menor, mais próxima ao marcador de 66 kDa e ao valor teórico.

Figura 10 - Cromatograma da etapa de cromatografia de exclusão molecular da enzima *MtAAOx* após deglicosilação com EndoH.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 - Gel de eletroforese SDS-PAGE. 1, massa molecular dos padrões; 2, *MtAAOx* nativa; 3, *MtAAOx* deglicosilada.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 CRISTALIZAÇÃO

A enzima nativa *MtAAOx* foi posteriormente incubada com os substratos anisil álcool, coniferil álcool, 5-HMF e veratril álcool, utilizando solução de cristalização 0,1 M Tris-HCl pH 9,0, 15% (w/v) PEG 6000 e 0,2 M CaCl_2 . Cristais foram notados após uma semana com cada um dos substratos, na proporção 1 proteína: 2 solução de cristalização. No entanto os cristais não difrataram. A cristalização da enzima é dificultada pela presença de diferentes populações de glicosilações, assim como micro heterogeneidades dentro dessas populações.

Figura 12 - Cristais formados da enzima com o substrato coniferil álcool.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA

A análise Blastp da sequência de aminoácidos indicou identidade da enzima com a superfamília GMC oxidoreductase. Quando alinhada à sequências de AAOs conhecidas, *MtAAOx* teve baixas identidades, com 29% de identidade com as sequências de AAOs de *Ustilado maydis*, *Pleurotus sapidus* e *Pleurotus pulmonarius*, e 28% de identidade com a sequência de AAO de *Pleurotus eryngii*, cuja AAO é a mais estudada, sendo a única com estrutura cristalográfica disponível, e para a qual o modelo por homologia construído usando o servidor Phyre2 só teve 33% de identidade.

4.5 PROPRIEDADES ESPECTRAIS

Para investigar o tipo de ligação do grupo FAD a esta GMC oxidoreductase, o espectro da proteína purificada no UV foi medido antes e após tratamento térmico. Como pode ser observado na Figura 13, a enzima na forma oxidada tem perfil característico de membros da família GMC, com picos em aproximadamente 385 nm e 460 nm, e um “ombro” em 500 nm. A razão entre as absorbâncias em 280 nm e 460 nm foi de aproximadamente 10, e indicativo de que o grupo FAD estava corretamente incorporado as moléculas, e presente na forma

oxidada. Após o tratamento térmico, os picos relativos ao grupo FAD foram deslocados para a direita, com o pico que estava em 460 nm passando para 450 nm, relativo ao FAD livre. Portanto, após tratamento térmico, a enzima perdeu seu grupo FAD, mostrando que este não estava ligado de forma covalente a *MtAAOx*.

Figura 13 - Gráfico do espectro de absorvância da enzima nativa e após tratamento térmico, com liberação do grupo FAD.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 REDUÇÃO DO FAD

O espectro da forma reduzida também pode ser observado. Enquanto a forma oxidada possui os dois picos de FAD característicos de enzimas da família GMC na forma oxidada, a forma reduzida, quando na presença do substrato veratril álcool, perdeu-os, como mostrado na Figura 13 e Figura 14. O espectro da forma re-oxidada não foi observado nos 10 minutos seguintes, indicando que a transferência de elétrons da enzima para o oxigênio não ocorre de forma rápida.

Figura 14 - Espectro de absorbância da enzima nas formas oxidada e após redução com veratril álcool.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15 - Detalhe do espectro de absorbância antes e após redução com substrato.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 ESTABILIDADE TÉRMICA DAS FORMAS GLICOSILADA E DEGLICOSILADA

Como pode ser observado na figura 16, a atividade da forma deglicosilada não foi afetada quando incubada a 50 °C, e após duas horas de incubação as atividades estavam similares a inicial.

Figura 16 - Atividade residual da enzima glicosilada e deglicosilada após incubação a 50 °C.
Fonte: Elaborada pela autora.

No entanto, quando incubada a 60 °C (figura 17), a forma deglicosilada perdeu mais de metade de sua atividade após 30 minutos de incubação, restando apenas 10% da atividade inicial depois de duas horas. A forma nativa glicosilada da enzima *MtAAOx*, por outro lado, após duas horas de incubação a 60 °C ainda preservou 70% da atividade inicial.

Figura 17 - Atividade residual da enzima glicosilada e deglicosilada após incubação a 60 °C.
Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, as glicosilações são importantes para a termoestabilidade da enzima em temperaturas mais elevadas.

Atividade específica

A atividade da enzima com os substratos foi medida para veratril álcool, anisil álcool, cinamil álcool, coniferil álcool, 4-hidroxibenzil álcool, 5-hidróximetil furfural, e com glicose. Como pode ser observado na Tabela 2, a atividade específica foi parecida para anisil e cinamil, e um pouco mais baixa para veratril. Para o substrato 5-HMF a atividade medida foi bastante baixa. Atividade mais alta foi registrada com coniferil álcool, um dos monômero que compõem a lignina. Glicose não foi substrato para *MtAAOx*.

Tabela 2 - Tabela de atividade específica da enzima.

	Substrato	$\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$	Desvio	Método
Veratril álcool	3,66	0,12	AmplexRed
Anisil álcool	4,299	0,293	AmplexRed
Cinamil álcool	4,593	0,169	AmplexRed
5-hidróximetil furfural	0,13	0,02	AmplexRed
Coniferil álcool	701,46	17,82	DCPIP
4-hidróxibenzil álcool	79,34	5,82	DCPIP

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8 CONSTANTES CATALÍTICAS

As constantes catalíticas de *MtAAOx* foram calculadas e estão apresentadas na tabela 3. *MtAAOx* é capaz de oxidar álcoois aromáticos, tanto substratos fenólicos (coniferil álcool) quanto não fenólicos, e um substrato heterocíclico, 5-HMF. Como pode ser observado, o menor K_m (0,173 mM) foi medido quando coniferil álcool foi o substrato, e como esperado, 5-HMF teve o maior K_m (13,067 mM), seguido por 4-hidroxibenzil álcool. Com veratril e cinamil álcool os K_m s foram similares. Apesar do K_m mais alto para anisil, este teve o valor de k_{cat} calculado mais alto e parecido com o de cinamil álcool. A maior eficiência catalítica foi observada para o coniferil álcool.

Tabela 3 - Tabela das constantes catalíticas.

	Substrato	K _m (mM)	K _{cat} (min ⁻¹)	K _{cat} /K _m (min ⁻¹ . mM ⁻¹)
Veratril álcool	0,469 ± 0,090	6,94002E-11	1,48041E-10
Anisil álcool	1,002 ± 0,076	9,87566E-11	9,85956E-11
Cinamil álcool	0,494 ± 0,007	9,07765E-11	1,83735E-10
5-hidróximetil furfural	13,067 ± 3,151	1,13277E-11	8,66867E-13
Coniferil álcool	0,173 ± 0,010	1,19397E-08	6,91032E-08
4-hidróxibenzil álcool	6,253 ± 0,450	4,80055E-09	7,67673E-10

Fonte: Elaborada pela autora.

4.9 ATIVIDADE COM 5-HMF

MtAAOx, apesar de ter baixa afinidade por 5-HMF é capaz de utilizar esse substrato, com a formação de peróxido de hidrogênio concomitantemente. No entanto, como pode ser observado na figura 18, *MtAAOx* é capaz de oxidar não só o grupo funcional álcool, resultando em DFF (dois grupos aldeído), como também é capaz de oxidar o grupo aldeído a ácido carboxílico, resultando em FFCA.

Figura 18 - Produtos de oxidação de 5-HMF por *MtAAOx*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.10 EFEITO DE ÍONS E OUTROS ADITIVOS

O efeito de certos íons na atividade da enzima *MtAAOx* foi medido em relação a enzima na ausência de qualquer modulador de atividade. Os maiores ganhos de atividade ocorreram na presença dos íons lítio e cálcio, enquanto as perdas mais significativas de atividade foram observadas na presença dos íons divalentes cobre e bário. Os outros íons não tiveram ganho ou perda expressivos na atividade da enzima, assim como na presença de etanol e SDS. Na presença do detergente Tween 20, por outro lado, a atividade reduziu à metade. As atividades relativas podem ser observadas na figura 19.

Figura 19 - Atividade relativa da enzima após incubação com moduladores de atividade.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.11 DICROÍSMO CIRCULAR

A técnica espectroscópica de dicroísmo circular foi utilizada para determinar temperatura de *melting* (T_m) na ausência e presença de Ca^{2+} , assim como para prever o conteúdo de estrutura secundária de *MtAAOx*. Como pode ser observado na Figura 20, que mostra a transição em 222 nm, relacionada a estruturas secundárias do tipo α -hélice, na presença de Ca^{2+} , a T_m aumentou quase 5 °C, mesma diferença observada no comprimento de transição de folhas- β , 218 nm (Figura 21). Portanto mesmo uma pequena concentração de cátion divalente Ca^{2+} foi capaz de causar aumento na estabilidade da enzima.

Figura 20 - Curva de transição em 222 nm na presença e ausência de Ca^{2+} .
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21- Curva de transição em 218 nm na presença e ausência de Ca²⁺.
Fonte: Elaborada pela autora.

Também é possível observar nas Figuras 22 e 23 que o espectro (200-260 nm) da enzima na presença de cálcio é similar ao da enzima a 60 °C na ausência desses íons divalentes em solução. Quanto a predição de conteúdo de estruturas secundárias, calculado com software K2D3, *MtAAOx* apresentaria 35,91% de α -hélices e 16,14% de folhas- β . A enzima não renaturou após retorno a 25 °C.

Figura 22 - Espectro CD da enzima nativa, nas temperaturas de 30 até 90 °C.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 23- Espectro CD da enzima na presença de Ca²⁺, nas temperaturas de 30 até 90 °C.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 24 - Detalhe dos espectros da enzima na presença e ausência de Ca²⁺.
Fonte: Elaborada pela autora.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A lignina é um biopolímero aromático heterogêneo complexo, altamente rígido e recalcitrante que protege a parede celular vegetal e impede a invasão de microrganismos. No entanto, bactérias e fungos desenvolveram métodos para contornar esta barreira e acessar a celulose e hemicelulose.

Fungos basidiomicetos que são capazes de degradar a lignina são divididos em dois grupos, *white-rot* e *brown-rot*, assim divididos por utilizarem diferentes mecanismos de degradação. Os fungos classificados como *brown-rot* são capazes de acessar celulose e hemicelulose sem degradar a lignina, promovendo a modificação desta. Acredita-se que isso aconteça por meio de Reação de Fenton, na qual íons Fe^{2+} reagem com peróxido de hidrogênio, gerando espécies reativas Fe^{3+} , e radical OH que são então capazes de agir na estrutura da lignina. Fungos classificados como *white-rot*, por outro lado, são capazes de degradar a lignina, através da ação conjunta de diversas enzimas, entre as quais peroxidases LiP, MnP e VP se destacam, assim como lacases.

O peróxido de hidrogênio necessário para a atividade das peroxidases dos fungos *white-rot*, e para a formação de radicais nos fungos *brown-rot*, é fornecido através da atividade de outras enzimas. Entre as enzimas geradoras de peróxido podemos citar aril-álcool oxidase, glioxal oxidase e piranose oxidase. AAOs são encontradas tanto em *white-rot* quanto em *brown-rot*.

Fungos ascomicetos, por outro, bastante utilizados por sua capacidade celulolítica (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus nidulans*), parecem ter menor quantidade de enzimas redox, classificadas como “atividade auxiliar”, dedicadas a degradação da lignina.(41)

Enzimas oxidases de álcoois aromáticos (AAOs) pertencem a superfamília GMC de oxidoredutases, e são classificadas como enzimas de atividade auxiliar da família AA3 e subfamília AA3_2 (que também inclui glucose 1-oxidase), no banco de dados Cazy. Possuem um grupo cofator FAD, característico de enzimas GMC.

A enzima MtAAOx do fungo ascomiceto termofílico *Myceliophthora thermophila* é uma glicoproteína capaz de utilizar álcoois aromáticos como doadores de elétrons, e de utilizar oxigênio molecular como receptor final de elétrons, produzindo peróxido de hidrogênio e aldeído aromático.

MtAAOx, foi produzida de forma heteróloga no também ascomiceto *Aspergillus nidulans*, e purificada a partir de um meio no qual o tapete micelar cresceu por aproximadamente 40 horas a 37 °C. Durante a purificação da enzima, na segunda etapa de cromatografia de troca aniônica, a enzima eluiu em dois picos distintos, o que pode ser indicativo de duas populações distintas da enzima, causadas pela heterogeneidade nas glicosilações. Essa variação nas glicosilações, e variações mesmo dentro de cada população tornam ainda mais difícil a cristalização desta enzima para determinação de sua estrutura. Até o momento só há disponível uma única estrutura de AAO (3FIM (42)), de *P. eryngii* produzida em *E. coli*, que não glicosila as proteínas. *UmAAO*, enzima recombinante produzida em *P. pastoris* também não foi glicosilada.

Após as etapas de purificação, o rendimento calculado foi de 8,4 mg de enzima, e portanto, 2,8 mg por litro de meio, mais baixo que outras expressões heterólogas de AAO. Outros sistemas de expressão heteróloga de AAOs testados até o momento também têm armadilhas. Para a AAO*, de *P. eryngii* produzida em *E. coli*, a proteína é purificada de corpos de inclusão, re-enoveladas e reativadas de forma bastante trabalhosa. Além disso, apesar dos altos rendimentos obtidos na produção em *E. coli*, a proteína recombinante não possui glicosilações, e portanto não são tão estáveis.(43) Produção de enzimas de basidiomicetos em ascomicetos também foram problemáticas. Para superar as dificuldades encontradas nos outros sistemas de expressão heteróloga, na primeira produção em *host* basidiomiceto, AAO de *P. sapidus* em *Coprinopsis cinerea* (33), altos rendimentos também não foram obtidos, mas a enzima ao menos foi glicosilada.

Como outras AAOs até o momento caracterizadas, *MtAAOx* é monomérica e apresenta FAD não ligado covalentemente, como observado em outras GMCs como piranose oxidase, também AA3_2. É também extracelular. A única AAO intracelular caracterizada até o momento foi uma AAO (homóloga) do fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* (26), mas em estudo que buscou genes codificadores de enzimas GMC produtoras de H₂O₂, outras sequências foram encontradas sem peptídio sinal para secreção da enzimas codificadas.(11) O papel que tais enzimas realizariam ainda não foi elucidado.

A enzima tem massa molecular teórica de aproximadamente 67 kDa, valor que condiz com a banda referente a enzima quando tratada com glicosidase Endo H, e valor similar a rCcAAO, 65,6 kDa (44) e a AAO de *P. eryngii* produzida em *E. coli*, 61,8 kDa (43). No entanto, quando glicosilada, a banda aparece como equivalente a massa molecular maior de cerca de 79 kDa, similar as outras AAOs glicosiladas que já foram caracterizadas.

Como foi mostrado, após deglicosilação a enzima perdeu estabilidade térmica quando incubada a 60 °C. Dessa forma as glicosilações são importantes para a estabilidade da enzima. A AAO produzida em *E. coli* apresentou estabilidade térmica reduzida quando comparada a mesma enzima produzida em *E. nidulans*, e portanto, glicosilada (43), enquanto as variantes hiperglicosiladas pela produção em *S. cerevisiae* apresentaram ganho de mais de 10 °C em T₅₀ quando comparada à selvagem.(45)

MtAAOx é uma oxidase, e portanto, utiliza oxigênio molecular como aceptor de elétrons. No entanto, *MtAAOx* também se mostrou capaz de utilizar DCPIP como aceptor. É importante observar, no entanto, que mesmo quando DCPIP é usado, O₂ é um competidor.

A utilização de outros aceptores além do oxigênio não é característica de todas as aril-álcool oxidases. *rCcAAO*, de *Coprinosia cinerea*, não foi capaz de usar DCPIP como aceptor (44), enquanto *UmAAO* (41), do fungo fitopatogênico *Ustilago maydis*, foi capaz de utilizar DCPIP e 1,4-benzoquinone (BQ) como aceptores, BQ sendo preferido a oxigênio. Outra enzima pertencente à subfamília AA3_2 e capaz de oxidar substratos fenólicos e não fenólicos, *PcAAO3* (46), inicialmente classificada como AAO, assim como *UmAAO*, também preferiu quinonas e DCPIP como aceptores.

A menor reatividade com oxigênio e capacidade de usar outros aceptores sugere que algumas AAOs podem ter papéis diferentes, que não a produção de peróxido de hidrogênio que sustenta atividade de peroxidases. Os autores (41) sugeriram que a enzima pode ter papel de detoxificação de compostos da degradação da lignina, enquanto (46) sugerem também sinergismo com lacases, o qual evitaria a repolimerização de resíduos da lignina.

Com relação aos doadores de elétrons, esta aril-álcool oxidase é capaz de oxidar álcoois benzílicos e cinâmicos fenólicos e não fenólicos. Glucose não é substrato para *MtAAOx*, apesar de sua sequência de aminoácidos ter similaridades com as das enzimas glicose oxidase e desidrogenase.

MtAAOx teve Km similar para veratril e cinamil álcoois. O Km de 0,47 para veratril álcool foi similar aos Kms observados para outras oxidases de álcoois aromáticos, como a AAO de *P. eryngii* selvagem (23), e as AAOs de *P. eryngii* heterólogas, produzidas em *E. coli* em *A. nidulans* (47) e a produzida em *E. nidulans* (20), AAO de *P. sapidus* produzida em *C. cinerea* (33), a AAO de *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*. No entanto, é maior que os valores reportados para a AAO de *C. cinerea* produzida em *P. pastoris* (0,048 mM) (44), mas a

afinidade é maior para esse substrato que as AAOs de *Geotrichum candidum* (48) e *Bjerkandera adusta* (30).

O *p*-anisil álcool, que em relação ao veratril álcool, não possui o grupo metóxi na posição 3 do anel benzílico, e que na maioria das AAOs de *Pleurotus* sp., é o melhor substrato, teve afinidade muito menor. O K_m de aproximadamente 1 mM para esse substrato é muito superior não só aos valores das AAOs de *Pleurotus*, quanto ao da AAO de *U. maydis* produzida em *P. pastoris* (0,0048 mM), *G. candidum* (0,5 mM) e *B. adusta* (0,187 mM).

Para cinamil álcool o K_m foi similar ao K_m de veratril, apesar de serem bastante distintos, pois cinamil, além de não ter nenhum grupo metóxi como veratril ou anisil, é um álcool α,β -insaturado. Este K_m foi mais similar ao registrado para a AAO de *P. eryngii* produzida em *E. nidulans* (0,7 mM), mas superior ao da *UmAAO*, cuja afinidade por cinamil álcool foi intermediária entre anisil e veratril álcool.

Com o substrato 4-hidroxibenzil álcool, que é um composto fenólico e desprovido de qualquer grupo metóxi, a afinidade foi baixa, de 6 mM, inferior as afinidades de *UmAAO* (0,042 mM), e de AAO de *C. cinerea* expressa em *P. pastoris*.

Coniferil álcool, um dos componentes da lignina, é similar ao cinamil álcool, e em relação a esse possui adicionalmente um grupo fenol, e um grupo metóxi, e foi com esse substrato que foi observado a maior afinidade de *MtAAOx*, com K_m de 0,17 mM, valor menor que os observados para a enzima isolada de *B. adusta* (1,8 mM) e a *PcAAQO* produzida em *A. niger*, que no entanto não são classificadas como AAOs. Outra AAO que foi capaz de oxidar coniferil álcool foi a AAO de *P. ostreatus*.(49) *MtAAOx* também foi capaz de oxidar sinapil álcool, outro componente da lignina, que em relação a coniferil possui um grupo metóxi na posição 5 do anel aromático. No entanto não foi possível quantificar a oxidação.

A oxidação de compostos álcoois aromáticos fenólicos é característica de outro tipo de flavooxidases, a vanilil álcool oxidase (VAO). VAO, classificado no banco de dados Cazy como AA4, constitui uma superfamília separada da superfamília GMC, que só oxida compostos aromáticos, e cujo grupo FAD é ligado de forma covalente a enzima, por até duas ligações, e há hipótese (17) que o sítio catalítico maior desta enzima permite que substratos maiores sejam aceitos, sem que haja perda do grupo FAD. Outras AAOs capazes de oxidar compostos fenólicos são: AAO de *P. chrysosporium* (26) e de *C. cinerea* (44), ambas capazes de oxidar vanilil álcool.

Não foi testada a atividade de *MtAAOx* com álcoois alifáticos poli-insaturados, como 2,4-hexadien-1-ol, que apesar da ausência de anel aromático, é um bom substrato para várias AAOs, como a de *P. eryngii* (23). Outros compostos que servem como substrato para AAOs, mas que não foram testados, são álcoois benzílicos halogenados como 3-cloro-benzil álcool e 3-cloro-*p*-anisil álcool. A atividade de AAOs com esses compostos está relacionado à atividade ligninolítica dos fungos dos quais se originam, pois são metabólitos produzidos pelos fungos, e frequentemente encontrados em meios de cultura, como *B. adusta*, que produz compostos clorinados.

Além disso, já foi mostrado que além de álcoois, AAOs são capazes de, lentamente, oxidar também aldeídos aromáticos, resultando em ácido carboxílico e peróxido de hidrogênio. (23) Por essa capacidade de oxidar uma grande variedade de substratos distintos, a atividade foi avaliada com 5-HMF, que não é aromático, e possui tanto grupo funcional álcool quanto aldeído. Foi com esse substrato que *MtAAOx* teve menor afinidade, com K_m de 12 mM. *P. eryngii* AAO produzida em *E. coli* teve afinidade muito maior por esse substrato, com K_m de 1,6 mM (24), valor distinto calculado para *PeryAAO* (de *P. eryngii* selvagem), de 36.3 mM e de 7,2 mM para a *PostAAO* (de *P. ostreatus* selvagem).(50)

Os valores discrepantes em relação a literatura com relação a alguns substratos podem ser causados pelas diferentes formas de quantificação, que pode ser pela absorbância do produto aldeído, ou por quantificação de peróxido de hidrogênio por reações conjugadas com *horseradish* peroxidase (HRP), que não permitiu atividade na temperatura ótima da enzima, e por redução de outros compostos, se a enzima é capaz de tal.

Mas pode-se concluir que esta *MtAAOx* parece preferir substratos maiores como coniferil e veratril álcoois a substratos menores como *p*-anisil ou 4-hidroxibenzil álcoois, ou 5-HMF. *MtAAOx* tem baixa afinidade por *p*-anisil álcool, substrato preferido de parte das AAOs caracterizadas até o momento.

A estrutura das GMCs podem ser divididas de forma geral em dois domínios, um de ligação a flavina onde o sítio catalítico se localiza, e que tende a ser conservado entre os membros, e um domínio de ligação ao substrato, que varia bastante, e reflete a grande quantidade de substratos aceitos e reações que as enzimas são capazes de realizar.(51) A preferência por substratos mais volumosos poderia indicar um sítio catalítico maior de *MtAAOx* com relação as outras. No entanto, sítios catalíticos maiores não são necessariamente bons para que a reação aconteça, já que o oxigênio molecular, componente

essencial da reação de oxidases, é uma molécula pequena e hidrofóbica, e prefere caminhos menores, com menos água e mais hidrofóbicos (15), o que explicaria a menor reatividade com oxigênio molecular observada.

Estruturas de outras flavoenzimas indicam que oxigênio molecular é guiado pelas enzimas por túneis, e o acesso ao sítio catalítico é controlado por aminoácidos “porteiros”; mutações nesses aminoácidos podem aumentar a reatividade da enzima com oxigênio.(15) Estudos a partir da única estrutura de AAO disponível, de *P. eryngii* produzida em *E. coli* (42), indicam canal de acesso do substrato ao sítio catalítico formado por 3 aminoácidos aromáticos: Tyr92, Phe397 e Phe501, que formam um canal hidrofóbico pelo qual tanto o substrato álcool quanto o oxigênio entram. O resíduo Phe397 fica em um loop que protege o sítio catalítico, e tem papel tanto no posicionamento correto do substrato, reatividade com oxigênio, quanto na liberação do produto.(52) rCcAAO, ao invés de Phe397 tem uma Leu416, criando uma cavidade maior, a qual os autores atribuíram a maior gama de substratos oxidados pela enzima (44), o mesmo sendo observado para as PcAAQOs (46), nas quais nem todos os resíduos do canal de acesso são aromáticos, e o canal mais largo de acesso do substrato e do oxigênio justificam a diversidade de substratos, aceptores de elétrons e baixa reatividade com oxigênio, apesar da similaridade de sequência e estrutura com AAOs.

Além dos resíduos mencionados, também são de importância os dois resíduos catalíticos aromáticos próximos ao FAD, His502 e His546, envolvidos na ativação e posicionamento do substrato, assim como reatividade com o oxigênio. Mutações nesses resíduos podem resultar em completa inativação da enzima, como mutações para serina e leucina.(53) Mutações dirigidas para esses resíduos, por outro lado, podem melhorar posicionamento do substrato e reatividades.

Ensaio nos quais *MtAAOx* foi incubada com cátions antes da reação mostram que há aumento da atividade na presença de Li^+ , e cátions divalentes como Ca^{2+} e Co^{2+} , enquanto Cu^{2+} afetou bastante negativamente a atividade. Além disso, *MtAAOx* só foi cristalizada em soluções que continham Ca^{2+} . Por esse motivo, este cátion também foi avaliado com relação a estabilidade térmica da enzima, por meio de espectroscopia CD.

Por CD foi possível verificar um aumento de cerca de 4 °C na temperatura de *melting* da enzima, acima de 60 °C, condizente com o organismo termofílico do qual a enzima foi clonada. Mesmo em baixa concentração de cálcio, é possível ver diferença nos espectros

registrados. Estabilização de oxidoreductase por íons Ca^{2+} também foi observado em uma peroxidase versátil.(54)

Com relação as estruturas secundárias preditas por CD, esta AAO parece ter maior conteúdo de α -hélices, e menor de folhas- β , quando comparada as AAOs de *P. eryngii* produzidas de forma heteróloga em *E. coli* e *E. nidulans*. Os valores tiveram porcentagem predita similar para esses dois tipos de estrutura, sendo $21\pm 2\%$ e $27\pm 1\%$ em *PeAAO* em *E. coli*, e $24\pm 6\%$ e $28\pm 3\%$ em *PeAAO* *E. nidulans*, as porcentagens de α -hélice e folhas- β , respectivamente.(43) Novamente, as porcentagens bastante distintas são causadas pela baixa identidade entre as sequências dessas enzimas.

Apesar da baixa afinidade por 5-HMF, *MtAAOx*, além de ser capaz de atuar na oxidação de grupos álcool, também foi capaz de oxidar o grupo aldeído, aumentando ainda mais o leque de substratos aceitos, e abrindo a possibilidade de exploração desta enzima para outras aplicações biotecnológicas. Oxidoreductases são interessantes para a indústria biotecnológica e AAOs tem potencial aplicação na indústria de aromatizantes, de papel e celulose como fornecedores de peróxido de hidrogênio para outras enzimas, e para evitar repolimerização da lignina.

Também começaram a ser investigadas, como neste trabalho, para a conversão de 5-HMF a 2,5-FDCA, já que 5-HMF além de subproduto tóxico do pré-tratamento da lignocelulose, é também precursor do *building block* 2,5-FDCA, de potencial aplicação extensa na indústria de biopolímeros. Outras oxidoreductases já foram investigadas como participantes para esta reação, como galactose oxidase (1), e a recém descoberta HMF oxidase (HMFO) (55), sendo que esta última é capaz de produzir o produto final, 2,5-FDCA, de interesse. Não foi o caso para *MtAAOx*, nem para as AAOs de *P. eryngii* (24) ou *B. adusta* (50). Mas diferentemente de *MtAAOx*, *PeAAO* converteu HMF a FFCA rapidamente, por meio do intermediário DFF, enquanto AAO de *B. adusta* só teve como produto DFF, e o autor sugeriu inibição por H_2O_2 . Foi notado também que a oxidação de 5-HMF depende do pH de reação, *PeryAAO* e *PostAAO* apresentando perfis diferentes de produtos dependendo do pH (50). Já que FDCA não é naturalmente oxidado por AAOs a partir de 5-HMF, esta enzima vem sendo estudada em sistemas de cascatas enzimáticas com outras oxidoreductases, como UPOs (24, 50), que além de fazerem a conversão final, ajudam a remover o peróxido de hidrogênio do meio. Os intermediários da reação HMF a FDCA também são de interesse, por serem de difícil obtenção química (28). Apesar dos rendimentos modestos, otimização de

condições de pH, concentrações de substratos e combinação com outras enzimas associadas podem tornar o processo mais viável; otimização da enzima também pode ser uma solução para aumentar o produto.

A baixa produção de peróxido de hidrogênio por esta enzima sugere que ela pode ter outro papel para degradação da lignina, que não o sustento das atividades de peroxidases ou formação de radicais livres. Outras enzimas de atividade auxiliar reportadas para *M. thermophila* foram as LPMOs e CHDs envolvidas no processo celulolítico, e lacases, enzimas com múltiplos íons cobre que são capazes de oxidar substratos fenólicos como os derivados da lignina (37) *M. thermophila* produziu mais GMC oxidoreductase e mais glioxal oxidase quando o fungo foi crescido em meio com biomassa completa (38), sendo que glioxal oxidase também é produtora de peróxido de hidrogênio.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

MtAAOx, uma nova aril-álcool oxidase, do fungo ascomiceto termofílico *Myceliophthora thermophila*, foi produzida em *A. nidulans*, purificada e caracterizada bioquimicamente. A enzima tem especificidade de substratos ampla, sendo capaz de oxidar álcoois aromáticos e aldeído, o que pode ter aplicações biotecnológicas. A enzima é termofílica, com atividade aumentada na presença de alguns íons e temperatura de *melting* elevada na presença de Ca^{2+} . É uma nova adição ao pouco caracterizado grupo de AAOs, e a primeira AAO de ascomiceto a ser descrita.

REFERÊNCIAS

- 1 MCKENNA, S. M. et al. Enzyme cascade reactions: synthesis of furandicarboxylic acid (FDCA) and carboxylic acids using oxidases in tandem. **Green Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 3271–3275, 2015.
- 2 PUTTEN, R. VAN et al. Hydroxymethylfurfural, a versatile platform chemical made from renewable resources. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 3, p. 1499–1597, 2013.
- 3 SHELDON, R. A. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. **Green Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 950–963, 2014.
- 4 RAGHAVENDRA, M. P.; NAKAYA, S. C.; GUPTA, V. K. Microbial enzymes for conversion of biomass to bioenergy. In: GUPTA, V. K. (Ed.). **Microbial enzymes in bioconversions of biomass: biofuel and biorefinery technologies**. Berlin: Springer International Publishing, 2016. v. 3. p. 1–26.
- 5 CHEN, Z.; WAN, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 610–621, 2017. doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.166.
- 6 RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, Á. T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 164–177, 2009.
- 7 SALVACHÚA, D. et al. Lignin depolymerization by fungal secretomes and a microbial sink. **Green Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 6046–6062, 2016.
- 8 WIERCKX, N. et al. Microbial degradation of furanic compounds: Biochemistry, genetics, and impact. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1095–1105, 2011.
- 9 LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41, 2013.
- 10 CARRO, J. et al. Fungal aryl-alcohol oxidase in lignocellulose degradation and bioconversion. In: GUPTA, V. K. (Ed.). **Microbial enzymes in bioconversions of biomass: biofuel and biorefinery technologies**. Berlin: Springer International Publishing, 2016. v. 3. p. 301–322.
- 11 FERREIRA, P. et al. A survey of genes encoding H₂O₂-producing GMC oxidoreductases in 10 Polyporales genomes. **Mycologia**, v. 107, n. 6, p. 1105–1119, 2015.
- 12 MUNK, L. et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 13–24, 2015.
- 13 MARTÍNEZ, A. T. et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 6, p. 815–831, 2017.

- 14 STARBIRD, C. A. et al. **Flavoenzymes**: covalent versus noncovalent. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9780470015902.a0026073>>. Acesso em: 30 abr. 2018
- 15 ROMERO, E. et al. Same substrate, many reactions: oxygen activation in flavoenzymes. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 4, p. 1742–1769, 2018.
- 16 PICKL, M. et al. Rational engineering of a flavoprotein oxidase for improved direct oxidation of alcohols to carboxylic acids. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2205, 2017.
- 17 DIJKMAN, W. P. et al. Flavoprotein oxidases: classification and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5177–5188, 2013.
- 18 CAVENER, D. R. GMC oxidoreductases: a newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. **Journal of Molecular Biology**, v. 223, n. 3, p. 811–814, 5 fev. 1992.
- 19 HERNÁNDEZ-ORTEGA, A.; FERREIRA, P.; MARTÍNEZ, A. T. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1395–1410, 2012.
- 20 FERREIRA, P. et al. Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. **Biochemical Journal**, v. 389, p. 731–738, 2005.
- 21 _____. Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation. a mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two alcohol substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 37, p. 24840–24847, 2009.
- 22 CARRO, J. et al. Stepwise hydrogen atom and proton transfers in dioxygen reduction by aryl-alcohol oxidase. **Biochemistry**, v. 57, n. 11, p. 1790–1797, 2018.
- 23 GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *pleurotus eryngii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, n. 2, p. 603–611, out. 1992.
- 24 CARRO, J. et al. 5-Hydroxymethylfurfural conversion by fungal aryl-alcohol oxidase and unspecific peroxigenase. **FEBS Journal**, v. 282, n. 16, p. 3218–3229, 2015.
- 25 GOSWAMI, P. et al. An overview on alcohol oxidases and their potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4259–4275, 2013.
- 26 ASADA, Y. et al. Purification and characterization of an aryl-alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *phanerochaete chrysosporium*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 7, p. 1339–1341, 1995.
- 27 GUTIERREZ, A. et al. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *pleurotus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1783–1788, 1994.

- 28 DOMINGUEZ DE MARIA, P.; GUAJARDO, N. V. Biocatalytic valorization of furans: opportunities for inherently unstable substrates. **ChemSusChem**, v. 10, p. 4123–4134, 2017. doi: 10.1002/cssc.201701583.
- 29 FACHE, M.; BOUTEVIN, B.; CAILLOL, S. Vanillin production from lignin and its use as a renewable chemical. **Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 1, p. 35–46, 2015.
- 30 ROMERO, E. et al. New oxidase from *Bjerkandera arthroconidial* anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - proteins and proteomics**, v. 1794, n. 4, p. 689–697, 2009.
- 31 WERPY, T.; PETERSEN, G. **Top value added chemicals from biomass**: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. 2004. Disponível em: <<https://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- 32 FELDMAN, D. et al. Detoxification of 5-hydroxymethylfurfural by the *pleurotus ostreatus* lignolytic enzymes aryl alcohol oxidase and dehydrogenase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 63, 2015. doi.org/10.1186/s13068-015-0244-9.
- 33 GALPERIN, I. et al. An aryl-alcohol oxidase of *pleurotus sapidus*: heterologous expression, characterization, and application in a 2-enzyme system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 18, p. 8021–8030, 2016.
- 34 BOISEN, A. et al. Process integration for the conversion of glucose to 2,5-furandicarboxylic acid. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, n. 9, p. 1318–1327, 2009.
- 35 BOZELL, J. J.; PETERSEN, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates - the US Department of Energy's Top 10: revisited Biobased products are the foundation of successful biorefinery development. **Green Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 539–554, 2010.
- 36 JIANG, Y.; LOOS, K. Enzymatic synthesis of biobased polyesters and polyamides. **Polymers**, v. 8, n. 7, 2016. doi.org/10.3390/polym8070243.
- 37 KARNAOURI, A. et al. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 281, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00281.
- 38 DOS SANTOS, H. B. et al. *Myceliophthora thermophila* M77 utilizes hydrolytic and oxidative mechanisms to deconstruct biomass. **AMB Express**, v. 6, n. 1, 2016. doi: 10.1186/s13568-016-0276-y.
- 39 GODOY, A. S. et al. Structure, computational and biochemical analysis of PcCel45A endoglucanase from *Phanerochaete chrysosporium* and catalytic mechanisms of GH45 subfamily C members. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.
- 40 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

- 41 COUTURIER, M. et al. Characterization of a new aryl-alcohol oxidase secreted by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 2, p. 697–706, 2016.
- 42 FERNÁNDEZ, I. S. et al. Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 65, n. 11, p. 1196–1205, 2009.
- 43 RUIZ-DUEÑAS, F. J. et al. In vitro activation , purification , and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase , a unique H₂O₂-producing enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 1, p. 191–199, 2006.
- 44 TAMARU, Y.; UMEZAWA, K.; YOSHIDA, M. Characterization of an aryl-alcohol oxidase from the plant saprophytic basidiomycete *Coprinopsis cinerea* with broad substrate specificity against aromatic alcohols. **Biotechnology Letters**, 2018. doi: 10.1007/s10529-018-2534-3.
- 45 VIÑA-GONZALEZ, J. et al. Focused directed evolution of aryl-alcohol oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* by using chimeric signal peptides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6451–6462, 2015.
- 46 MATHIEU, Y. et al. Activities of secreted aryl alcohol quinone oxidoreductases from *Pycnoporus cinnabarinus* provide insights into fungal degradation of plant biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 8, p. 2411–2423, 2016.
- 47 VARELA, E. et al. Expression of *pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta** - protein structure and molecular enzymology, v. 1546, n. 1, p. 107–113, 2001.
- 48 JUN KIM, S. et al. Characterization of aryl alcohol oxidase produced by dye-decolorizing fungus, *Geotrichum candidum* Dec1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 2, p. 166–172, 2001.
- 49 SANNIA, G. et al. Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - general subjects, v. 1073, n. 1, p. 114–119, 1991.
- 50 KARICH, A. et al. Enzymatic preparation of 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA)—a substitute of terephthalic acid—by the joined action of three fungal enzymes. **Microorganisms**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2018.
- 51 SÜTZL, L. et al. Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3 family. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2477–2492, 2018.
- 52 CARRO, J. et al. Multiple implications of an active site phenylalanine in the catalysis of aryl-alcohol oxidase. **Scientific Reports**, p. 1–12, 2018. doi:10.1038/s41598-018-26445-x.

- 53 FERREIRA, P. et al. Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H₂O₂-producing ligninolytic enzyme. **FEBS Journal**, v. 273, n. 21, p. 4878–4888, 2006.
- 54 LÚ-CHAU, T. A. et al. Effect of pH on the stability of pleurotus eryngii versatile peroxidase during heterologous production in Emericella nidulans. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 5, p. 287–293, 2004.
- 55 DIJKMAN, W. P.; FRAAIJE, M. W. Discovery and characterization of a 5-hydroxymethylfurfural oxidase from Methylovorus sp. strain MP688. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 1082–1090, 2014.