UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

BRUNO ALVES FRANÇA

Produção de LPMOs recombinantes do fungo *Thermothelomyces thermophila* M77 e seu efeito na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Lorena
2018

BRUNO ALVES FRANÇA

Produção de LPMOs recombinantes do fungo *Thermothelomyces thermophila* M77 e seu efeito na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, para a obtenção de título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, na área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Segato

Versão Corrigida

Lorena
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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

França, Bruno Alves

Produção de LPMOs recombinantes do fungo
Thermothelomyces thermophila M77 e seu efeito na
sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar /
Bruno Alves França; orientador Fernando Segato -
Versão Corrigida. - Lorena, 2018.
91 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Lpmos. 2. Biomassa lignocelulósica. 3. Oxidação
da holocelulose. 4. Expressão heteróloga. 5.
Thermothelomyces thermophila. I. Título. II. Segato,
Fernando, orient.

Dedico este trabalho para aqueles que são meu porto seguro, em todas as circunstâncias: meu Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço o meu Senhor Deus por ser a Fonte genuína de minha força, ânimo, esperança e paz, em todo tempo. Que minhas conquistas pretéritas e o porvir sejam para a honra e glória do Teu nome!

Minha gratidão também é destinada à minha amada família. Pai, mãe e irmã, muito obrigado por todo o apoio e amor, nos bons e maus momentos. É inestimável tudo aquilo que vocês proporcionam a mim, em todos os momentos da minha vida!

Não poderia esquecer do meu orientador, Prof. Dr. Fernando Segato. Muito obrigado por todos os ensinamentos e apoio, durante a realização dos experimentos que compõem o presente trabalho. Certamente, você tornou enriquecedora a excitante, porém por vezes exaustiva, convivência com a Biologia Molecular.

Meus queridos colegas, Gislene Ferreira, Bianca Oliva, Awana Lima, Aline Gonçalves, Fernando Satoshi e Josman Velasco, minha vivência acadêmica não seria a mesma sem vocês! Agradeço pelas palavras de apoio e pronto auxílio, nos períodos de dificuldades. Aprendi bastante com as descobertas, experiências e aprendizados de cada um. Com nossas diferenças e semelhanças, conseguimos formar uma boa equipe!

Finalmente, saliento que muitas outras pessoas fizeram parte desta história. Técnicos, professores e colaboradores que, com palavras de apoio ou ações efetivas, foram verdadeiras bênçãos. Dentre estes indivíduos, são dignos de menção o Prof. Dr. Igor Polikarpov, Dr. Marco Kadowaki e Evandro Mulinari, do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), em virtude da ajuda concedida ao longo dos trabalhos com as LPMOs.

“O importante é isso: estar pronto para, a qualquer momento, sacrificar o que somos pelo que poderíamos vir a ser.”

Charles du Bois

RESUMO

FRANÇA, B. A. **Produção de LPMOs recombinantes do fungo *Thermothelomyces thermophila* M77 e seu efeito na sacarificação enzimática do bagaço de cana**. 2018. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

A biomassa lignocelulósica é uma fonte abundante de açúcares simples passíveis de serem fermentados em uma variedade de bioprodutos de maior valor agregado, além do etanol de segunda geração. Tal diversidade é relevante ao desenvolvimento e aprimoramento do conceito de biorrefinarias e da bioeconomia, em um viés mais amplo. Todavia, a elevada recalcitrância dos lignocelulósicos dificulta a sua sacarificação enzimática, resultando em bioprocessos mais onerosos. Por isso, coquetéis com diferentes enzimas ativas em carboidrato (CAZymes) são desenvolvidos, em busca de uma maior eficiência e melhor relação custo/benefício, para processos em larga escala. Dentre as CAZymes estudadas, encontram-se as mono-oxigenases líticas de polissacarídeo (LPMOs), tendo em vista a sua atestada capacidade de otimizar a hidrólise da lignocelulose, quando em sinergismo com diversas hidrolases. Levando isto em conta, selecionou-se, ao atual estudo, o ascomiceto termofílico *Thermothelomyces thermophila* (anteriormente denominado *Myceliophthora thermophila*), pois este tem se mostrado capaz de expressar e secretar ampla gama de LPMOs ativas em diferentes substratos. Objetivando-se estudar duas LPMOs derivadas deste organismo, as mesmas foram expressas, heterologicamente, por *Aspergillus nidulans* linhagem A773, utilizando-se o vetor de expressão *pEXPYR* construído para viabilizar a secreção de altas concentrações de proteínas recombinantes. As proteínas heterólogas aqui analisadas foram denominadas TtLPMO1A9 e TtLPMO2A9. Embora ambas tenham sido capazes de gerar peróxido de hidrogênio na presença de oxigênio molecular e de um doador de elétrons, apenas TtLPMO2A9 apresentou atividade contra substratos celulósicos e bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente, atuando, em associação com hidrolases *homemade* e o preparo enzimático comercial *Celluclast* 1.5L, a degradação de tais materiais.

Palavras-chave: LPMOs. Biomassa lignocelulósica. Oxidação da holocelulose. Expressão heteróloga. *Thermothelomyces thermophila*

ABSTRACT

FRANÇA, B. A. **Production of recombinant LPMOs from the fungus *Thermothelomyces thermophila* M77 and their effect over the enzymatic saccharification of sugar cane bagasse.** 2018. 91 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

The lignocellulosic biomass is an abundant source of simple sugars that can be fermented to various value-added bio-based products. This diversity is seen as relevant to the improvement of biorefinery and bioeconomy concept. Nevertheless, the significant recalcitrance of lignocellulose imposes difficulties to its enzymatic saccharification, resulting in onerous bioprocessing. This scenario stimulates studies based on the development of efficient and cost-effective customizable carbohydrate-active enzyme (CAZymes) cocktails for large-scale processes. Among the available CAZymes, there are the lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs), a set of oxidative proteins capable of optimizing the lignocellulose hydrolysis, when acting in synergism with various hydrolases. Based on this fact, in the current study, the thermophilic ascomycete *Thermothelomyces thermophila* (previously known as *Myceliophthora thermophila*) was adopted, because of its ability of expressing and secreting large amounts of LPMOs. Thus, two LPMOs derived from this fungus was heterologously produced by an expression system composed by *Aspergillus nidulans* strain A773 and the vector *pEXPYR*: an expression vector built to increase the secretion of recombinant proteins. The heterologous proteins herein analysed were termed as *Tt*LPMO1A9 and *Tt*LPMO2A9. Although both enzymes were able to produce hydrogen peroxide in the presence of molecular oxygen and an electron donor, only the second one was active in reactions with cellulosic substrates and hydrothermally pre-treated sugar cane bagasse. When tailor-made hydrolases and the commercial enzymatic mixture Celluclast 1.5L were supplemented with *Tt*LPMO2A9, it was noticed an improvement of the deconstruction of the aforementioned substrates.

Keywords: LPMOs. Lignocellulosic biomass. Holocellulose oxidation. Heterologous expression. *Thermothelomyces thermophila*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do conceito de biorrefinaria.	20
Figura 2 – Ilustração da matriz lignocelulósica recalcitrante presente na parede celular vegetal.....	21
Figura 3 – Hidrólise enzimática de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 presentes na celulose.....	22
Figura 4 – Hidrólise enzimática da GAX resultante do sinergismo entre GHs e CEs.....	23
Figura 5 – Esquema genérico do sítio ativo de uma LPMO fúngica da família AA9.....	26
Figura 6 – Ilustração de uma LPMO de <i>T. thermophila</i> (PDB: 5UFV).....	27
Figura 7 – Oxidação de ligações glicosídicas por LPMOs.....	28
Figura 8 – Clivagem oxidativa de ligações glicosídicas β -1,4 presentes em celulose.....	30
Figura 9 – Resultado de ensaios com carboximetilcelulose (CMC) e extrato bruto obtido de <i>T. thermophila</i> cultivado na presença de bagaço de cana.....	32
Figura 10 – Vetor <i>pEXPYR</i> otimizado para elevadas expressão e secreção proteicas....	34
Figura 11 – Ilustração esquemática de processo reacional envolvendo LPMO e <i>Amplex red</i>	48
Figura 12 – Árvore filogenética <i>Neighbor-Joining</i> com diferentes LPMOs construída no software <i>Geneious</i> R11.....	56
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) com os genes <i>TtLpmo1A9</i> e <i>TtLpmo2A9</i> amplificados e purificados.....	58
Figura 14 – Resultado de PCR realizado em gel de agarose 1% (m/v) com o DNA plasmidial extraído de diferentes colônias bacterianas crescidas em meio sólido com ampicilina.....	59
Figura 15 – <i>Screening</i> (SDS-PAGE 15%) para a verificação de indícios da expressão e secreção das proteínas heterólogas <i>TtLPMO1A9</i> (A) e <i>TtLPMO2A9</i> (B).....	60

Figura 16 – LC-MS/MS realizado com material extraído após tratamento com tripsina de duas bandas presentes no perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%) do transformante T2 para expressão de <i>TtLPMO2A9</i>	61
Figura 17 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) com frações obtidas a partir da primeira etapa de purificação de <i>TtLPMO1A9</i> (A) e <i>TtLPMO2A9</i> (B), por cromatografia de troca iônica com resina <i>DEAE-Sepharose</i> (GE Life Science).....	63
Figura 18 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) com frações obtidas a partir de purificação de <i>TtLPMO1A9</i> (A) e <i>TtLPMO2A9</i> (B), por cromatografia de exclusão por tamanho com coluna preparativa <i>HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR</i> (GE Life Science).....	64
Figura 19 – Resultado das análises das sequências de aminoácidos das proteínas <i>TtLPMO1A9</i> (A) e <i>TtLPMO2A9</i> (B), mostrando a predição de sítios de N-glicosilações destacados em vermelho.....	65
Figura 20 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) realizado após tratamento de <i>TtLPMO1A9</i> e <i>TtLPMO2A9</i> com a endoglicosidase Endo H.....	66
Figura 21 – Detecção de atividade de LPMOs com <i>Amplex Red</i> . As amostras estão em triplicata experimental (1, 2 e 3). A: controle (ausência de mono-oxigenase); B: meio reacional com LPMO ativa.....	67
Figura 22 – Determinação do pH ótimo de <i>TtLPMO1A9</i> e <i>TtLPMO2A9</i>	68
Figura 23 – Determinação da fração desenovelada de <i>TtLPMO1A9</i> (A) e <i>TtLPMO2A9</i> (B), além da T_m de cada uma destas, por dicroísmo circular.....	69
Figura 24 – Resultados do experimento com <i>ThermoFluor</i> realizados com <i>TtLPMO1A9</i> , em diferentes condições de pH. As soluções tamponantes no interior do retângulo vermelho contêm 300mM de cloreto de sódio.....	70
Figura 25 – Análise por HPAEC dos produtos gerados por <i>TtLPMO2A9</i> , após 16 horas de incubação na presença de PASC (gráfico vermelho).....	72
Figura 26 - Análise por HPAEC dos produtos gerados por <i>TtLPMO2A9</i> , no período de 16 horas, em reação com PASC e diferentes agentes redutores: ácido gálico (GA), ácido ascórbico (AA) e pirogallol (PIRO).....	73
Figura 27 – Resultados obtidos após reações de decomposição enzimática dos substratos PASC e Avicel sob o efeito colaborativo entre <i>TtLPMO2A9</i> (2,5μM) e <i>GtGH45</i> (5μM).....	75
Figura 28 – 36 horas de hidrólise enzimática de bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado hidrotermicamente, em amostras com <i>TtLPMO2A9</i> e <i>Celluclast 1.5L</i>	77
Figura 29 – Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente (20 minutos) através da ação cooperativa entre <i>TtLPMO2A9</i> , <i>Celluclast 1.5L</i> e <i>AtGH10</i> (endoxilanase).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados obtidos no CAZy referentes às famílias AA9, AA10, AA11, AA13, AA14 e AA15.....	25
Tabela 2 – Pares de iniciadores (<i>primers</i>) desenhados e sintetizados para <i>Tt</i> lpmo1A9 e <i>Tt</i> lpmo2A9.....	38
Tabela 3 – Parâmetros definidos para a reação de amplificação (PCR) dos genes <i>Tt</i> lpmo1A9 e <i>Tt</i> lpmo2A9.....	39
Tabela 4 – <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do vetor <i>pEXPYR</i>	40
Tabela 5 – Parâmetros definidos para a amplificação (PCR) do vetor <i>pEXPYR</i>	40
Tabela 6 – Parâmetros do PCR de colônia para a verificação da presença de <i>Tt</i> lpmo1A9 e <i>Tt</i> lpmo2A9 no vetor de expressão <i>pEXPYR</i>	42
Tabela 7 – Composição de ensaios com <i>Amplex Red</i>	48
Tabela 8 – Composição das amostras para análise por HPAEC (<i>Dionex</i>).....	48
Tabela 9 - Composição das reações de decomposição enzimática de PASC e Avicel com <i>Tt</i> LPMO2A9 e <i>Gt</i> GH45.....	53
Tabela 10 - Composição das reações de hidrólise de bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado por explosão a vapor com <i>Tt</i> LPMO2A9 e <i>Celluclast</i> 1.5 L.....	54
Tabela 11 – Parâmetros de <i>Tt</i> LPMO1A9 e <i>Tt</i> LPMO2A9 calculados pelo servidor <i>ProtParam</i>	55
Tabela 12 – Composições médias dos principais constituintes do bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado hidrotermicamente, por 20 minutos.....	77

LISTA DE ABREVIACÕES

- AA** – Atividades auxiliares (*Auxiliary activities*)
- BGL** – β -glicosidase
- BLAST** – *Basic Local Alignment Search Tool*
- CAZy** – *Carbohydrate-Active Enzymes Database*
- CAZymes** – Enzimas ativas em carboidrato (*Carbohydrate-active enzymes*)
- CBH** – Celobiohidrolase
- CDH** – Celobiose desidrogenase
- CE** – Carboidrato esterase
- CMC** - Carboximetilcelulose
- dNTP** – Deoxi ribonucleotídeo trifosfato
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DNAg** – DNA genômico
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNS** – Ácido dinitrossalicílico
- EG** – Endoglucanase
- EC** – *Enzyme commission*
- GH** – Glicosil hidrolase
- GT** – Glicosil transferase
- HPAEC** – Cromatografia de troca aniônica de alta performance
- JGI** – *Joint Genome Institute*
- LC-MS/MS** – Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
- LWH** – pré-tratamento hidrotérmico (*liquid hot water*)
- LPMO** – Mono-oxigenases líticas de polissacarídeo
- PASC** – *Phosphoric acid swollen cellulose*
- Pb** – pares de base
- PCR** – *Polymerase chain reaction*
- SDS-PAGE** – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*
- DTT** – Ditiotreitól
- PL** – Polissacarídeo liase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Resíduos lignocelulósicos e sua composição	19
2.2	CAZymes e decomposição de materiais lignocelulósicos	21
2.2.1	Aspectos gerais e modelo clássico de despolimerização da holocelulose	21
2.2.2	Mecanismos oxidativos envolvidos na sacarificação da lignocelulose	23
2.3	LPMOs e a degradação de lignocelulósicos.....	24
2.3.1	Regiosseletividade de LPMOs	27
2.3.2	Doadores de elétrons e atividade das mono-oxigenases	29
2.3.3	Sinergismo entre LPMOs e GHs	29
2.4	Fungo filamentoso <i>Thermothelomyces thermophila</i> e síntese de CAZymes.....	31
2.5	Síntese de CAZymes em sistemas de expressão heteróloga	33
2.6	Considerações finais.....	34
3	OBJETIVOS.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Linhagens fúngicas utilizadas	36
4.2	Seleção de genes de LPMOs de <i>T. thermophila</i> M77 para expressão heteróloga.....	36
4.3	Análise das sequências de nucleotídeos das enzimas TtLPMO1A9 e TtLPMO2A9 por ferramentas de Bioinformática.....	36
4.4	Extração do DNA genômico (DNAg) de <i>T. thermophila</i> M77	37
4.5	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) dos genes selecionados.....	37
4.6	Amplificação dos genes TtLpmo1A9 e TtLpmo2A9	38
4.7	Inserção dos genes exógenos TtLpmo1A9 e TtLpmo2A9 no vetor <i>pEXPYR</i> , pelo método de <i>Gibson Assembly</i>	39
4.8	Preparo das células competentes de <i>Escherichia coli</i> Turbo	41
4.9	Transformação de <i>E. coli</i> quimiocompetente por choque térmico	41
4.10	PCR de colônia para a confirmação da etapa de clonagem	42
4.11	Extração do DNA recombinante.....	43
4.12	Obtenção de protoplastos de <i>A. nidulans</i> A773	43
4.13	Transformação química em <i>A. nidulans</i> A773.....	44
4.14	Realização de <i>screening</i> e seleção de transformantes	44
4.15	Espectrometria de massas (LC-MS/MS) para a confirmação da identidade de TtLPMO2A9	45
4.16	Processo de purificação das proteínas heterólogas	45
4.17	Remoção de N-glicosilações por tratamento com endoglicosidase (<i>Endo H</i>).....	46
4.18	Determinação das concentrações de TtLPMO1A9 e TtLPMO2A9	47
4.19	Ensaio com as LPMOs heterólogas e <i>Amplex Red</i>	47

4.20	Espectroscopia de dicroísmo circular para avaliação da estabilidade térmica de <i>TtLPMO1A9</i> e <i>TtLPMO2A9</i>	49
4.21	Segundo estudo de estabilidade térmica de <i>TtLPMO1A9</i> por escaneamento diferencial de fluorimetria (<i>ThermoFluor</i>).....	50
4.22	Estudo qualitativo das atividades de <i>TtLPMO1A9</i> e <i>TtLPMO2A9</i> por HPAEC (<i>Dionex</i>)	50
4.23	Análise do efeito colaborativo entre <i>TtLPMO2A9</i> e outras <i>CAZymes</i>	52
4.23.1	Ensaio com <i>TtLPMO2A9</i> e uma endoglucanase recombinante da família GH45 proveniente do basidiomiceto <i>Gloeophyllum trabeum</i> (<i>GtGH45</i>).....	52
4.23.2	Ensaio com <i>TtLPMO2A9</i> e Celluclast 1,5L em bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado hidrotermicamente (LHW, <i>liquid hot water</i> , em inglês).	53
5	RESULTADOS	55
5.1	Considerações iniciais.....	55
5.2	Considerações sobre as enzimas <i>TtLPMO1A9</i> e <i>TtLPMO2A9</i> com base em ferramentas da Bioinformática.....	55
5.3	Clonagem e expressão heteróloga.....	57
5.3.1	Amplificação das sequências gênicas das enzimas <i>TtLPMO1A9</i> (<i>TtLpmo1A9</i>) e <i>TtLPMO2A9</i> (<i>TtLpmo2A9</i>) e obtenção de DNA recombinante por método de <i>Gibson Assembly</i>	57
5.3.2	Transformação bacteriana e PCR de colônia.....	59
5.3.3	Transformação da linhagem mutante <i>Aspergillus nidulans</i> A773 e <i>screening</i> dos transformantes fúngicos obtidos	60
5.3.4	Confirmação da expressão da enzima heteróloga <i>TtLPMO2A9</i> por espectrometria de massas (LC-MS/MS).....	61
5.4	Purificação das amostras de <i>TtLPMO1A9</i> e <i>TtLPMO2A9</i> por intermédio de métodos cromatográficos.....	62
5.5	Análise de N-glicosilações presentes em <i>TtLPMO1A9</i> e <i>TtLPMO2A9</i> recombinantes	64
5.6	Determinação de pH ótimo das mono-oxigenases <i>TtLPMO1A9</i> e <i>TtLPMO2A9</i> em reações com <i>Amplex Red</i>	66
5.7	Dicroísmo circular: estudo da estabilidade térmica das proteínas recombinantes.....	69
5.7	Ensaio com as enzimas <i>TtLPMO1A9</i> e <i>TtLPMO2A9</i> e substratos polissacarídicos.....	71
5.7.1	Análise qualitativa por HPAEC (<i>Dionex</i>) dos produtos gerados em ensaios com as LPMOs heterólogas <i>TtLPMO1A9</i> e <i>TtLPMO2A9</i> , na presença de substratos polissacarídicos.....	71
5.7.2	Efeito colaborativo entre a enzima <i>TtLPMO2A9</i> e uma endoglucanase da família GH45 de <i>Gloeophyllum trabeum</i> , na degradação de Avicel e PASC	74
5.7.3	Avaliação da hidrólise do bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado hidrotermicamente com <i>TtLPMO2A9</i> e preparo enzimático comercial <i>Celluclast</i> 1.5L.....	76
6	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO.....	90

1 INTRODUÇÃO

O investimento em tecnologias voltadas para a utilização de matérias-primas renováveis tem sido realizado por diversos anos, como uma forma de reduzir a dependência das sociedades contemporâneas por recursos fósseis. Dada a relevância disto, pode-se verificar até mesmo a participação de governos, através da criação de políticas públicas. No Brasil, cita-se o Programa Nacional do Alcool (ProAlcool) (HALL et al., 2009), criado na década de 1970, que estimulou a produção de bioetanol, a partir do caldo extraído da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

Contudo, o uso de culturas agrícolas, em especial para a síntese de biocombustíveis de primeira geração (1G), gera intensos impasses, uma vez que isto impacta, negativamente, os preços de *commodities* alimentícias, segundo relatórios da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico e da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (VALDIVIA et al., 2016). Deste modo, estudos vem sendo feitos, com o intuito de viabilizar a utilização de resíduos agrícolas, como o bagaço de cana-de-açúcar gerado pela indústria sucroalcooleira nacional, em bioprocessos, pois, além de serem abundantes e acessíveis, os mesmos não são destinados ao consumo humano. Tal biomassa residual é denominada matéria-prima de segunda geração (2G), ou lignocelulósica (CARDONA ALZATE; SOLARTE TORO; PEÑA, 2018).

A lignocelulose é fonte natural de açúcares simples, para processos fermentativos que resultam na síntese de variados produtos (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). O melhor aproveitamento de tais monossacarídeos fermentescíveis se dá através da sacarificação enzimática dos biopolímeros constituintes da parede celular vegetal, em especial de hemicelulose e celulose.

No processo clássico de despolimerização da lignocelulose, consideravam-se, principalmente, as atividades das enzimas envolvidas na hidrólise de ligações glicosídicas presentes nas cadeias celulósicas e hemicelulósicas, resultando na liberação de moléculas de glicose, assim como de outras pentoses e hexoses. Todavia, há décadas, observou-se que microrganismos não-celulolíticos também eram capazes de decompor a celulose (REESE; SIU; LEVINSON, 1950), indicando, mesmo sem uma explicação definitiva, que houvesse algo envolvido na decomposição da biomassa lignocelulósica, além do mecanismo hidrolítico.

Atualmente, sabe-se da existência de enzimas oxidativas, ou oxidases, que participam do referido processo. Dentre aquelas que são amplamente estudadas, encontram-se as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs, *lytic polysaccharide monooxygenases*, em inglês). Estas metaloenzimas apresentam um íon cobre (II) em seu sítio-ativo, e na presença de um agente redutor e de oxigênio molecular (O₂) são capazes de oxidar ligações glicosídicas presentes na holocelulose (JOHANSEN, 2016; O'DELL; AGARWAL; MEILLEUR, 2017). Embora este processo não resulte na liberação de açúcares simples, a oxidação de moléculas polissacarídicas, em especial das regiões cristalinas presentes nas microfibrilas de celulose, otimiza a ação das hidrolases e, conseqüentemente, acarretam em uma sacarificação mais eficiente. Inúmeros trabalhos publicados na literatura científica demonstram o sinergismo ou efeito colaborativo entre LPMOs e celulasas (EIBINGER et al., 2014; MÜLLER et al., 2015) e hemicelulasas (HU et al., 2018; SANHUEZA et al., 2018).

Dentre microrganismos capazes de produzir LPMOs, encontra-se o ascomiceto termofílico *Thermothelomyces thermophila*. Este fungo possui, em seu genoma, 23 sequências gênicas codificantes de mono-oxigenases líticas (BERKA et al., 2011), sendo capaz de secretar uma ampla gama destes biocatalisadores, na presença de diferentes fontes de carbono, como palhas de cevada e de alfafa (BERKA et al., 2011), além de bagaço de cana (SANTOS et al., 2016).

Em função das considerações feitas, realizou-se, no presente estudo, a produção de duas LPMOs de *T. thermophila* por sistema de expressão heteróloga composto pela linhagem mutante de *Aspergillus nidulans* A773 e o vetor de expressão *pEXPYR* (SEGATO et al., 2012), tendo por meta a análise de algumas propriedades destas oxidases e de eventual efeito colaborativo entre as mesmas e algumas enzimas hidrolíticas, na despolimerização de compostos polissacarídicos complexos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resíduos lignocelulósicos e sua composição

A biomassa lignocelulósica é constituída, majoritariamente, por três biopolímeros: lignina, hemicelulose e celulose.

A lignina é um polímero fenólico proveniente do acoplamento químico de radicais livres formados por três precursores monolignóis, a saber: álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumárico (VANHOLME et al., 2010). Em virtude da polimerização aleatória destes radicais, a macromolécula em questão apresenta estruturas tridimensionais complexas, ramificadas e amorfas com diversos tipos de ligação química C-O: β -O-4, α -O-4, α -O-5; e C-C: β -5, 5-5, β -1, e β - β (KOCH, 2006).

A hemicelulose é um polissacarídeo que pode ser composto por resíduos de pentoses (xilose e arabinose) e de hexoses (glicose, manose e galactose), além de resquícios de ramnose, fucose e ácidos urônicos (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008). Por conta desta diversidade, compostos hemicelulósicos podem ser encontrados na natureza como xilanas, mananas, β -glucanas com ligações mistas ou xiloglucanas (SAHA, 2003). Em muitos resíduos agrícolas, como o bagaço de cana e outras monocotiledôneas comelinóides, há o predomínio da glucuronoarabinoxilana (GAX), uma variante da xilana composta por cadeia principal de xilose e ramificações de arabinose e ácido glucurônico (DODD; CANN, 2009).

A celulose, homopolímero linear cujas unidades monoméricas são resíduos de glicose, é o principal componente da biomassa vegetal. Suas cadeias se agregam, através de interações intermoleculares, formando microfibrilas que resultam em material insolúvel com regiões cristalinas e amorfas (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009).

A relevância industrial dos lignocelulósicos está relacionada com sua constituição. A holocelulose, porção polissacarídica que envolve hemicelulose e celulose, é fonte natural de monossacarídeos simples que podem ser utilizados em ampla variedade de bioprocessos, em especial quando se considera o contexto de biorrefinarias (Figura 1). Estas são classificadas como sistemas complexos de plantas industriais que integram processos químicos, bioquímicos, termoquímicos e microbiológicos, para o uso pleno da biomassa vegetal, resultando em uma

variedade de bioprodutos, desde biocombustíveis 2G até compostos da Química Fina, assim como promove um maior aproveitamento energético e menor geração de efluentes (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

Figura 1 – Ilustração do conceito de biorrefinaria.

Fonte: Adaptado de Carvalho, Duarte e Gírio, 2008.

No entanto, para que haja o melhor processamento da biomassa vegetal, no cenário apresentado, sua sacarificação, ou conversão, enzimática é o procedimento ideal, para que se mantenha a integridade estrutural dos açúcares fermentescíveis oriundos da quebra das ligações químicas presentes na celulose e hemicelulose. Porém, estas macromoléculas se encontram em uma matriz de lignocelulose, na parede celular vegetal, que confere proteção às plantas contra a ação de enzimas e microrganismos fitopatogênicos (Figura 2). Consequentemente, resíduos vegetais se tornam recalcitrantes, característica esta que dificulta a ação de biocatalisadores. Por isso, pesquisas vem sendo constantemente realizadas, a fim de que sejam desenvolvidos coquetéis enzimáticos capazes de atenuar esta dificuldade e de tornar a degradação de lignocelulósicos mais eficiente. Para isto, analisam-se as enzimas ativas em carboidratos, ou *CAZymes*, sintetizadas por organismos saprófitos.

Figura 2 – Ilustração da matriz lignocelulósica recalcitrante presente na parede celular vegetal.

Fonte: Adaptado de Brandt et al. (2013).

2.2 CAZymes e decomposição de materiais lignocelulósicos

2.2.1 Aspectos gerais e modelo clássico de despolimerização da holocelulose

Diversas enzimas ativas em carboidratos são conhecidas e classificadas, estando disponíveis em bancos de dados. Dentre estes, um dos mais proeminentes é o CAZy (www.cazy.org), sigla para *Carbohydrate Active Enzyme Database* (CANTAREL et al., 2009; LOMBARD et al., 2014). Tais proteínas são agrupadas, de acordo com a similaridade de suas sequências de aminoácidos e seus mecanismos de ação, como glicosil hidrolases (GHs), carboidrato esterases (CEs), glicosil transferases (GTs), polissacarídeo liases (PLs) e atividades auxiliares (AAs). Atualmente, estas classes se encontram divididas em 153, 105, 28, 16 e 15 famílias, respectivamente, além da presença de subfamílias em algumas destas.

Por décadas, a atuação das glicosil hidrolases foi a mais compreendida e descrita, compondo o modelo clássico de despolimerização da holocelulose. Tal modelo consiste na hidrólise das ligações glicosídicas presentes em polissacarídeos. No caso da celulose, tem-se as GHs denominadas celulasas, classificadas em três grupos: endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases I e II (EC 3.2.1.176 e EC 3.2.1.91, respectivamente) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), conforme ilustração presente na Figura 3.

Figura 3 – Hidrólise enzimática de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 presentes na celulose.

Fonte: Adaptado de Yang et al., 2009.

As endoglucanases (EGLs) hidrolisam, de forma aleatória, as ligações glicosídicas mais internas, preferencialmente ao longo da porção amorfa da celulose, podendo ser processivas ou não. Já as exoglucanases (CBHs) clivam ligações da cadeia a partir de sua extremidade redutora (CBH I) e não redutora (CBH II), liberando assim celobiose. Por fim, as β -glicosidases decompõem a celobiose ou outros celo-oligossacarídeos gerados pelos dois tipos de celulases anteriores (EGLs e CBHs), gerando moléculas de glicose (SHARADA et al., 2014).

Como a hemicelulose engloba um grupo de heteropolímeros, as hemicelulases compõem um sistema enzimático diversificado que atua em porções lineares e ramificadas, sendo capazes de clivar ligações glicosídicas entre resíduos de açúcares e aquelas do tipo éster presentes em grupos pendentes (JUTURU ; WU, 2012). O amplo conjunto de enzimas hemicelulolíticas engloba as GHs endoxilanases (EC 3.2.1.8), β -mananases (EC 3.2.1.25/78), α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55), α -L-arabinanases (EC 3.2.1.99), α -D-glucuronidas (EC 3.2.1.131) e β -xilosidas (EC 3.2.1.37) (SHALLOM; SHOHAM, 2003). Também há CEs, como as acetil xilano esterases (EC 3.1.1.72) e as feruloil esterases (EC 3.1.1.73).

Tendo em vista que a glucuronoarabinoxilana (GAX) é comum em bagaço de cana-de-açúcar, resíduo vegetal abundante no Brasil, demonstra-se, na Figura 4, a atuação conjunta de hemicelulases sobre o composto em questão.

Figura 4 – Hidrólise enzimática da GAX resultante do sinergismo entre GHs e CEs.

Fonte: Adaptado de Shalom e Shoham, 2003.

De maneira geral, o mecanismo de ação de celulasas e hemicelulasas pode ser descrito da seguinte forma: dois resíduos de aminoácidos presentes em seu sítio-ativo, um que funciona como doador de prótons e outro como nucleófilo, facilitam a clivagem enzimática das ligações glicosídicas por modificação estereoquímica (retenção ou inversão) da configuração do carbono anomérico dos resíduos de monossacarídeos (GARVEY et al., 2013).

2.2.2 Mecanismos oxidativos envolvidos na sacarificação da lignocelulose

Em trabalho publicado no início da década de 1950, Reese et al. (1950) já haviam concluído que certos microrganismos não celulolíticos, quando cultivados na presença de carboximetilcelulose (CMC), podiam clivar ligações glicosídicas. Embora não se tenha desenvolvido, na época, uma explicação contundente à esta observação, estudos contemporâneos demonstraram que outras enzimas ativas em carboidratos, além daquelas que detêm mecanismo hidrolítico, participam da decomposição da biomassa vegetal. Tais proteínas fazem parte de uma classe denominada atividades auxiliares (AA) do CAZy: um amplo conjunto de módulos catalíticos envolvidos na degradação da parede celular vegetal (LEVASSEUR et al., 2013).

Pode-se considerar os processos em torno da degradação da lignina, por exemplo. Estes são coordenados por oxidases que geram radicais livres no biopolímero citado, promovendo, conseqüentemente e de forma inespecífica, reações de clivagem de suas diferentes ligações. Nas famílias AA1 e AA2,

encontram-se as lignina peroxidases (EC 1.11.1.14) (ECKER; FÜLÖP, 2018); manganês peroxidases (EC 1.11.1.13) (HOFRICHTER, 2002); versátil peroxidases (EC 1.11.1.16) (KNOP et al., 2016) e lacases (EC 1.10.3.2) (MUNK et al., 2015).

Na deslignificação de resíduos vegetais também há a participação de biocatalisadores integrantes da família AA3, como as aril álcool oxidases (EC 1.1.3.7) e as glicose oxidases (EC 1.1.3.4). Estas atuam em sinergismo com lacases e peroxidases.

No que tange à decomposição da porção polissacarídica da parede celular vegetal, destacam-se as famílias AA9, AA10, AA11, AA13, AA14 e AA15, nas quais se encontram diversas *CAZymes* denominadas mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs).

2.3 LPMOs e a degradação de lignocelulósicos

A descoberta e elucidação do mecanismo das LPMOs contribuiu para o aprimoramento da compreensão sobre a sacarificação enzimática da lignocelulose (FROMMHAGEN et al., 2018). Em banco de dados como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), muitas destas enzimas ainda são elencadas como glicosil hidrolases da família 61 (GH61, *glycosil hydrolases family 61*, em inglês), resquício da época em que as mesmas eram consideradas endoglucanases (SALOHEIMO et al., 1997). Todavia, estes biocatalisadores sempre apresentavam atividade hidrolítica desprezível sobre polissacarídeos (DIMAROGONA et al., 2012). Com o passar do tempo, tais proteínas foram consideradas mono-oxigenases líticas, proteínas cuja atividade dependia de um doador de elétrons e oxigênio molecular (O₂) (HORN et al., 2012; PHILLIPS; DE LA PEÑA, 2011). Portanto, em 2013, aquelas foram recatalogadas como “atividades auxiliares”, no CAZy. As GH61 agora integram a família AA9 (LOMBARD et al., 2014) que contém, até o momento, mais de 400 sequências putativas de proteínas fúngicas.

Existem também outras LPMOs que eram conhecidas, inicialmente, como integrantes da família 33 dos módulos de ligação a carboidrato (CBM33, *carbohydrate binding module family 33*, em inglês). Embora estas se ligassem à quitina, um polissacarídeo também encontrado em vegetais, não agiam como quitinases. Um estudo realizado e publicado comprovou que as proteínas que

compunham CBM33 eram enzimas oxidativas, de fato (VAAJE-KOLSTAD, 2010). Por isso, estas passaram a fazer parte da família AA10. Embora, nesta família haja proteínas de diversos microrganismos, cerca de 95% são de bactérias.

Trabalhos contínuos resultaram na descoberta de outras LPMOs, de forma que, atualmente, existem 4 famílias destinadas a estas, além das citadas anteriormente (AA11, AA13, AA14 e AA15). Todavia, como estas famílias são mais recentes, as mesmas dispõem de um número reduzido de biocatalisadores descritos e caracterizados.

Dados referentes às famílias citadas podem ser encontrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados obtidos no CAZy referentes às famílias AA9, AA10, AA11, AA13, AA14 e AA15.

Família	Origem	Sequências putativas	Enzimas caracterizadas
AA9	Fúngica	405	27
AA10	95% bacteriana	3538	21
AA11 ¹	Fúngica	99	1
AA13 ²	Fúngica	18	3
AA14 ³	Fúngica	15	2
AA15 ⁴	Insetos / Virus	253	2

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: ¹Família criada a partir de estudos de Hemsworth et al. (2014).

²Família criada a partir de trabalho de Vu et al. (2014b).

³Família criada a partir de trabalho de Couturier et al. (2018).

⁴Família criada a partir de estudos de Sabbadin et al. (2018)

Como pode ser notado, a maioria das AAs presentes na Tabela 1 englobam mono-oxigenases fúngicas. De fato, genomas de fungos saprófitos são compostos por um elevado número de genes codificantes de LPMOs (LAFOND et al., 2012; RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009; SABINI et al., 2000). Algumas espécies de fungos apresentam em seu genoma, mais de 30 destas sequências gênicas.

Um fato importante e relacionado às LPMOs é a presença de íon metálico em seu sítio catalítico. Segundo algumas abordagens experimentais realizadas (HARRIS et al., 2010; KARKEHABADI et al., 2008; WESTERENG et al., 2011), foi

apontada a existência de manganês, cobre, níquel e magnésio. Contudo, em 2011, técnicas de cristalografia de raios X comprovaram a presença de íon cúprico, exclusivamente (QUINLAN et al., 2011). Análises espectroscópicas e estruturais revelam que o referido íon é coordenado por duas histidinas, estando uma delas na extremidade N-terminal, além de um terminal amino, como mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Esquema genérico do sítio ativo de uma LPMO fúngica da família AA9.

Fonte: Adaptado de Dimarogona, Topakas e Christakopoulos (2013)

Nota: As duas histidinas e o terminal amino compõem a estrutura conhecida como “braço de histidina”.

Estruturas cristalinas de mono-oxigenases ainda revelam que estas possuem um núcleo compacto denominado “ β -sanduíche”, no qual duas folhas β compreendem sete ou oito fitas β . Além disso, há outras regiões denominadas *loops* que podem ter relação com o reconhecimento do substrato (SIMMONS et al., 2017), como mostrado na Figura 6.

Figura 6 – Ilustração de uma LPMO de *T. thermophila* (PDB: 5UFV).

Fonte: Adaptado de Span et al., 2017.

Nota: Região em amarelo contém o núcleo β -sanduíche composto por 8 fitas β ($\beta 1$ - $\beta 8$).
Os diferentes loops existentes estão sinalizados com LC, LS e L2.
O íon Cu^{2+} se encontra na porção inferior da proteína (esfera alaranjada).

Segundo Span et al., (2017), o *loop* longo na porção C-terminal (LC) frequentemente não contém elementos estruturais secundários. LC interage, por exemplo, com a pequena porção LS, via interações hidrofóbicas, contribuindo para a estabilização adicional de todos os *loops* presentes. Já o *loop* L2 é o mais diversificado na família AA9 e varia em comprimento e na presença de estruturas secundárias, como hélices. L2 pode conter alguns aminoácidos aromáticos que provavelmente participam da interação com o substrato e seu reconhecimento.

2.3.1 Regiosseletividade de LPMOs

Genericamente, sabe-se que as LPMOs clivam ligações glicosídicas, por intermédio de um processo oxidativo (VAAJE-KOLSTAD et al., 2017). Apesar do mecanismo exibido por estas enzimas ainda ser incerto, tornou-se convencional a ideia de que o íon cúprico (Cu^{+2}) passa a íon cuproso (Cu^{+}), na presença de um doador de elétrons, o que acarreta a ativação subsequente de intermediário dioxigênio, decorrente da interação entre oxigênio molecular e Cu^{+} (WALTON; DAVIES, 2016). Então, a alternância entre os estados redox Cu^{+2} e Cu^{+} , além da formação do intermediário citado, ao longo do processo reacional, envolve a abstração de um átomo de hidrogênio de um carbono que compõe os anéis de resíduos de açúcares presentes em cadeias polissacarídicas (PHILLIPS et al.,

2011; VAAJE-KOLSTAD et al., 2017). Neste contexto, as LPMOs podem ser classificadas como tipo 1, 2 ou 3, caso oxidem o carbono anomérico (C1), carbono 4 (C4), ou ambos (C1/C4), respectivamente (HEMSWORTH et al., 2015). A ação da LPMO, com base em sua regioseletividade, é ilustrada na Figura 7.

Figura 7 – Oxidação de ligações glicosídicas por LPMOs.

Fonte: Adaptado de Hemsworth et al., 2015.

Nota: A regioseletividade das enzimas é indicada por C1 (tipo 1), C2 (tipo 2) e C1/C4 (tipo 3).

A partir do modelo apresentado, conclui-se que o processo executado por LPMOs pode resultar em diferentes compostos oxidados. O tipo 1 gera oligossacarídeos com lactona em terminação redutora que, posteriormente, é hidratada e convertida a ácido aldônico. Já reações com o tipo 2 resultam em cadeias com cetoadose em extremidade não redutora. Por fim, uma mistura com os produtos anteriores é obtida por intermédio do tipo 3.

Vale ressaltar que, além de produtos oxidados, as LPMOs também podem liberar oligossacarídeos nativos (não oxidados). Isto ocorre quando uma enzima do tipo 1 oxida C1 perto da extremidade redutora da cadeia polissacarídica, ou caso uma mono-oxigenase do tipo 2 oxide C4, nas proximidades de uma extremidade não-redutora. Já as proteínas do tipo 3 são capazes de produzir oligossacarídeos nativos ao clivarem ligações encontradas nas adjacências de ambas as terminações.

2.3.2 Doadores de elétrons e atividade das mono-oxigenases

De acordo com o que foi abordado previamente, sabe-se que o processo oxidativo executado por LPMOs depende de um agente que reduza o íon Cu divalente da metaloenzima ao seu estado monovalente. Trabalhos disponíveis demonstram o uso de diferentes doadores de elétrons, como ácido ascórbico, pirogalol, ácido ferúlico, dentre outras moléculas orgânicas de baixo peso molecular (QUINLAN et al., 2011; VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). Além destas, existem biocatalisadores que podem participar como agentes redutores. Um dos mais conhecidos é a celobiose desidrogenase (CDH), flavoproteína composta por dois domínios catalíticos, heme e FAD, expressa e secretada apenas por alguns fungos. As CDHs catalisam a oxidação de celobiose, celodextrinas longas ou outros oligossacarídeos, resultando na redução do FAD a FADH₂. Então, ocorre uma transferência de elétrons ao domínio heme que, por fim, reduz o cobre presente no sítio ativo da LPMO. Alguns trabalhos confirmam que CDHs e LPMOs podem ser co-expressas (RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009), o que corrobora, ainda mais, a existência de sinergismo entre ambas as enzimas.

As mono-oxigenases secretadas por microrganismos, durante o processo de degradação, podem dispor de outras fontes de elétrons presentes na própria parede celular vegetal, como a lignina (BRENELLI et al., 2018; WESTERENG et al., 2015). Todavia, ainda se sabe pouco acerca da influência que tais fontes exercem sobre a atividade de LPMOs, na natureza.

2.3.3 Sinergismo entre LPMOs e GHs

Além das questões abordadas até aqui, torna-se relevante demonstrar que, de fato, LPMOs otimizam o processo de hidrólise da holocelulose. Quando se considera as microfibrilas de celulose, por exemplo, a completa ausência de água nestas estruturas, assim como as interações intermoleculares existentes, tornam aquelas recalcitrantes. Isto significa que a ação de celulasas fica comprometida por uma menor acessibilidade, ao longo de parte considerável do biopolímero supracitado. Logo, a ação de mono-oxigenases, ao promover a clivagem oxidativa da celulose, permite que as hidrolases consigam ingressar, em porções mais internas da cadeia, otimizando assim a liberação de monossacarídeos simples,

como demonstrado em diversos trabalhos (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2013; MÜLLER et al., 2015). Na Figura 8, encontra-se uma ilustração do sinergismo entre LPMOs e celulases.

Figura 8 – Clivagem oxidativa de ligações glicosídicas β -1,4 presentes em celulose.

Fonte: Adaptado de Horn et al., (2012).

Nota: Triângulos C₁GH61 e C₄GH61: LPMOs.

CBH I – CBM e CBH II – CBM: exoglucanases ou celobiohidrolases.

EG: endo- β -1,4-glucanases.

CDH: flavoenzima que atua como agente redutor de mono-oxigenases.

Além do fator relacionado à acessibilidade, vê-se, com base na Figura 8, que LPMOs produzem novas extremidades ao longo da cadeia polissacarídica sujeitas à ação de exoglucanases (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2013).

Apesar do enfoque, até o presente momento, sobre a despolimerização da celulose, após a descoberta e caracterização de variadas mono-oxigenases, foram descobertas outras ativas em celo-oligossacarídeos solúveis (BEY et al., 2013) e até mesmo em hemicelulose (AGGER et al., 2014; JAGADEESWARAN et al., 2016), de forma que se saiba, atualmente, que a participação daqueles biocatalisadores na degradação da lignocelulose é muito mais ampla do que se acreditava.

Pode-se encontrar preparos enzimáticos comerciais que apresentam em sua formulação LPMOs e GHs, como a *Cellic CTEC2*, da *Novozymes* (MÜLLER et al., 2015), mas o seu uso, muitas das vezes, faz com que os bioprocessos se tornem mais onerosos. Por isso, reitera-se aqui a importância de se estudar microrganismos saprófitos, objetivando-se o desenvolvimento de novos coquetéis com *CAZymes*, de forma a garantir a redução de custos associados à degradação de materiais lignocelulósicos.

2.4 Fungo filamentoso *Thermothelomyces thermophila* e síntese de *CAZymes*

Na natureza, fungos e bactérias são os principais participantes da decomposição de materiais lignocelulósicos. Logo, o melhor entendimento dos mecanismos bioquímicos utilizados por estes organismos saprófitos pode acarretar na seleção de catalisadores mais eficientes para serem utilizados em bioprocessos de larga escala.

Dentre estes microrganismos, os fungos filamentosos despertam grande interesse industrial, uma vez que são capazes de secretar elevados níveis de diversas enzimas ativas em carboidratos. Neste cenário, o ascomiceto *Trichoderma reesei* foi estabelecido como referência, por anos (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009), especialmente no que diz respeito à produção de celulasas. Porém, outros fungos se tornaram relevantes, como os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, além de outros que fazem parte do gênero *Aspergillus* (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009), principalmente após o mapeamento de seus genomas e a consequente descoberta de que estes são constituídos por inúmeros genes codificantes de *CAZymes*.

Condições nas quais matérias-primas lignocelulósicas são processadas também podem influenciar a escolha das enzimas utilizadas em sua desconstrução. Por exemplo, resíduos vegetais são submetidos, muitas vezes, a etapas de pré-tratamento a elevadas temperaturas, acarretando assim na necessidade de posterior arrefecimento do meio, para que se evite impactos negativos sobre o rendimento da sacarificação enzimática (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; SANTOS et al., 2015), principalmente quando se utilizam proteínas de microrganismos mesofílicos. Por isso, fungos com características termofílicas são relevantes, pois estes geralmente produzem uma ampla gama de

proteínas termoestáveis. Uma das opções conhecidas é o fungo ascomiceto *T. thermophila*. Dentre as diversas enzimas ativas em carboidratos secretadas por este organismo, muitas apresentam elevadas atividades entre 50 – 60°C (BERKA et al., 2011). Isto pode ser confirmado com base no gráfico apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Resultado de ensaios com carboximetilcelulose (CMC) e extrato bruto obtido de *T. thermophila* cultivado na presença de bagaço de cana.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: As CAZymes deste fungo apresentaram elevada atividade, em altas temperaturas. O valor máximo de atividade foi atingido a 60°C.

Adicionalmente, segundo Berka et al. (2011), o genoma de *T. thermophila* comporta grande número de genes que codificam enzimas ativas em carboidratos. Esta característica acaba por resultar na síntese de secretoma repleto de diferentes CAZymes, em variadas condições (SANTOS et al., 2016).

Outros trabalhos também mostram a importância de *T. thermophila* na descoberta de novas atividades lignocelulolíticas. Tem-se a produção de aldonolactonase e glucuronil esterase (BEESON IV et al., 2011; TOPAKAS et al., 2010), enzimas que se mostraram efetivas na liquefação de palha agroindustrial (KARNAOURI; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2014) e lacase utilizada na deslignificação de biomassa vegetal (RICO et al., 2014).

2.5 Síntese de CAZymes em sistemas de expressão heteróloga

Mesmo sendo possível alterar os parâmetros experimentais relacionados à produção de CAZymes, como temperatura, pH e agitação dos meios de cultivo, a expressão homóloga de proteínas, por vezes, acarreta em baixas concentrações das mesmas, não atingindo assim os níveis de pureza e rendimento que atendam as demandas de bioprocessos, ou de experimentos científicos de caracterização estrutural e bioquímica (SEGATO et al., 2012). Então, a tecnologia do DNA recombinante (COHEN et al., 1973), através de moléculas transportadoras denominadas vetores, viabiliza a transferência de genes codificantes de biocatalisadores de interesse de um genoma a outro. Desta forma, os organismos receptores, ou hospedeiros, passam a expressar, heterologicamente, sequências gênicas exógenas com seu maquinário enzimático, o que pode resultar em uma síntese de enzimas com melhores rendimentos.

Existem diversos organismos que podem ser utilizados como hospedeiros, desde bactérias como a *Escherichia coli*, até células animais como as CHO (do inglês, *Chinese Hamster Ovary*). Apesar desta elevada disponibilidade e da morfologia mais simples de microrganismos unicelulares, os fungos filamentosos tem sido de grande relevância industrial e acadêmica, por expressarem e secretarem altas concentrações de metabólitos primários e secundários (KÜCK ; HOFF, 2010), além de disporem de mecanismos de modificação pós-transcricionais e pós-traducionais importantes à produção de biocatalisadores de origem eucariótica, reconhecendo e processando íntrons corretamente, assim como regulando a N-glicosilação proteica, a clivagem proteolítica e a formação de pontes dissulfeto (JEENES et al., 1991; LARKIN; IMPERIALI, 2011; ZUBIETA et al., 2018).

Dentre os diversos fungos filamentosos utilizados como eficientes sistemas de expressão heteróloga, há diversas espécies do gênero *Aspergillus*, como o *A. nidulans* A773. Este é considerado um modelo genético promissor, tendo em vista a sua capacidade de expressar diferentes CAZymes recombinantes. Alguns trabalhos publicados demonstram que o fungo supracitado, juntamente com o vetor otimizado *pEXPYR*, ilustrado na Figura 10, foi capaz de produzir, heterologicamente, uma xilosidase e arabinofuranosidase (SEGATO et al., 2012), além de diferentes endoxilanases (DAMÁSIO et al., 2011; SEGATO et al., 2012).

Figura 10 –Vetor *pEXPYR* otimizado para elevadas expressão e secreção proteicas.

Fonte: Adaptado de Segato et al., 2012.

Nota: Presença das sequências do promotor *glaAp* e do peptídeo-sinal *glaAsp* da glucoamilase N-terminal de *Aspergillus niger*.
 Marcadores de seleção *ecAMP* (resistência ao antibiótico ampicilina) e *shZEO* (resistência ao antibiótico zeomicina).
 Terminador triptofano *antrpCt* para indicar o fim da transcrição gênica.
 O gene exógeno de interesse pode ser inserido entre o promotor e o terminador, mantendo-se ou retirando-se o sinal de secreção *glaAsp*.
 A sequência *pyrG* flanqueada por repetições tandem “mate 1” e “mate 2” pode ser excisada (fenótipo *pyrG*⁻) e reciclada, para novas transformações.
 O vetor *pEXPYR* foi construído a partir do plasmídeo *pUC19* de *Escherichia coli*.

2.6 Considerações finais

Dada a importante contribuição ocasionada por LPMOs na hidrólise de lignocelulósicos, pretende-se, com este trabalho, contribuir com o estudo de tais enzimas. Para isto, o microrganismo *T. thermophila* foi selecionado, em decorrência do que foi abordado anteriormente. Conforme FROMMHAGEN et al. (2018), mono-oxigenases de *T. thermophila* são diversas, tanto em termos de regioseletividade, quanto em afinidade por substratos. Por isso, duas LPMOs recombinantes do organismo supracitado, obtidas por sistema de expressão heteróloga composto por *A. nidulans* A773 e vetor *pEXPYR*, serão analisadas nas seções seguintes do presente trabalho.

3 OBJETIVOS

O objetivo central do presente trabalho consiste no estudo de LPMOs derivadas do fungo termofílico *T. thermophila* expressas, heterologicamente, em *A. nidulans* A773. Para isto, as seguintes metas foram estabelecidas:

- 1) Construção do DNA recombinante (vetor de expressão *pEXPYR* contendo os genes exógenos codificantes das LPMOs de interesse) e a consequente realização das etapas de transformação bacteriana e fúngica, seleção dos transformantes para expressão heteróloga;
- 2) Confirmação das atividades das LPMOs recombinantes e a definição de sua regiosseletividade e substrato;
- 3) Suplementação de hidrolases “*homemade*” e preparo enzimático comercial Celluclast 1.5L com as proteínas heterólogas obtidas, para avaliar eventual efeito colaborativo exercido pelas LPMOs, de forma a melhorar a decomposição de substratos celulósicos e, por fim, do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado hidrotermicamente (em inglês, *liquid hot water*, LHW).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens fúngicas utilizadas

Para a seleção dos genes codificantes de LPMOs e obtenção do DNA genômico (DNAg) foi escolhida a linhagem de *T. thermophila* M77 adquirida do *American Type Culture Collection* (ATCC). Já como sistema de expressão heteróloga, foi utilizada a linhagem mutante de *A. nidulans* A773 (*pyrG89*; *wA3*; *pyroA4*).

4.2 Seleção de genes de LPMOs de *T. thermophila* M77 para expressão heteróloga

A partir de uma busca realizada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foram selecionadas duas sequências gênicas que codificam LPMOs do fungo filamentoso *T. thermophila*, ao presente estudo. Para fins de identificação, estes genes foram denominados *TtLpmo1A9* e *TtLpmo2A9* (acessos no *GenBank*: MYCTH_2060403 e MYCTH_92668, respectivamente), sendo as enzimas codificadas por estes genes aqui classificadas como *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9*, respectivamente.

Durante a confecção deste trabalho, a proteína *TtLPMO2A9* teve sua estrutura caracterizada por Span et al. (2017). Contudo, os experimentos aqui realizados podem complementar os dados já publicados na literatura científica.

4.3 Análise das sequências de nucleotídeos das enzimas *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* por ferramentas de Bioinformática

Alinhamentos das sequências de aminoácidos das proteínas *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* com sequências de outras LPMOs disponíveis no *CAZy* foram realizados através do método MUSCLE (EDGAR, 2004), com base em parâmetros pré-definidos pelo programa *Geneious* R11 (<https://www.geneious.com/>).

4.4 Extração do DNA genômico (DNAg) de *T. thermophila* M77

Para a extração do DNAg desejado, a massa micelial de *T. thermophila* foi obtida a partir de cultivo dos esporos em 250mL de meio mínimo líquido em frasco *Erlenmeyer* de 1L, cuja composição foi a seguinte: solução de sais (12% NaNO₃, 1,4% KCl, 1,4% MgSO₄.7H₂O e 3,4% KH₂PO₄); solução de elementos-traços (2,2% MnSO₄.7H₂O, 1,1% H₃BO₃, 0,5% MnCl₂.4H₂O, 0,5% FeSO₄.7H₂O, 0,16% CoCl₂.5H₂O, 0,16% CuSO₄.5H₂O, 0,11%Na₂MoO₄.4H₂O e 5% Na₂EDTA) e 1% (m/v) de D-glicose. A duração do cultivo foi de 48 horas, a 45°C e sob agitação de 200 rpm. Cerca de 50mg do micélio resultante (peso úmido) foram macerados, em almofariz, com o auxílio de pistilo, na presença de nitrogênio líquido. Ao material macerado, foram adicionados 600μL de solução de extração de DNAg (1mL de EDTA 0,5M, 1mL de SDS 10% e 8mL de água destilada), em tubo de 2mL. A mistura resultante foi aquecida a 68°C, durante 10 minutos, e a mesma foi centrifugada a 13000 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e misturado, por inversão, com 40μL de solução 5M de acetato de potássio. O material obtido foi mantido, em banho de gelo, por 10 minutos e, em seguida, este foi centrifugado, a 13000 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi misturado com 1mL de solução de etanol 95% (v/v) e submetido à centrifugação a 13000 x g por 30 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* depositado no fundo do tubo foi mantido. Ao *pellet* foi então adicionado 1mL de solução de etanol 70% (v/v), seguido de centrifugação a 13000 x g por 10 minutos (esta etapa foi realizada 2 vezes). Ao final das lavagens, deixou-se o *pellet* secar à temperatura ambiente, sendo, posteriormente, ressuspendido com 50μL de solução TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0), acrescida de 50 mg/mL de ribonuclease A. Para se confirmar a extração do DNAg de interesse, o produto final da extração foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e a imagem de sua banda foi capturada pelo equipamento *GelDoc EZ Imager* (BioRad).

4.5 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dos genes selecionados

Com base nas sequências obtidas no NCBI, pares de *primers* (*reverse* e *forward*) foram construídos, para a posterior amplificação de toda a fase de leitura

aberta (ORF, *open reading frame*, em inglês) dos genes *Ttlpmo1A9* e *Ttlpmo2A9*. Aos iniciadores desenhados, foram adicionadas sequências de nucleotídeos não codificantes denominadas “caudas” para a realização do método de *Gibson Assembly* a ser descrito no subitem 4.7. Os *primers* foram sintetizados pela empresa *Sigma Life Science* e suas sequências se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 – Pares de iniciadores (*primers*) desenhados e sintetizados para *Ttlpmo1A9* e *Ttlpmo2A9*.

Nome	Sequência
<i>Ttlpmo1A9 fwd*</i>	5' cat tac acc tca gca ATG CCG CCA CCA CGA CTG AGC AC 3'
<i>Ttlpmo1A9 rev*</i>	5' gtc ccg tgc cgg tta CTA CCC GCG AAA GTT CCT TCC GTA CCT CCC 3'
<i>Ttlpmo2A9 fwd*</i>	5' cat tac acc tca gca ATG TAC CGC ACG CTC GGT TCC ATT GCC CTG 3'
<i>Ttlpmo2A9 rev*</i>	5' gtc ccg tgc cgg tta TTA GGC CTG GAA AGC GCG AGC CTT GGC 3'

Fonte: Arquivo próprio.

Nota:*rev e fwd são abreviações de *reverse* e *forward*, respectivamente.
As sequências “caudas” estão em destaque (vermelho).

4.6 Amplificação dos genes *Ttlpmo1A9* e *Ttlpmo2A9*

Com o DNAg (*template*) extraído e os *primers* sintetizados, foi possível iniciar reações em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*, em inglês), para amplificar os genes que codificam as duas LPMOs. A composição da solução utilizada neste processo foi a seguinte: 500ng do DNAg de *T. thermophila*, 2μL da solução de cada *primer* (*reverse* e *forward*) a uma concentração de 100 ng/mL, 4μL de mistura de nucleotídeos dNTPs 2,5 mM, 10μL de solução-tampão (5X) para a enzima *Phusion*[®] (DNA polimerase), 2μL de DMSO, 2μL de MgCl₂ 50mM, 32μL de água ultra pura e 0,5μL (2,5 UI) da enzima *Phusion*[®] *tailor-made*. Os parâmetros configurados para a amplificação gênica estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros definidos para a reação de amplificação (PCR) dos genes *Tlpmo1A9* e *Tlpmo2A9*.

Etapas do PCR (amplificação dos genes de interesse)			
1	98°C	30 seg.	
2	98°C	10 seg.	Etapa 2 25 repetições
	63°C	30 seg.	
	72°C	1 min. e 30 seg.	
3	72°C	5 min.	
4	12°C	Término	

Fonte: Arquivo próprio.

Para verificar se a amplificação dos genes de interesse ocorreu da forma esperada, as amostras resultantes foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e o tamanho das bandas foi confirmado com o auxílio do marcador *GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen)*. Uma vez confirmadas as amplificações, os produtos de PCR foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)*, seguindo as especificações do fabricante.

4.7 Inserção dos genes exógenos *Tlpmo1A9* e *Tlpmo2A9* no vetor *pEXPYR*, pelo método de *Gibson Assembly*

Inicialmente, o vetor de clonagem e expressão *pEXPYR* foi extraído de estoque de bactéria mantido a -80°C, em *ultrafreezer*. Para isto, 10µL deste estoque foram transferidos para meio LB líquido (ANEXO) com antibiótico ampicilina (1 µg/mL), para cultivo e seleção das células bacterianas, por aproximadamente 16 horas, a 37°C e sob agitação de 200 rpm. Finalizado este período, uma alíquota de 4mL deste meio foi retirada e centrifugada a 10000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi tratado com o kit *Wizard Plus SV MiniPreps DNA Purification System (Promega)*, seguindo as especificações do fabricante, o que resultou na extração do vetor *pEXPYR*. Este foi amplificado, utilizando-se os *primers* da Tabela 4.

Tabela 4 – Primers para a amplificação do vetor *pEXPYR*.

Iniciadores	
<i>pEXPYR</i> rev*	5' ctc tgc cta aac ttt aca AAT TCG AGC TCT CCC CTG ACC TTC CGA 3'
<i>pEXPYR</i> fwd*	5' ccg gca cgg gac TTC TAG TGA TTT AAT AGC TCC ATG TCA ACA 3'

Fonte: Arquivo próprio.

Desta vez, os parâmetros de PCR utilizados foram aqueles presentes na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros definidos para a amplificação (PCR) do vetor *pEXPYR*.

Etapas do PCR (amplificação do vetor de expressão)			
1	98°C	30 seg.	
2	98°C	10 seg.	Etapa 2 25 repetições
	63°C	30 seg.	
	72°C	2 min. e 30 seg.	
3	72°C	5 min.	
4	12°C	Término	

Fonte: Arquivo próprio.

Para a inserção dos genes de interesse no vetor, estes foram submetidos ao método de *Gibson Assembly* (GIBSON et al., 2009, 2010) realizado com *Gibson Assembly Master Mix* (New England BioLabs Inc.), de acordo com o protocolo *Gibson Assembly* (New England BioLabs). Nesta etapa, foram adicionados em reações separadas, 4µL de cada gene (*TtIpmo1A9* e *TtIpmo2A9* ($\cong 28$ ng/µL)), 2µL do vetor *pEXPYR* linearizado ($\cong 25$ ng/µL) e 5µL do referido *master mix* (2X).

4.8 Preparo das células competentes de *Escherichia coli* Turbo

Células da cepa de *E. coli* Turbo cedida pelo Prof. Dr. Rolf Prade (*Oklahoma State University*, OK/EUA) foram inoculadas em 5mL de meio LB (ANEXO). O inóculo foi mantido sob agitação a 200 rpm, a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Após este período, diluiu-se o mesmo em 50mL de meio LB novo presente em frasco *Erlenmeyer* de 200mL, o qual foi incubado a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Periodicamente, a absorbância (A_{600nm}) da amostra diluída foi medida, até que OD_{600nm} (A_{600nm} amostra – A_{600nm} meio LB isento de *E. coli* Turbo) estivesse compreendida entre 0,2 e 0,5, para que se alcançasse uma concentração celular satisfatória.

Em seguida, o meio de cultivo foi dividido entre dois tubos *Falcon* de 50mL, os quais foram incubados em gelo, por 10 minutos. Finalizado este tempo, centrifugou-se as culturas a 4000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Descartaram-se os sobrenadantes e os *pellets* formados foram ressuspensos em 2,5mL de solução-tampão TSS (ANEXO). Após a completa ressuspensão, prepararam-se alíquotas de 100 μ L com as células competentes obtidas, em tubos de micro-centrífuga de 1,5mL, conservados a -80°C até o seu uso.

4.9 Transformação de *E. coli* quimiocompetente por choque térmico

Para que as células competentes produzidas pudessem assimilar os genes das LPMOs clonados no vetor de interesse, ou o DNA recombinante, uma alíquota de 100 μ L do estoque de *E. coli* Turbo competente foi descongelada, em banho de gelo, e nesta foram adicionados o produto (gene + vetor), oriundo do método de *Gibson Assembly* (subitem 4.7). A mistura foi mantida em gelo, por 30 minutos e transcorrido este tempo, a amostra foi submetida a um choque térmico, em banho-maria, a 42°C, por 45 segundos. Posteriormente, as células foram novamente transferidas ao gelo, e lá permaneceram por mais 5 minutos.

Em seguida, foi adicionado às células bacterianas 1mL de meio SOC (ANEXO) e esta mistura foi incubada a 37°C, sob agitação de 200 rpm, por 90 minutos, sendo a cultura resultante centrifugada, a 10000 x g e temperatura ambiente, por 5 minutos. Descartou-se grande parte do sobrenadante, mantendo-se apenas cerca de 100 μ L para a ressuspensão dos sólidos depositados no fundo

do tubo. Finalmente, as células ressuspendidas foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido (ANEXO) acrescido de solução 1 µg/mL de ampicilina e esta foi incubada a 37°C, por aproximadamente 18 horas.

4.10 PCR de colônia para a confirmação da etapa de clonagem

Através de reações em cadeia da polimerase, também se pode confirmar a presença dos genes de interesse nos clones de células bacterianas obtidas após a transformação. Para isso, algumas colônias desenvolvidas (para cada uma das LPMOs) no meio com ampicilina foram coletadas e suspendidas, em diferentes microtubos de 200µL, contendo 10µL de água ultra pura. De cada suspensão, retirou-se 1µL e este volume foi transferido para uma mistura reacional, cuja composição é a mesma descrita no subitem 4.6. Contudo, neste caso, os *templates* utilizados nos processos de amplificação dos genes *Tlpmo1A9* e *Tlpmo2A9* foram os materiais genéticos extraídos das colônias bacterianas, justamente para que se comprovasse a presença do inserto (genes das LPMOs) no vetor *pEXPYR*. Os parâmetros do PCR de colônia realizado são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros utilizados no PCR de colônia para a verificação da presença dos genes *Tlpmo1A9* e *Tlpmo2A9* no vetor de expressão *pEXPYR*.

Etapas de PCR de colônia			
1	98°C	5 min.	
2	98°C	10 seg.	Etapa 2 24 repetições
	63°C	30 seg.	
	72°C	1 min.	
3	72°C	5 min.	
4	12°C	Término	

Fonte: Arquivo próprio.

Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e os fragmentos foram analisados com o auxílio de marcador *GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder* (Invitrogen).

4.11 Extração do DNA recombinante

Todas as colônias bacterianas positivas para os genes de interesse foram incubadas, individualmente, em 10mL de meio LB suplementado por 1 µg/mL de ampicilina, durante 12 horas, sob agitação de 200 rpm a 37°C, para o preparo de estoques. A fim de se extrair o DNA recombinante, um dos estoques de colônias positivas foi cultivado, no mesmo meio e condições acima descritos. Após o período de cultivo, 4mL destas foram centrifugadas. Descartaram-se os sobrenadantes e os *pellets* formados foram tratados com o kit *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega), seguindo as especificações do fabricante, obtendo-se como produto final, os materiais genéticos de interesse purificados.

4.12 Obtenção de protoplastos de *A. nidulans* A773

Aproximadamente 20µL de solução de esporos da linhagem de *A. nidulans* A773, em uma concentração de aproximadamente 10⁸ esporos por mL, foram transferidos para 250mL de meio mínimo (ver composição e pH do meio no subitem 4.4) suplementado com uracila (2,5 µg/mL), uridina (2,5 µg/mL) e piridoxina (1 µg/mL). O cultivo foi mantido sob agitação de 200 rpm, a 37°C, por 18 horas. Após este período, a cultura foi filtrada em papel de filtro, lavando-se em seguida o micélios com MgSO₄ 0,6M e solução DSPS (ANEXO) esterilizada por filtração. A massa micelial foi, então, transferida para um tubo *Falcon* de 50mL estéril, para ser submetida à lise de parede celular com 500mg de lisina de *Trichoderma harzanium* (*Sigma* L1412), 250mg de lisozima de ovo branco de galinha (*Sigma* L7651) em 5mL de solução DSPS. A mistura foi incubada a 32°C, agitada a 100 rpm, por aproximadamente 3 horas. A suspensão resultante foi filtrada em membrana *Miracloth*[®] (*Calbiochem*) e os protoplastos gerados foram retidos em tubo *Falcon* de 50 mL estéril. O material do tubo foi centrifugado, a 4500 rpm e a 4°C, por 10 minutos. Por três vezes, o precipitado formado foi lavado com 45mL de STC50 (ANEXO), sob centrifugação, com a mesma rotação, temperatura e duração anteriores. Por fim, os protoplastos foram ressuspensos com 1mL de STC50 e utilizados na etapa de transformação.

4.13 Transformação química em *A. nidulans* A773

Nas reações de transformação fúngica, aproximadamente 5µg do DNA recombinante obtido no processo descrito no subitem 4.11 foram acondicionados em tubo *Falcon* de 15mL estéril. Adicionou-se STC50 (ANEXO) até que o volume final obtido fosse de 100µL e, em seguida, foram acrescentados a esta solução 200µL da suspensão de protoplastos. A mistura foi incubada a temperatura ambiente, por 20 minutos e após este período, adicionaram-se à mistura 2mL de solução PEG 60% (ANEXO). Para que se garantisse uma condição de homogeneidade do material obtido, o mesmo foi agitado e mantido a temperatura ambiente, por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado a reação 8mL de solução STC50 e a mistura foi homogeneizada, sob branda agitação, para posterior plaqueamento e recuperação de protoplastos, em meio de regeneração (meio mínimo com sorbitol 1,2 M, sem adição de uracila e uridina para seleção de transformantes). As placas foram incubadas a 37°C, por 3 dias, a fim de que fosse possível obter colônias de prováveis transformantes. Finalizado este período, algumas colônias desenvolvidas foram selecionadas, para que se verificasse a expressão das LPMOs recombinantes, sob a indução de maltose.

4.14 Realização de *screening* e seleção de transformantes

O processo de *screening* foi realizado com a seleção de cinco colônias de transformantes fúngicos para cada uma das LPMOs de interesse. Estas foram transferidas para cinco placas de Petri distintas preenchidas com 25mL de meio mínimo líquido (ver composição no subitem 4.4) suplementado com 5% (m/v) de maltose. As placas foram incubadas a 37°C de maneira estacionária, por 48 horas. Após este período, o micélio foi separado do extrato bruto e 2mL de cada extrato foi concentrado em tubos *Vivaspin*[®] de 500µL com corte de 10 kDa, até que um volume aproximado de 20µL fosse alcançado. Este volume concentrado foi submetido à análise de seu perfil enzimático por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Todos os transformantes com perfil eletroforético que indicasse a presença das proteínas recombinantes foram plaqueados em meio mínimo sólido acrescentado de piridoxina (1 µg/mL), para o posterior preparo de seus estoques

em solução 20% (v/v) de glicerol e 10% (m/v) de lactose. Estes foram armazenados em *ultrafreezer*, a -80°C.

4.15 Espectrometria de massas (LC-MS/MS) para a confirmação da identidade de TtLPMO2A9

Do gel de poliacrilamida obtido no procedimento de *screening*, duas bandas que poderiam indicar a secreção de TtLPMO2A9 foram excisadas e submetidas a uma etapa de digestão com tripsina, em conformidade com protocolo disponibilizado no portal do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) (<http://lnbio.cnpem.br/wp-content/uploads/2012/11/Protocolo-de-digest%C3%A3o-in-gel.pdf>), antes de que a análise por espectrometria de massas fosse realizada. Então, uma alíquota dos peptídeos extraídos foi dessalinizada e analisada por *RP-nanoUPLC* (*nanoAcquity*, *Waters*) acoplado a um espectrômetro *Q-TOF Ultimamass* (*Waters*) com fonte de nano-eletropulverização em um fluxo de 0,6 µL/min. O gradiente usado foi de 2 - 90% (v/v) de acetonitrila em ácido fórmico a 0,1% (v/v), ao longo de 45 minutos. O perfil MS/MS foi pesquisado contra a sequência de aminoácidos da TtLPMO2A9, através do software *Mascot* v.2.3 (*Matrix Science* Ltd.) (PERKINS et al., 1999).

Ressalta-se que, como TtLPMO1A9 não pode ser produzida antes da realização do experimento de LC-MS/MS, a mesma não teve a sua identidade confirmada pelo processo acima descrito.

4.16 Processo de purificação das proteínas heterólogas

Uma das colônias fúngicas positivas para a expressão e secreção de cada proteína recombinante foi cultivada em 15 placas de Petri contendo meio mínimo líquido adicionado de 5% (m/v) de maltose e piridoxina (1 µg/mL). Os extratos foram filtrados a vácuo com membrana *Miracloth* e misturados, após 48 horas de cultivo a 37°C. Os materiais resultantes foram concentrados em *Amicon Stirred Cell* (*Millipore*) com membrana de polietersulfona (PES) (corte de 10 kDa) e equilibrados em solução-tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0. Posteriormente, iniciou-se a purificação proteica constituída por duas etapas: cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão por tamanho. No primeiro passo, os extratos

concentrados foram injetados em coluna de troca iônica *DEAE-sepharose* CL6B (*GE Healthcare Life Science*), previamente equilibrada com solução-tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0. Uma vez coletada a primeira fração, a segunda foi gerada a partir da lavagem da coluna com o mesmo tampão anteriormente usado. As demais frações foram obtidas e armazenadas a partir de gradiente de concentração de sal assegurada por sete soluções de cloreto de sódio distintas (50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM e 1 M de NaCl). Todas as amostras resultantes foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15%, para que fosse possível determinar onde a enzima de interesse foi eluída.

Na segunda etapa de purificação, as frações contendo a *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* foram concentradas em membrana de ultra filtração *Vivaspin 6* (*GE Healthcare Life Science*), com corte de 5 kDa e em uma rotação de 5000 x g, até um volume final de aproximadamente 10mL. Os concentrados foram injetados na coluna *Superdex® 200 10/300 GL* integrada ao sistema *Äkta Pure 25 M* (*GE Healthcare Life Science*) e frações de 1,5mL foram coletadas. Estas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, e aquelas que apresentaram cada uma das LPMOs foram unidas, e as amostras finais acondicionadas em refrigerador, a 4°C.

4.17 Remoção de N-glicosilações por tratamento com endoglicosidase (*Endo H*)

Para conferir a presença de N-glicosilações nas enzimas *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9*, estas foram submetidas a um tratamento com a enzima *Endo H* (P0702S) (*New England Biolabs*). Cerca de 25µg de cada proteína foram misturados com 1 µL de *Glycoprotein denaturing Buffer* 10X e aquecidos por 10 min a 100°C. Então, foram adicionados à amostra de cada LPMO 2µL de *Glycobuffer* 3 (10X) e 2µL (1 UI) de *Endo H*, sendo que o volume final de 20 µL foi ajustado com água ultra pura e a reação foi incubada a 37°C por 1 hora. A proteína desglicosilada foi analisada por SDS-PAGE 15%, utilizando-se, como controle, a mesma proteína sem nenhum tratamento.

4.18 Determinação das concentrações de *Tt*LPMO1A9 e *Tt*LPMO2A9

Triplicatas de *Tt*LPMO1A9 e de *Tt*LPMO2A9 obtidas após a purificação foram diluídas 50 vezes com solução-tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0. Então, 160 μ L de cada uma foram distribuídas em três poços distintos de uma microplaca de poliestireno transparente de fundo chato (*Greiner*). Da mesma forma, em três poços diferentes da mesma microplaca, foram inseridas três alíquotas com 160 μ L da solução-tampão supracitada, para o cômputo do branco. Após isso, foi feita a leitura de absorbância de todas as amostras, em um comprimento de onda (λ) de 280 nm, no equipamento *Tecan® Infinite M200* (*Tecan*), com base nos princípios da lei de *Lambert-Beer*. O valor da média aritmética do tampão (branco) foi subtraído da média aritmética calculada para as amostras proteicas, acarretando na quantificação do desvio ótico (DO) necessário ao cálculo da concentração proteica.

4.19 Ensaios com as LPMOs heterólogas e *Amplex Red*

Com base em procedimentos descritos por Bennati-Granier et al., (2015), a verificação inicial da atividade das LPMOs heterólogas foi realizada em ensaios com o composto 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina, comercialmente denominado *Amplex Red* (*Thermo Fisher Scientific*, A22188) (Figura 11), peroxidase extraída de coração de cavalo (*Thermo Fisher Scientific*, 012001), ácido ascórbico (*Labsynth*) como doador de elétrons e solução-tampão composta por citrato, fosfato e glicina, em uma faixa de pH compreendida entre 5,0 e 10,0.

Figura 11 – Ilustração esquemática de processo reacional envolvendo LPMO e *Amplex red*.

Fonte: Adaptado de Kittl et al. (2012).

A composição do meio reacional, cujo volume final foi de 200 μ L, está descrita na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição de ensaios com *Amplex Red*.

Componente	Concentração no meio reacional
<i>Amplex red</i>	50 μ M
<i>Tt</i> LPMOA19 ou <i>Tt</i> LPMO2A9	10 μ M
Peroxidase	7,14 U/mL
Ácido ascórbico	30 μ M
Solução-tampão citrato, fosfato e glicina	20 mM

Fonte: Arquivo próprio.

As reações, realizadas em triplicata, foram adicionadas em microplaca de poliestireno transparente de fundo chato (*Greiner*) e esta foi revestida por papel alumínio, para evitar sua exposição à luz natural ou artificial, por 30 minutos, já que o *Amplex red* é fotossensível. Em seguida, foi feita a leitura de absorbância das

amostras e do branco (amostra sem LPMO), em comprimento de onda de 560 nm, no equipamento *Tecan® Infinite M200 (Tecan)*, verificando-se, através do cálculo de DO, a presença do produto fluorescente resorufina e a consequente atividade das LPMOs.

4.20 Espectroscopia de dicroísmo circular para avaliação da estabilidade térmica de *Tt*LPMO1A9 e *Tt*LPMO2A9.

As medidas de dicroísmo circular foram realizadas junto ao grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, no Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. O equipamento utilizado foi um espectropolarímetro Jasco J-815, no intervalo de 195 a 270 nm, com cubetas de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico. Os espectros por temperatura foram medidos com as proteínas na concentração de 2 mg/mL, aproximadamente, em solução-tampão fosfato de sódio 20 mM (condição de pH ótimo). As leituras foram feitas com intervalos de 5°C, em uma faixa de 30 – 95°C e velocidade de 50 nm/m. Obteve-se uma média de seis espectros por temperatura, resolução de 0,2 nm e tempo de resposta de 1 segundo. Para a curva de desenovelamento térmico, a elipticidade foi monitorada em 222 nm, tempo de resposta de 32 segundos, com rampa de 1°C/min, de 25 a 80°C. As proteínas analisadas foram previamente concentradas até cerca de 1,5 mg/mL. Os dados de desenovelamento térmico foram convertidos em fração proteica desenovelada, através da equação abaixo.

$$f_D = \frac{(\Delta\theta_N - \Delta\theta_x)}{(\Delta\theta_N - \Delta\theta_D)}$$

sendo,

f_D = fração de proteína desenovelada;

$\Delta\theta_N$ = elipticidade da proteína nativa;

$\Delta\theta_D$ = elipticidade da proteína desenovelada.

4.21 Segundo estudo de estabilidade térmica de *TtLPMO1A9* por escaneamento diferencial de fluorimetria (*ThermoFluor*)

Os ensaios de *ThermoFluor* foram acompanhados, em conformidade com protocolos disponíveis na literatura (ERICSSON et al., 2006; PHILLIPS ; DE LA PEÑA, 2011). As medidas foram realizadas no equipamento CFX96 *Real-Time System* (*BioRad*), usando uma placa de PCR de parede fina com 96 poços e fita de vedação de qualidade óptica *MiniOpticon Real-Time PCR* (*BioRad*). Em cada poço, foram adicionados 30µg da proteína *TtLPMO1A9*, diferentes soluções tamponantes com pH entre 1,2 e 10, na concentração final de 50 mM, e 1:2000 da sonda fluorescente *SYPRO Orange* diluída em solução-tampão fosfato de sódio 50 mM.

O gradiente de temperatura aplicado na análise foi de 25 até 90°C, com incrementos de 1°C, ao longo do experimento, e incubação de 30 segundos em cada temperatura, até que a condição de equilíbrio fosse atingida. A variação da fluorescência de *SYPRO Orange* foi medida a partir de excitação em 490 nm e emissão em 530 nm. A construção e análise das curvas, incluindo a determinação da temperatura de fusão, ou *melting* (T_m) de cada amostra, foram realizadas pelo *software GraphPad Prism* (versão 5.0).

Todos os procedimentos deste experimento foram executados junto ao grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, no Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo

4.22 Estudo qualitativo das atividades de *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* por HPAEC (*Dionex*)

Os meios reacionais preparados para esta etapa apresentaram os componentes e composições especificados na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição das amostras para análise por HPAEC (*Dionex*).

Componente	Reação	Controle 1 ¹	Controle 2 ²
TiLPMO1A9 ou TiLPMO2A9	15 µM	-----	15 µM
Agente redutor³	1 mM	1 mM	----- --
BIS-Tris pH 6,0⁴	20 mM	20 mM	20 mM
Substrato⁵	0,2% (m/v)	0,2% (m/v)	0,2 % (m/v)

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: ¹Amostra para verificar eventual interferência no resultado causada pelo agente redutor e/ou substrato;

²Amostra para verificar se haveria alguma espécie de reação na ausência do doador de elétrons;

³Agentes redutores utilizados: pirogallol, ácido ascórbico e ácido gálico;

⁴Solução tamponante;

⁵Substratos utilizados: PASC e xilana (*Beechwood*).

Produtos de reações com as LPMOs foram analisados por cromatografia de interação iônica (HPAEC), no equipamento *Dionex ICS-5000* (*Dionex*). Após a incubação dos meios reacionais, a 50°C e por diferentes períodos, os mesmos foram fervidos, em banho seco, a 95°C, durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000x g por 10 minutos e 5µL dos sobrenadantes foram retirados e injetados no *Dionex* para leitura.

A coluna cromatográfica instalada foi uma *CarboPac PA1 analytical* 4x250 mm. O fluxo e a temperatura foram fixados em 1 mL/min e 30°C, respectivamente. Os celo-oligossacarídeos oriundos da clivagem oxidativa do substrato foram separados com solução de hidróxido de sódio 0,1 M (solução-tampão A) e hidróxido de sódio 0,1 M adicionado de acetato de sódio 1 M (solução-tampão B). Para provar, satisfatoriamente, que os produtos detectados foram gerados a partir da atividade das LPMOs, foram adotados os controles 1 e 2 exibidos na Tabela 8. Adicionalmente, também foi utilizado uma amostra padrão: solução composta por glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos comerciais (*Megazyme*), a saber: celotriose, celotetraose, celopentaose e celohexaose. A concentração de todos estes componentes foi a mesma e igual a 1 mM.

Esta etapa foi executada em colaboração com o Prof. Dr. Igor Polikarpov e o Dr. Marco Kadowaki, no Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

4.23 Análise do efeito colaborativo entre *TtLPMO2A9* e outras *CAZymes*

A quantificação de açúcares redutores liberados em todas as reações a seguir foi feita por intermédio do uso do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme o método de Miller (MILLER, 1959).

Da mesma forma, frisa-se que todas as reações descritas foram feitas em triplicata.

4.23.1 Ensaios com *TtLPMO2A9* e uma endoglucanase recombinante da família GH45 proveniente do basidiomiceto *Gloeophyllum trabeum* (*GtGH45*)

Nesta etapa, para avaliar o efeito colaborativo entre as enzimas recombinantes *TtLPMO2A9* e *GtGH45* (Acesso ao *GenBank*: EPQ56593), na degradação de celulose microcristalina (Fluka, Avicel PH-101) e de celulose tratada com ácido fosfórico (PASC), ensaios foram preparados e executados por diferentes períodos. Para que se verificasse eventual otimização do processo de despolimerização do biopolímero pela LPMO, uma amostra controle também foi adotada. Nesta última, a oxidase foi substituída por uma mesma concentração de albumina do soro bovina (BSA). As composições das reações são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição das reações de decomposição enzimática de PASC e Avicel com *TtLPMO2A9* e *GtGH45*.

Componente	Concentração no meio reacional
<i>TtLPMO2A9</i>	
ou	2,5 μ M
BSA (branco)	
<i>GtGH45</i>	5 μ M
Ácido gálico (doador de elétrons)	1 mM
Solução-tampão acetato de sódio 20mM pH 5,5	20 mM
Avicel ou PASC	5% (m/v)

Fonte: Arquivo próprio.

4.23.2 Ensaio com *TtLPMO2A9* e Celluclast 1,5L em bagaço de cana *in natura* e pré-tratado hidrotermicamente (LHW, *liquid hot water*, em inglês).

O coquetel enzimático *Celluclast* 1.5L (*Novozymes*) foi suplementado com a enzima recombinante *TtLPMO2A9*, para verificar se haveria o melhoramento da sacarificação de fontes de carbono complexas. Neste caso, os substratos escolhidos foram o bagaço de cana *in natura* e o pré-tratado hidrotermicamente, durante 20 minutos. Nos processos reacionais, fixou-se a concentração proteica total em 5 μ g de proteínas/mg de substrato. Porém, dentro deste limite, as concentrações de *TtLPMO2A9* e de *Celluclast* 1.5L variaram, de forma que a massa total de enzimas era composta por 10% (m/m) da oxidase e 90% (m/m) de coquetel comercial, ou por 20% (m/m) da oxidase e 80% (m/m) do mesmo coquetel. Como controle, a massa de *TtLPMO2A9* foi substituída por BSA, na mesma quantidade. A Tabela 10 mostra a composição dos meios reacionais.

Tabela 10 - Composição das reações de hidrólise de bagaço de cana *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor com *TtLPMO2A9* e *Celluclast* 1.5 L.

Componente	Quantidades no meio reacional
Substrato	10mg
Proteínas totais	50µg (5µg de proteínas/mg de substrato)
Celluclast 1,5L	90% (45µg) ou 80% (40µg) da massa de proteínas totais
<i>TtLPMO2A9</i>	10% (5µg) ou 20% (10µg) da massa de proteínas totais
Ácido gálico (doador de elétrons)	1mM

Fonte: Arquivo próprio.

Uma avaliação complementar foi feita ao adicionar uma endoxilanase (enzima acessória) de *Aspergillus fumigatus* (*AfGH10*) (Acesso ao *GenBank*: KEY83365) em novas amostras reacionais, além de *Celluclast* 1.5L e *TtLPMO2A9*. Neste caso em particular, as massas de proteínas totais e de substrato, além da concentração do doador de elétrons, foram as mesmas apresentadas na Tabela 10. Porém, as proporções de *Celluclast* 1.5L, *TtLPMO2A9* e *AfGH10* foram de 70% (m/m), 20% (m/m) e 10% (m/m), respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 Considerações iniciais

Esta seção é dividida em três partes: breve estudo baseado em ferramentas computacionais (Bioinformática), expressão heteróloga das enzimas *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* e a avaliação de ambas em ensaios com diferentes substratos, destacando-se o bagaço de cana-de-açúcar. Vale ressaltar que a primeira parte não compõe o escopo do presente texto. Através desta, objetiva-se fornecer informações teóricas complementares acerca das proteínas analisadas.

5.2 Considerações sobre as enzimas *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* com base em ferramentas da Bioinformática

A Tabela 11 apresenta alguns parâmetros de *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* calculados pela ferramenta *ProtParam* (GASTEIGER et al., 2005). Tais parâmetros, obtidos através das sequências de aminoácidos destas proteínas em sua forma madura, auxiliaram na interpretação de alguns resultados experimentais que serão apresentados.

As sequências referentes aos peptídeos-sinal das LPMOs citadas foram removidas com o auxílio do aplicativo *Signal-Blast* (FRANK ; SIPPL, 2008).

Tabela 11 – Parâmetros de *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* calculados pelo servidor *ProtParam*.

Proteína	Aminoácidos	Massa molar (MM) (kDa)	pI	ϵ^1
<i>TtLPMO1A9</i>	316	32,9	5,03	55140
<i>TtLPMO2A9</i>	238	25,4	5,41	60640

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: ¹ Supõe-se que todos os resíduos de cisteína se encontrem na forma de cistinas.

Como ainda não há dados experimentais disponíveis de *TtLPMO1A9*, analisou-se a mesma, inicialmente, no servidor *Pfam* 31.0 (FINN et al., 2014). Desta forma, foi possível elencar tal enzima em uma das famílias do *CAZy*, como resultado de alinhamentos com diferentes sequências putativas e a da proteína de

Além do domínio catalítico, a distribuição em clados, na Figura 12, não fornece muitas informações detalhadas sobre LPMOs. Segundo Frommhagen et al. (2018), em virtude de as sequências de aminoácidos de mono-oxigenases apresentarem grande variabilidade, não é possível estabelecer uma relação filogenética definitiva entre aquelas e a afinidade por um determinado substrato ou a sua regiosseletividade. Em se tratando desta última, por exemplo, algumas tentativas já foram realizadas, objetivando-se relacioná-la com aspectos estruturais de LPMOs. Moses, Hatherley e Bishop (2016), a partir de análises de bioinformática, consideraram que um *loop* L2 (indicado na Figura 6) mais extenso em mono-oxigenases do tipo 3, resultante da presença de um inserto adicional com cerca de 10 aminoácidos, estaria relacionado com seu modo de ação. Porém, outros estudos mostram que a definição de tal característica é mais complexa, como a publicação de LIU et al., 2018. No que diz respeito a estes últimos autores, por intermédio de análises de dinâmica molecular, os mesmos demonstraram que diversos aminoácidos, ao longo da estrutura de uma mono-oxigenase, e não a extensão do *loop* L2 por si só, podem influenciar a interação da enzima com determinado substrato.

Em decorrência de correlações inconclusivas entre aspectos estruturais e funcionais de LPMOs, a interpretação de dados experimentais continua a ser de suma importância à caracterização das enzimas supracitadas.

5.3 Clonagem e expressão heteróloga

5.3.1 Amplificação das sequências gênicas das enzimas *Tt*LPMO1A9 (*Tt*lpmo1A9) e *Tt*LPMO2A9 (*Tt*lpmo2A9) e obtenção de DNA recombinante por método de *Gibson Assembly*

Através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), foi possível aumentar o número de cópias de genes de interesse presentes em genomas de diferentes organismos. Neste trabalho em específico, utilizaram-se oligonucleotídeos iniciadores *Tt*lpmo1A9_rev e *Tt*lpmo1A9_fwd (rever subitem 4.5 da seção “Materiais e métodos”), para amplificar as sequências de nucleotídeos *Tt*lpmo1A9 e *Tt*lpmo2A9 constituintes do material genético de *T. thermophila* M77.

A Figura 13 mostra a imagem do gel de agarose 1% (m/v), contendo as bandas obtidas após a purificação dos referidos genes amplificados.

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) com os genes *Ttlpmo1A9* e *Ttlpmo2A9* amplificados e purificados.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: M: marcador de tamanho (empares de base, pb) *GeneRuler 1kb DNA Ladder*.

A análise do gel mostrou que as bandas obtidas após as reações de PCR se localizam em regiões compatíveis com os tamanhos teóricos de *Ttlpmo1A9* e *Ttlpmo2A9* que, como destacado na Figura 13, são de 1300 e 1200 pares de base (pb), respectivamente. Os iniciadores utilizados para as amplificações gênicas continham uma “cauda” nucleotídica não-codificante de 18 pb que permitiu a inserção dos genes de interesse no vetor *pEXPYR*, pela técnica de *Gibson Assembly*, o qual não faz uso de endonucleases de restrição. Uma das vantagens desta técnica, quando comparada com outras, é a possibilidade de se manter, sem nenhuma alteração, a sequência que codifica o peptídeo-sinal nativo das LPMOs, uma vez que a ausência, ou erros de processamentos deste, pode afetar o posicionamento da histidina localizada na porção N-terminal da proteína, a mesma que participa da coordenação do íon Cu^{2+} presente no sítio-ativo destas metaloenzimas (BENNATI-GRANIER et al., 2015).

5.3.2 Transformação bacteriana e PCR de colônia

Uma das maneiras eficazes e rápidas de replicar o DNA recombinante se dá através da utilização da maquinaria celular bacteriana. Deste modo, células de *E. coli* Turbo quimiocompetentes foram transformadas com o vetor *pEXPYR*, contendo os genes exógenos *Tflpmo1A9* e *Tflpmo2A9*, através da técnica de choque térmico. Após isto, o cultivo destas células em meio sólido com ampicilina resultou no surgimento de colônias resistentes a este antibiótico, em virtude da incorporação do vetor supramencionado. Algumas destas colônias foram selecionadas e utilizadas em procedimento de PCR de colônia, cujo resultado é mostrado na Figura 14.

Figura 14 – Resultado de PCR realizado em gel de agarose 1% (m/v) com o DNA plasmidial extraído de diferentes colônias bacterianas crescidas em meio sólido com ampicilina.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: A presença de bandas no perfil eletroforético indica que o vetor presente nos clones da colônia contém o gene *Tflpmo1A9* (A) e *Tflpmo2A9* (B).

M: marcador de tamanho (em pares de base, pb) *GeneRuler 1kb DNA Ladder*

As bandas presentes nas imagens resultaram da amplificação dos genes *Tflpmo1A9* (A) e *Tflpmo2A9* (B), contidos no vetor *pEXPYR* utilizado na transformação e extraído de cada colônia bacteriana selecionada. Os *primers* utilizados nas reações foram os mesmos adotados na amplificação gênica e mostrados no subitem 4.5, seção “Materiais e métodos”. Este processo é particularmente importante, para que seja possível descartar conjuntos de células que incorporaram apenas o vetor em questão sem os genes de interesse.

Por intermédio da técnica adotada, verificou-se que a transformação apresentou uma eficiência de 100% (*Tt*lpmo1A9) e 80% (*Tt*lpmo2A9).

5.3.3 Transformação da linhagem mutante *Aspergillus nidulans* A773 e *screening* dos transformantes fúngicos obtidos

Os vetores clonados foram extraídos de uma das colônias bacterianas positivas para os genes das LPMOs e, em seguida, utilizados na transformação química de *A. nidulans* mediada por polietilenoglicol (PEG), para a efetiva expressão heteróloga das proteínas desejadas. Os protoplastos do fungo em questão foram inoculados em meio sólido sem uracila e uridina. Na ausência de vetor *pEXPYR* incorporado, a linhagem mutante A773 é incapaz de crescer sem os dois compostos supracitados.

Para a verificação da ocorrência de expressão heteróloga, algumas colônias fúngicas desenvolvidas foram retiradas e cultivadas, separadamente, em meio líquido com maltose (indutor de expressão). Após dois dias, os extratos brutos filtrados foram submetidos a um processo de *screening* (Figura 15), a fim de que se pudesse constatar a presença das proteínas *Tt*LPMO1A9 e *Tt*LPMO2A9 recombinantes.

Figura 15 – *Screening* (SDS-PAGE 15%) para a verificação de indícios da expressão e secreção das proteínas heterólogas *Tt*LPMO1A9 (A) e *Tt*LPMO2A9 (B).

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: A773_pEXPYR é utilizado como controle, pois contém apenas o vetor *pEXPYR* sem os genes exógenos.

M: marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis* (GE Healthcare).

Analisando-se os dados de peso molecular (PM) das duas enzimas (rever Tabela 11) e os perfis eletroforéticos, há indícios de que, nos dois casos ilustrados, existam bandas nas regiões delimitadas entre 30 e 40 kDa que possam representar as LPMOs recombinantes. Para que isto fosse confirmado, algumas bandas foram extraídas e analisadas, conforme descrição a seguir.

5.3.4 Confirmação da expressão da enzima heteróloga *Tt*LPMO2A9 por espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Submeteu-se à espectrometria de massas o conteúdo extraído de bandas excisadas dos géis de *screening*, para que se confirmasse a síntese da proteína *Tt*LPMO2A9, de maneira mais confiável, conforme pode ser visto na Figura 16. Até o presente momento, não foi possível analisar amostras de *Tt*LPMO1A9 pela técnica em questão. No entanto, mesma apresente atividade típica de mono-oxigenase confirmada por ensaios que serão posteriormente apresentados.

Figura 16 – LC-MS/MS realizado com material extraído após tratamento com tripsina das bandas 1 e 2 presentes no perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%) do transformante T2 para expressão de *Tt*LPMO2A9.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: M: marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis* (GE Healthcare).

Se os fragmentos peptídicos experimentalmente extraídos resultarem em cobertura maior que 25% sobre a sequência de aminoácidos da LPMO disponível no banco de dados do NCBI, conclui-se que a banda está associada à proteína desejada. Com base neste critério, observa-se que, na Figura 16, a banda 2 representa *Tt*LPMO2A9, tendo em vista que sua cobertura de sequência foi igual a 58% (2), diferentemente da outra que detém somente 10% de cobertura (1). Por outro lado, apesar deste baixo percentual, uma análise no servidor *BlastP* com o trecho em vermelho da sequência presente na Figura 16(1), demonstra que o mesmo está associado com a *Tt*LPMO2A9 (Identidade 100%, E-value 6×10^{-19}), não correspondendo, conseqüentemente, a uma proteína de *A.nidulans*. Diferenças nas modificações pós-traducionais podem ter feito com que as bandas migrassem de modo diferente no SDS-PAGE.

5.4 Purificação das amostras de *Tt*LPMO1A9 e *Tt*LPMO2A9 por intermédio de métodos cromatográficos

Nesta etapa, os transformantes T4 (*Tt*LPMO1A9) e T2 (*Tt*LPMO2A9) foram inoculados, separadamente, em cerca de 450mL de meio mínimo líquido com 5% (m/v) de maltose dispostos em 15 placas de Petri, a fim de que, neste volume maior, houvesse uma maior concentração dos biocatalisadores, nos extratos brutos. Para que as LPMOs fossem separadas de outros componentes eventualmente secretados nos meios, os extratos foram concentrados 10 vezes (até o volume final de 45mL) e equilibrados com solução-tampão Tris-HCl 50mM pH 8 foram submetidos à primeira etapa de purificação: cromatografia de troca iônica (Figura 17).

Figura 17 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) com frações obtidas a partir da primeira etapa de purificação de *TtLPMO1A9* (**A**) e *TtLPMO2A9* (**B**), por cromatografia de troca iônica com resina *DEAE-Sepharose* (*GE Life Science*).

Fonte: Arquivo próprio

Nota: **M:** marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis* (*GE Healthcare*).

Após a eluição das proteínas ligadas à resina pela adição de soluções com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl), verificou-se que a enzima *TtLPMO1A9* estava presente, em maior quantidade, nas frações com 200 e 300mM de NaCl. Então, as mesmas foram unidas e o volume total foi novamente concentrado. No caso da enzima *TtLPMO2A9*, a mesma praticamente não aderiu à resina, saindo juntamente com o eluato. Logo, esta foi a única alíquota mantida e concentrada. As duas amostras resultantes apresentaram um volume total aproximado de 10mL, e ambas foram submetidas à última etapa de purificação, através da cromatografia por exclusão de tamanho com coluna preparativa, para uma melhor separação (Figura 18).

Figura 18 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) com frações obtidas a partir de purificação de *TtLPMO1A9* (A) e *TtLPMO2A9* (B), por cromatografia de exclusão por tamanho com coluna preparativa *HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR* (GE Life Science).

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: M: marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis* (GE Healthcare).

As frações enumeradas foram as mantidas para cada mono-oxigenase. A mistura das mesmas resultou em 9 mL da amostra de *TtLPMO1A9* pura e em 15 mL da amostra de *TtLPMO2A9* pura, cujas concentrações proteicas determinadas por espectrofotometria a 280 nm foram de **0,527 mg/mL** e **0,613 mg/mL**, respectivamente.

5.5 Análise de N-glicosilações presentes em *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* recombinantes

Como discutido anteriormente, o processo de glicosilação é uma modificação pós-traducional comum em eucariotos, desde os unicelulares até os organismos superiores. Estudos demonstram que a apropriada anexação de carboidratos às proteínas, ao longo da translocação das mesmas ao retículo endoplasmático (KUKURUZINSKA ; BERGH ; JACKSON, 1987), pode exercer influência sobre o seu enovelamento, secreção e certas propriedades, como a sua estabilidade térmica (BANERJEE et al., 2007; RUBIO et al., 2016).

A fim de prever a presença de sítios de glicosilação nas estruturas das LPMOs heterólogas, utilizou-se o servidor *NetNGlyc* 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Os gráficos obtidos se encontram abaixo (Figura 19).

Figura 19 – Resultado das análises das sequências de aminoácidos das proteínas *TtLPMO1A9* (A) e *TtLPMO2A9* (B), mostrando a predição de sítios de N-glicosilações destacados em vermelho.

Fonte: Arquivo próprio.

Como pode ser notado, ambas as enzimas apresentaram sítios de N-glicosilação preditos. Então, para avaliar a presença de N-glicanas nas estruturas das LPMOs recombinantes, realizou-se uma eletroforese em gel de poliácridamida (Figura 20) com alíquotas de 20 μ L de suas amostras resultantes da etapa de purificação, na presença e na ausência de endoglicosidase (Endo H).

Figura 20 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) realizado após tratamento de *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* com a endoglicosidase Endo H.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: A ausência e presença da referida endoglicosidase é determinada por Endo H (-) e Endo H (+), respectivamente.

M: marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis* (GE Healthcare).

Após tratamento com a endoglicosidase citada, não houve um deslocamento significativo da banda de *TtLPMO1A9* (seta vermelha), mas a mesma aparenta estar mais empacotada. Todavia, é notória a existência de N-glicanas anexadas à *TtLPMO2A9* heteróloga, pois a remoção das mesmas resultou em alteração considerável de seu perfil eletroforético, confirmando a observação feita no fim do subitem 5.3.4.

5.6 Determinação de pH ótimo das mono-oxigenases *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* em reações com *Amplex Red*

A caracterização bioquímica de LPMOs não é trivial. Muitos procedimentos simples e clássicos, como o método de Miller utilizado na caracterização bioquímica de inúmeras *CAZymes* hidrolíticas, são incapazes de detectar a presença dos produtos de oxidação da holocelulose, diretamente. Além disso, técnicas comumente utilizadas na detecção de xilo e oligossacarídeos oxidados, como a cromatografia de troca iônica de alta performance (HPAEC) e espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, são onerosas e não estão sempre à disposição. Por

este e outros motivos, alguns grupos de pesquisa buscam formas alternativas para se atestar as atividades de mono-oxigenases. Uma das maneiras atualmente disponíveis tem relação com o composto 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina, conhecido comercialmente como *Amplex Red* (KITTL et al., 2012).

Sabe-se que em condições aeróbicas e juntamente com um doador de elétrons, LPMOs podem reduzir o oxigênio atmosférico, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último reage rapidamente com *Amplex red*, diante de um excesso da enzima peroxidase, o que acarreta na formação do composto resorufina, substância fluorescente que confere coloração rósea à amostra reacional (Figura 21).

Figura 21 – Detecção de atividade de LPMOs com *Amplex Red*.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: As amostras estão em triplica experimental (1, 2 e 3).

A: controle (ausência de mono-oxigenase); **B:** meio reacional com LPMO ativa.

O processo reacional acima descrito apresenta grande sensibilidade, sendo possível verificar a produção de resorufina, mesmo quando H_2O_2 é liberado em baixas concentrações.

Em decorrência dos resultados obtidos nesta etapa, afirma-se que as enzimas recombinantes *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* apresentaram atividade, inclusive em diferentes condições de pH (Figura 22).

Figura 22 – Determinação do pH ótimo de *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9*.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: Todas reações ocorreram em solução-tampão de citrato-fosfato-glicina 20mM, com *Amplex Red* 50 μ M, 7,14 U.ml⁻¹ de peroxidase de coração de cavalo (*Horseradish peroxidase*) e 30 μ M de ácido ascórbico (agente redutor).

No gráfico da Figura 22, vê-se que a evolução da atividade enzimática, ao longo do aumento do pH, foi a mesma para ambas as proteínas, sendo mais elevada em condições alcalinas e atingindo um valor máximo em pH 8. Contudo, ao se fazer uma análise ponto a ponto, verifica-se que a *TtLPMO1A9* (curva preta) é mais ativa do que a *TtLPMO2A9* (curva vermelha), em meios ácidos (entre pH 5 e 6). Já em pH básico (entre pH 7,5 e 10), ocorre o contrário.

Embora ainda sejam poucos os trabalhos disponíveis nos quais a determinação de pH ótimo de LPMOs seja considerada, existem alguns estudos que demonstram elevadas atividades de mono-oxigenases fúngicas em meios alcalinos. Por exemplo, tem-se a obtenção de grandes concentrações de produtos de uma LPMO homóloga de *T. thermophila* C1, em reações com ácido ascórbico e celulose amorfa regenerada, em pHs altos (FROMMHAGEN et al., 2017). Além disso, neste mesmo trabalho, o emprego da técnica de voltametria cíclica mostrou que a eficiência de redução do ácido ascórbico também aumenta, em condições mais alcalinas. Pode-se esperar, então, que o tipo de agente redutor influencie a eficiência do processo oxidativo de polissacarídeos.

5.7 Dicroísmo circular: estudo da estabilidade térmica das proteínas recombinantes

A técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (DC) foi adotada no estudo da estabilidade conformacional de proteínas, uma vez que é uma ferramenta sensível às variações de suas estruturas primárias e secundárias, ao longo do processo de desnaturação térmica. Ao se monitorar a intensidade de DC em comprimento de onda específico, pode-se determinar o grau de desenovelamento como uma função da temperatura (HIMMEL et al., 1993). Com isto, obtém-se o que se conhece como temperatura de fusão, ou *melting* (T_m): condição na qual metade das proteínas disponíveis se encontra em seu estado desenovelado. Então, pode-se concluir que quanto maior for a T_m , maior será a estabilidade térmica de uma enzima.

Após a realização do dicroísmo circular com a *Tt*LPMO1A9 e *Tt*LPMO2A9, construíram-se os gráficos presentes na Figura 23.

Figura 23 – Determinação da fração desenovelada de *Tt*LPMO1A9 (A) e *Tt*LPMO2A9 (B), além da T_m de cada uma destas, por dicroísmo circular.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: As curvas ajustadas (em vermelho) foram construídas pelo *software Origin 8*.

Como pode ser visto, *Tt*LPMO2A9 apresenta uma T_m mais alta que a *Tt*LPMO1A9. Logo, com base no dicroísmo circular, afirma-se que a primeira possui uma maior estabilidade térmica que a segunda, embora ambas sejam originárias do mesmo fungo termofílico, *T. thermophila*. Porém, no que diz respeito à

*Tt*LPMO1A9, em seu gráfico (Figura 24A), os pontos referentes às frações proteicas desenhovadas nas diferentes temperaturas do experimento realizado ficaram bem dispersas, mesmo após a realização de várias análises de DC, aspecto este que influencia no ajuste da curva apresentada e, conseqüentemente, no cálculo da temperatura de *melting*. Por isso, a T_m de *Tt*LPMO1A9 também foi avaliada por *ThermoFluor*. Esta técnica consiste na exposição do núcleo hidrofóbico da proteína e a associação do mesmo com uma molécula de prova hidrossolúvel. Com o desenhovamento induzido termicamente, o cerne hidrofóbico é exposto e, conseqüentemente, ocorre o aumento de emissão de fluorescência, em virtude da exposição da molécula de prova. Assim sendo, a fluorescência é mensurada em função da temperatura.

Os dados do experimento com *ThermoFluor* constituem o gráfico da Figura 24.

Figura 24 – Resultados do experimento com *ThermoFluor* realizados com *Tt*LPMO1A9, em diferentes condições de pH.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: As soluções tamponantes no interior do retângulo vermelho contêm 300mM de cloreto de sódio.

Os resultados apresentados na Figura 24 mostram que diferentes soluções-tampões e valores de pH podem implicar em alterações na estabilidade térmica da enzima analisada. De acordo com os dados, a melhor valor de temperatura de *melting* para a *Tt*LPMO1A9 foi alcançada na presença de citrato de sódio 50 mM, pH 4,7, quando a T_m atingiu o valor de 52 °C, cerca de 2 °C acima da que havia sido estimada através de experimentos de dicroísmo circular. Já a presença de NaCl não contribuiu para melhor estabilização da proteína.

De qualquer maneira, mesmo após modificações dos ambientes químico e físico-químico em torno da *Tt*LPMO1A9, sua T_m ainda continua consideravelmente abaixo daquela correspondente à *Tt*LPMO2A9. Uma das razões pode estar relacionada com a presença de N-glicosilações nesta última proteína, demonstrado pelo experimento com a Endo H (rever Figura 20). Apesar de a hipótese acima não ser conclusiva, o trabalho de Imperiali e O'Connor (1999) reforça a ideia de que glicoproteínas podem ser mais estáveis do que os seus pares não glicosilados, ao considerarem experimentos termodinâmicos e de dicroísmo circular com diferentes estruturas proteicas.

5.7 Ensaio com as enzimas *Tt*LPMO1A9 e *Tt*LPMO2A9 e substratos polissacarídicos

5.7.1 Análise qualitativa por HPAEC (*Dionex*) dos produtos gerados em ensaios com as LPMOs heterólogas *Tt*LPMO1A9 e *Tt*LPMO2A9, na presença de substratos polissacarídicos

A técnica de HPAEC com o equipamento *Dionex* é muito utilizada, para a detecção direta de produtos gerados pela oxidação de polissacarídeos por LPMOs. Ao se utilizar uma solução de hidróxido de sódio, enquanto eluente, os oligossacarídeos liberados adquirem carga positiva. Desta forma, os mesmos são identificados por um detector eletroquímico acoplado ao equipamento, resultando em diferentes picos no cromatograma. Estes, além de indicarem os produtos liberados e o substrato no qual o biocatalisador é ativo, permitem que a regiosseletividade das mono-oxigenases seja definida, em virtude do tempo de eluição dos produtos oxidados.

Em se tratando das proteínas *Tt*LPMO1A9 e *Tt*LPMO2A9, as duas foram inicialmente avaliadas com dois diferentes substratos, PASC e xilana (*Beechwood*), utilizando-se pirogalol como agente redutor, em solução-tampão Bis-Tris 20mM, pH 6,0. Em cada condição, foram realizados dois processos reacionais, um por 3 horas e outro por 16 horas. Em ambos os casos, nenhuma das duas enzimas apresentou atividade em xilana. Já em PASC, somente *Tt*LPMO1A9 se mostrou ativa, na reação de 16 horas, conforme pode ser visto na Figura 25.

Figura 25 – Análise por HPAEC dos produtos gerados por *Tt*LPMO2A9, após 16 horas de incubação na presença de PASC (gráfico vermelho).

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: O gráfico preto foi obtido a partir da injeção de uma amostra padrão: solução composta por glicose, celobiose e outros celo-oligossacarídeos comerciais (celotriose, celotetraose, celopentaose e celohexaose), cada componente à concentração de 1mM. O padrão possibilita a identificação dos picos referentes aos produtos da LPMO utilizada. Os números de 2 a 6 dizem respeito ao grau de polimerização de cada oligossacarídeo.

A enzima *Tt*LPMO2A9 gerou produtos não oxidados, cujos picos vermelhos se encontram próximos aos dos celo-oligossacarídeos que compõem o padrão adotado (picos pretos Glc 2 - 6), e oxidados que são representados pelos picos vermelhos OGlc 2 – 6. A localização destes últimos define a regiosseletividade das LPMOs. Em se tratando da *Tt*LPMO2A9, a liberação de seus produtos, ácidos aldônicos de diferentes pesos moleculares, geraram picos entre 20 e 30 minutos, atestando que tal enzima é do tipo 1.

Outros ensaios adicionais foram realizados com as enzimas recombinantes, nas mesmas condições anteriores, exceto pelo agente redutor e pelo substrato, sendo PASC o único adotado. Além do pirogalol, foram utilizados os compostos orgânicos ácido gálico e ácido ascórbico, para avaliar se o resultado global das reações de oxirredução seria modificado, a depender do doador de elétrons, assim como tem sido mostrado em outros estudos (FROMMHAGEN et al., 2016; KRACHER et al., 2018).

No entanto, nas diferentes condições reacionais, a *Tt*LPMO1A9 novamente não apresentou nenhuma atividade. No caso de *Tt*LPMO2A9, novamente seus produtos foram detectados apenas após 16 horas de reação. Os cromatogramas referentes a este período se encontram na Figura 26.

Figura 26- Análise por HPAEC dos produtos gerados por *Tt*LPMO2A9, no período de 16 horas, em reação com PASC e diferentes agentes redutores: ácido gálico (GA), ácido ascórbico (AA) e pirogalol (PIRO).

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: O perfil “Oligos nativos” representa o padrão descrito na Figura 25.

Cromatogramas “PASC+ *Tt*LPMO2A9” e “PASC+PIRO” resultam de amostras sem doador de elétrons e sem LPMO, respectivamente.

Comparando-se os picos eluídos após 20 minutos, e ao se considerar que a intensidade dos mesmos está diretamente relacionada com a concentração dos produtos gerados, constatou-se que o melhor resultado foi obtido com ácido gálico.

Todavia, como discutido anteriormente, experimentos de Frommhagen et al. (2017) demonstraram que a eficiência de redução de doadores de elétrons pode variar com o pH. Isto, por si só, indica que os perfis acima apresentados poderiam variar, em caso de alterações da acidez ou basicidade do meio.

A ausência de picos no controle (PASC + *Tt*LPMO2A9) também comprova que a enzima analisada se trata de uma LPMO, pois não há reação sem agente redutor. Este dado é uma comprovação de que a enzima *Tt*LPMO2A9 não dispõe de mecanismo hidrolítico, pois, neste caso, os picos de “oligos” nativos (não oxidados) seriam detectados pelo HPAEC, mesmo na ausência de um doador de elétrons.

A ausência de atividade da *Tt*LPMO1A9 foi inesperada, tendo em vista que a mesma havia se demonstrado ativa em ensaios realizados com *Amplex Red*. Por isso, esperava-se que a ação oxidativa da proteína supracitada fosse confirmada pelas análises no *Dionex*. Isto gerou dúvidas quanto ao fato de a oxidase em questão ter sido processada de forma adequada. Para verificar isto, a proteína foi analisada por ressonância paramagnética eletrônica (EPR, *electron paramagnetic resonance*, em inglês), tendo em vista que este método é capaz de analisar a estrutura eletrônica do íon Cu^{2+} presente no sítio ativo da enzima (FRANDSEN ; LO LEGGIO, 2016). A *Tt*LPMO1A9 apresentou um perfil de EPR esperado para uma mono-oxigenase que tem sua função biológica conservada (dados não apresentados), distanciando assim a possibilidade de erros de processamento. Então, a LPMO em questão pode ter sofrido auto oxidação, promovendo a redução da população proteica ativa.

Em virtude da problemática relacionada com a *Tt*LPMO1A9, a mesma não foi considerada nos ensaios apresentados a seguir.

5.7.2 Efeito colaborativo entre a enzima *Tt*LPMO2A9 e uma endoglucanase da família GH45 de *Gloeophyllum trabeum*, na degradação de Avicel e PASC

Existem inúmeras publicações que atestam a existência de efeito colaborativo entre LPMOs, celulasas e hemicelulasas. Então, no presente estudo, ensaios foram realizados, para que fosse verificada se a ação da enzima *Tt*LPMO2A9 seria capaz de melhorar a hidrólise realizada por uma endoglucanase *homemade* do basidiomiceto *Gloeophyllum trabeum* (*Gt*GH45), cujos estudo e

caracterização bioquímica fazem parte de um artigo submetido à publicação (BERTO et al., 2018).

Reações com dois diferentes substratos, PASC e Avicel, foram preparadas, conforme descrito no subitem 4.23.1, seção “Materiais e métodos”. A fim de comprovar se as eventuais alterações vistas nas amostras com LPMO e *GtGH45* resultaram da contribuição da referida metaloenzima, a mesma foi substituída por uma mesma quantidade de albumina de soro bovino (BSA, *bovine serum albumin*, em inglês), em amostras utilizadas para controle. Frisa-se que o pH reacional foi mantido em torno de 6, para que fosse estabelecida uma condição favorável à ação da celulase presente.

Os resultados obtidos após as hidrólises são apresentados na Figura 27.

Figura 27 – Resultados obtidos após reações de decomposição enzimática dos substratos PASC e Avicel sob o efeito colaborativo entre *TtLPMO2A9* (2,5 μ M) e *GtGH45* (5 μ M).

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: Amostras com BSA (2,5 μ M) e *GtGH45* (5 μ M) funcionaram como controle.

O agente redutor utilizado foi o ácido gálico (1mM) e a solução-tampão foi acetato de sódio 20mM, pH 6,0.

ART: açúcares redutores totais quantificados com DNS (Método de Miller).

Nota-se que a degradação dos dois substratos foi otimizada com a adição da LPMO. Contudo, certamente a melhora foi mais evidente nas amostras com Avicel, a partir de 11 horas de reação, quando a quantidade de açúcares redutores liberados foi cerca de 33% maior que a mensurada na amostra controle (*GtGH45* +

BSA + Avicel). Após 48 horas, *Tt*LPMO2A9 promoveu um aumento de 44% e 19% no rendimento da hidrólise de Avicel e PASC, respectivamente.

5.7.3 Avaliação da hidrólise do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado hidrotermicamente com *Tt*LPMO2A9 e preparo enzimático comercial *Celluclast* 1.5L

Já está bem claro que um dos grandes impasses ao uso de matérias-primas lignocelulósicas é a sua recalcitrância, característica esta que dificulta o processo de sacarificação enzimática.

Objetivando-se verificar se a ação conjunta de *Celluclast* 1.5L, preparo enzimático comercializado pela empresa *Novozymes*, e da enzima *Tt*LPMO2A9 aprimoraria a hidrólise do resíduo vegetal bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BIN) e pré-tratado hidrotermicamente (BPH), duas configurações reacionais foram estabelecidas. Mantendo-se a massa de proteínas totais constante, variaram-se as proporções de *Tt*LPMO2A9 e *Celluclast* (solução 1,4 mg/mL) das seguintes maneiras: 10% (m/v) LPMO e 90% (m/v) coquetel comercial (primeira situação); 20% (m/v) LPMO e 80% (m/v) coquetel comercial (segunda situação). A partir do gráfico presente na Figura 28, verifica-se o que resultou dos experimentos executados.

Figura 28 – 36 horas de hidrólise enzimática de bagaço de cana *in natura* e pré-tratado hidrotermicamente, em amostras com *TtLPMO2A9* e *Celluclast* 1.5L

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: O agente redutor utilizado foi o ácido gálico (1mM) e a solução-tampão foi acetato de sódio 20mM, pH 6,0.

ART: açúcares redutores totais quantificados com DNS (Método de Miller); BIN: bagaço de cana *in natura*; BPH: bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 28, a presença da LPMO não otimizou a degradação do bagaço de cana *in natura*, material extremamente recalcitrante. No entanto, no que tange ao resíduo pré-tratado, em meio com 20% (m/v) de *TtLPMO2A9*, observa-se o houve um aumento na liberação de açúcares redutores totais em torno de 16%, após 36 horas de reação.

Para tentar compreender as diferenças acima descritas, considerou-se, inicialmente, os dados da Tabela 12.

Tabela 12 – Composições médias dos principais constituintes do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado hidrotermicamente, por 20 minutos.

Componentes (%)	Bagaço de cana <i>in natura</i>	Bagaço de cana pré-tratado
Lignina	22,0	28,0
Glucana	39,0	49,0
Xilana	21,0	13,0
Arabinosil	2,0	1,0
Acetil	3,0	2,0
Extrativos	3,0	0,0
Cinzas	10,0	0,0

Fonte: Arquivo próprio.

Como pode ser observado, o pré-tratamento hidrotérmico reduz, consideravelmente, o teor de xilana do bagaço de cana-de-açúcar. Experimentos realizados por Rodriguez-Zúñiga et al., (2015) demonstraram que ao se reduzir a quantidade de hemicelulose do bagaço de cana, notava-se o aumento da atividade de LPMO ativa em substratos celulósicos. No presente caso, o pré-tratamento supracitado, durante 20 minutos, acarretou em uma redução de 62% do teor de xilana, conforme dados disponíveis na Tabela 12. Isto pode justificar os resultados obtidos com 20% (m/v) *TtLPMO2A9* e BPH (Figura 29), tendo em vista que a celulose se tornou mais acessível.

Adicionou-se ainda uma endoxilanase de *Aspergillus fumigatus* (*AfGH10*) (NCBI: KEY8336) ao meio com *TtLPMO2A9* e *Celluclast* 1.5L, a fim de avaliar se a despolimerização realizada pela primeira enzima seria capaz de melhorar, ainda mais, a ação da LPMO recombinante. Os resultados aferidos compõem a Figura 29.

Figura 29 – Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente (20 minutos) através da ação cooperativa entre *TtLPMO2A9*, *Celluclast* 1.5L e *AfGH10* (endoxilanase).

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: O agente redutor utilizado foi o ácido gálico (1mM) e a solução-tampão foi acetato de sódio 20mM, pH 6,0. ART: açúcares redutores totais quantificados com DNS (Método de Miller).

Neste cenário, o efeito cooperativo existente ainda é melhor do que o analisado, anteriormente. Com *AfGH10* e *TtLPMO2A9*, em doze horas, percebe-se que a decomposição do lignocelulósico superou em 22% a sacarificação realizada

apenas com *Celluclast* 1.5L, e em 16%, a reação que ocorreu com este preparo comercial, BSA e a endoxilanase supracitada. Após 36 horas, estes percentuais são de 57% e 18%, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

Até o momento, não há análises disponíveis na literatura sobre LPMOs recombinantes sintetizadas pelo sistema de expressão heteróloga composto pela linhagem mutante *A. nidulans* A773 e o vetor *pEXPYR*, embora a eficiência de tal sistema já tenha sido atestada na produção de outras *CAZymes* heterólogas, como já abordado anteriormente. De toda forma, no presente trabalho, pode-se considerar que os processos relacionados à clonagem e expressão heteróloga das enzimas *TtLPMO1A9* e *TtLPMO2A9* ocorreram com sucesso, resultando em boas concentrações das proteínas de interesse. Embora a *TtLPMO1A9* não tenha sido submetida à avaliação por LC-MS/MS e não tenha demonstrado atividade em substratos celulósicos ou hemicelulósicos, testes com *Amplex red* e a realização de EPR indicam que aquela é, de fato, uma mono-oxigenase.

No que diz respeito à *TtLPMO2A9*, o trabalho de Span et al., (2017) elucidou sua estrutura, e Vu et al., (2014a) demonstrou sua regiosseletividade, em algumas reações com o substrato PASC. Porém, ao longo do presente texto, foi possível realizar experimentos adicionais com a mesma enzima, apresentando, a partir dos mesmos, resultados promissores. Em termos das análises por dicroísmo circular, por exemplo, *TtLPMO2A9* demonstrou boa estabilidade térmica, suportando temperaturas acima de 60°C, antes de sua total desnaturação. Este aspecto pode estar relacionado com a sua N-glicosilação em *A. nidulans*.

Em reações com *GtGH45*, *TtLPMO2A9* otimizou a decomposição, tanto de Avicel quanto de PASC, apesar de a melhora da hidrólise ter sido mais evidente em todas as reações com Avicel. Muitos fatores podem ocasionar esta diferença, como características do próprio substrato considerado. Mas, isto também pode ser decorrente das concentrações das proteínas utilizadas, ou até mesmo da hidrolase adotada. Embora não apresentados aqui, foram feitos testes com *TtLPMO2A9*, uma endoglucanase de *T. thermophila* caracterizada por Berto et al. (2018) e os mesmos substratos celulósicos supracitados. Nestes processos, não foi detectada nenhuma colaboração entre os dois biocatalisadores.

Em processos com bagaço de cana, conclui-se que o pré-tratamento do mesmo foi essencial para o aprimoramento da hidrólise enzimática. Como foi mostrado, as alterações químicas causadas pelo tratamento hidrotérmico facilitam o acesso da *TtLPMO2A9* ao seu substrato, a celulose, já que promove a redução

do teor de hemicelulose. Da mesma maneira, a ação da endoxilanase (enzima acessória) de *Aspergillus fumigatus* considerada neste trabalho melhorou ainda mais a degradação do bagaço pré-tratado, provavelmente devido a despolimerização da hemicelulose remanescente.

REFERÊNCIAS

AGGER, J. W. et al. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 17, p. 6287–6292, 2014.

BANERJEE, S. et al. The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 28, p. 11676–11681, 2007.

BEESON IV, W. T. et al. Extracellular aldonolactonase from myceliophthora thermophila. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 650–656, 2011.

BENNATI-GRANIER, C. et al. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospira anserina*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.

BERKA, R. M. et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922–929, 2011.

BEY, M. et al. Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (Family GH61) from *Podospira anserina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 488–496, 2013.

BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550–583, 2013.

BRENELLI, L. et al. Laccase-derived lignin compounds boost cellulose oxidative enzymes AA9. **Biotechnology For Biofuels**, v. 11, p. 1-12, 2018.

CANTAREL, B. I. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 233–238, 2009.

CARDONA ALZATE, C. A.; SOLARTE TORO, J. C.; PEÑA, Á. G. Fermentation, thermochemical and catalytic processes in the transformation of biomass through efficient biorefineries. **Catalysis Today**, v. 302, p. 61–72, 2018.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 849–864, 2008.

COHEN, S. N. et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 11, p. 3240–3244, 1973.

COUTURIER, M. et al. Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. **Nature Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 306–310, 2018.

DAMÁSIO, A. R. D. L. et al. Heterologous expression of an *Aspergillus niger* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1236–1242, 2011.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578–595, 2009.

DIMAROGONA, M. et al. Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 480–487, 2012.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 19, p. 8455–8465, 2013.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2–17, 2009.

ECKER, J.; FÜLÖP, L. Lignin peroxidase ligand access channel dysfunction in the presence of atrazine. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–7, 2018.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EIBINGER, M. et al. Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 52, p. 35929–35938, 2014.

ERICSSON, U. B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 289–298, 2006.

FINN, R. D. et al. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 222–230, 2014.

FRANDSEN, K. E. H.; LO LEGGIO, L. Lytic polysaccharide monooxygenases: a crystallographer's view on a new class of biomass-degrading enzymes. **IUCrJ**, v. 3, p. 448–467, 2016.

FRANK, K.; SIPPL, M. J. High-performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques. **Bioinformatics**, v. 24, n. 19, p. 2172–2176, 2008.

FROMMHAGEN, M. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2016.

FROMMHAGEN, M. et al. RP-UHPLC-UV-ESI-MS/MS analysis of LPMO generated C4-oxidized gluco-oligosaccharides after non-reductive labeling with 2-aminobenzamide. **Carbohydrate Research**, v. 448, p. 191–199, 2017.

FROMMHAGEN, M. et al. Quantification of the catalytic performance of C1-cellulose-specific lytic polysaccharide monooxygenases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 3, p. 1281–1295, 2018.

GARVEY, M. et al. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 10, p. 581–593, 2013.

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Org.) **The Proteomics Protocols Handbook**. New Jersey: Humana Press Inc. p. 571–607, 2005.

GIBSON, D. G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 343–345, 2009.

GIBSON, D. G. et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. **Nature Methods**, v. 7, n. 11, p. 901–903, 2010.

HALL, J. et al. Brazilian biofuels and social exclusion: established and concentrated ethanol versus emerging and dispersed biodiesel. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, p. S77–S85, 2009.

HARRIS, P. V. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305–3316, 2010.

HEMSWORTH, G. R. et al. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 122–126, 2014.

HEMSWORTH, G. R. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases in biomass conversion. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 747–761, 2015.

HIMMEL, M. E. et al. Isolation and characterization of two forms of β -d-glucosidase from *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39–40, n. 1, p. 213–225, 1993.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 454–466, 2002.

HORN, S. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 45, n. 5, p. 1–12, 2012.

HU, J. et al. Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-8, 2018.

IMPERIALI, B.; O'CONNOR, S. E. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 6, p. 643–649, 1999.

JAGADEESWARAN, G. et al. A family of AA9 lytic polysaccharide monooxygenases in *Aspergillus nidulans* is differentially regulated by multiple substrates and at least one is active on cellulose and xyloglucan. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 100, n. 10, p. 4535–4547, 2016.

JEENES, D. J. et al. Heterologous protein production by filamentous fungi. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 9, n. 1, p. 327–367, 1991.

JOHANSEN, K. S. Lytic polysaccharide monooxygenases: the microbial power tool for lignocellulose degradation. **Trends In Plant Science**, v. 21, n. 11, p. 926–936, 2016.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219–1227, 2012.

KARKEHABADI, S. et al. The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 383, n. 1, p. 144–154, 2008.

KARNAOURI, A. C.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* capable of high-consistency enzymatic liquefaction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 231–242, 2014.

KITTL, R. et al. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 79, p. 1–13, 2012.

KNOP, D. et al. Limits of versatility of versatile peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 14, p. 4070–4080, 2016.

KOCH, G. Raw Material for Pulp. In: SIXTA, H. (Org.) **Handbook of Pulp**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.

KRACHER, D. et al. Active-site copper reduction promotes substrate binding of fungal lytic polysaccharide monooxygenase and reduces stability. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 293, n. 5, p. 1676–1687, 2018.

KROGH, A. et al. Hidden Markov models in computational biology: applications to protein modeling. **Journal of Molecular Biology**, v.235, n. 5, p. 1501-1531, 1994.
KÜCK, U.; HOFF, B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 51–62, 2010.

KUKURUZINSKA, M. A.; BERGH, M. L. E.; JACKSON, B. J. Protein glycosylation in yeast. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, p. 915–944, 1987.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377–391, 2008.

LAFOND, M. et al. Characterization of a broad-specificity β -glucanase acting on β -(1,3)-, β -(1,4)-, and β -(1,6)-glucans that defines a new glycoside hydrolase family. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8540–8546, 2012.

LARKIN, A.; IMPERIALI, B. The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation. **Biochemistry**, v. 50, n. 21, p. 4411–4426, 2011.

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. 1–14, 2013.

LIU, B. et al. Structural and molecular dynamics studies of a C1-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase from *Heterobasidion irregulare* reveal amino acids important for substrate recognition. **FEBS Journal**, v. 285, p. 2225–2242, 2018.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOSES, V.; HATHERLEY, R.; TASTAN BISHOP, Ö. Bioinformatic characterization of type-specific sequence and structural features in auxiliary activity family 9 proteins. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 1–7, 2016.

MÜLLER, G. et al. Harnessing the potential of LPMO-containing cellulase cocktails poses new demands on processing conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 1–9, 2015.

MUNK, L. et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 13–24, 2015.

O'DELL, W. B.; AGARWAL, P. K.; MEILLEUR, F. Oxygen activation at the active site of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 3, p. 767–770, 2017.

PERKINS, D. N. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551–3567, 1999.

PHILLIPS, C. M. et al. Cellobiose dehydrogenase and a copper dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS chemical biology**, v. 6, n. 510, p. 1399–1406, 2011.

PHILLIPS, K.; DE LA PEÑA, A. H. The combined use of the thermofluor assay and thermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization. **Current Protocols in Molecular Biology**, p. 1–16, 2011.

QUINLAN, R. J. et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15079–15084, 2011.

REESE, E. T.; SIU, R. G.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 59, n. 4, p. 485–497, 1950.

RICO, A. et al. Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2014.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Lignocellulose pretreatment technologies affect the level of enzymatic cellulose oxidation by LPMO. **Green Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 2896–2903, 2015.

RUBIO, M. V. et al. Biotechnology for biofuels mapping N-linked glycosylation of carbohydrate-active enzymes in the secretome of *Aspergillus nidulans* grown on lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1–19, 2016.

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.

SABBADIN, F. et al. An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. **Nature Communications**, v. 9, p. 1–12, 2018.

SABINI, E. et al. Digestion of single crystals of mannan I by an endo-mannanase from *Trichoderma reesei*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 8, p. 2340–2344, 2000.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SALOHEIMO, M. et al. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. **Eur J Biochem**, v. 249, n. 2, p. 584–591, 1997.

SANHUEZA, C. et al. The effect of a lytic polysaccharide monooxygenase and a xylanase from *Gloeophyllum trabeum* on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues using a commercial cellulase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 113, p. 75–82, 2018.

SANTOS, B. S. L. dos et al. Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 903–910, 2015.

SANTOS, H. B. dos et al. *Myceliophthora thermophila* M77 utilizes hydrolytic and oxidative mechanisms to deconstruct biomass. **AMB Express**, v. 6, n. 1, 2016.

SEGATO, F. et al. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 2, p. 100–106, 2012.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.

SHARADA, R. et al. Applications of cellulases – review. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 4, n. 2, p. 424–437, 2014.

SIMMONS, T. J. et al. Structural and electronic determinants of lytic polysaccharide monooxygenase reactivity on polysaccharide substrates. **Nature Communications**, v. 8, p. 1-12, 2017.

SPAN, E. A. et al. The role of the secondary coordination sphere in a fungal polysaccharide monooxygenase. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 1095–1103, 2017.

TOPAKAS, E. et al. Functional expression of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: identification of the nucleophilic serine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1765–1772, 2010.

VAAJE-KOLSTAD, G. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, v. 330, p. 219–222, 2010.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. **Current Opinion In Structural Biology**, v. 44, p. 67–76, 2017.

VALDIVIA, M. et al. Biofuels 2020: biorefineries based on lignocellulosic materials. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 585–594, 2016.

VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VU, V. V. et al. Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 2, p. 562–565, 2014a.

VU, V. V et al. A family of starch-active polysaccharide monooxygenases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 38, p. 13822–13827, 2014b.

WALTON, P. H.; DAVIES, G. J. On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 31, p. 195–207, 2016.

WESTERENG, B. et al. The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1-11, 2011.

WESTERENG, B. et al. Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–9, 2015.

YANG, J. C. et al. The complete genome of *Teredinibacter turnerae* T7901: an intracellular endosymbiont of marine wood-boring bivalves (shipworms). **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. 1-7, 2009.

ZUBIETA, M. P. et al. Protein profile in *Aspergillus nidulans* recombinant strains overproducing heterologous enzymes. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 346–358, 2018.

ANEXO – Soluções e meios de cultivo

Meio LB (Luria-Bertani):

1% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,0

Para meio sólido adicionar 1,5% de ágar-ágar

Meio SOC:

Triptona 20g/L, Extrato de levedura 5g/L, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, $MgCl_2$ 20mM, Glicose 20mM

Solução STC50:

Sorbitol 1,2M, Tris 50mM, $CaCl_2$ 10mM, pH 7,5

Solução PEG60%:

6g de PEG 4000 em 5mL de STC50

Solução DSPS:

KCl 1,1 M, ácido cítrico 0,1 M, pH 5,8

Solução-tampão TSS:

Para 50 mL, adicionam-se 5g de PEG 8000, 1,5 mL de $MgCl_2$ 1M, 2,5 mL de DMSO. Completar o volume com meio LB.